

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur
Et de la Recherche Scientifique
Université de SAAD DAHLEB – BLIDA
Faculté des Sciences Agronomiques-Vétérinaires et biologiques
Département de Biologie

Mémoire

DE fin d'Etudes en vue de l'obtention du
Diplôme de Master en Biologie

Option :

Microbiologie-Bactériologie

Thème:

Etude des phénotypes de résistance
aux β -lactamines des Entérobactéries
Isolés d'urines des patients souffrant
d'infection urinaire

Présentée par :

Hamrouni Randah

Date de soutenance : 18/12/2013

Devant les jurys :

<i>Mme F.HAMMAIDI</i>	<i>Maitre assistante</i>	<i>USDB</i>	<i>Présidente</i>
<i>Mr D. GUITARNI</i>	<i>Professeur</i>	<i>USDB</i>	<i>Examineur</i>
<i>Mme A. DEBBIB</i>	<i>Maitre assistante A</i>	<i>USDB</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>Mr H. OULD ROUIS</i>	<i>Ancien Maitre assistant</i>	<i>USTHB</i>	<i>Promoteur</i>
<i>Mr K. AKLOUL</i>	<i>Maitre assistant</i>	<i>USDB</i>	<i>Co-promoteur</i>

PROMOTION
2012/2013



Remerciements

*Nous rendons d'abord grâce à Dieu de nous avoir permis
d'accomplir cette étude.*

Nos remerciements vont ensuite :

Au Dr Ould Rouis, pour nous avoir permis d'effectuer ce travail au sein de son laboratoire et pour sa sympathie, sa gentillesse, sa compréhension ainsi que son aide précieuse et ses conseils qui nous ont été très bénéfiques

A mon co-promoteur Dr AKLOUL KAMEL qui m'a aidé pour terminer ce travail.

Aux membres du jury : le président du jury Mme HAMMAIDI qui nous a fait l'honneur de présider ce travail

Notre examinateur Mr. GUITARNI et Mme DEBBIB pour avoir accepté d'examiner ce travail

Tous les enseignants et enseignantes ayant participé à notre formation

A tout le personnel de laboratoire du Dr Ould Rouis et surtout ceux de l'unité de bactériologie : Ami Hssen, Fadia et Zahia pour leur sympathie et leur aide ainsi que du coup de pouce qu'ils nous ont fourni

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.



Dédicaces

Le grand remerciement notre grand Dieu qui nous a orienté sur la bonne voie pour le remercier et remercier les plus chers et fameux parents aux monde : ma chère mère Soraya et mon cher père Omar : Très chers parents, je ne vous remerciez jamais assez pour vos actes ,continuez à me guider pour vos prières et vos pensées, que Dieu vous garde pour moi

Mes dédicaces vont à :

Mon cher mari « ABDELLATIF » ainsi que ma future famille

Mes chers frères Mohamed et Manef et ma chère sœur Zahra, tante Dalila et sa fille Wraïda ainsi que ma grande famille

Mon vif remerciement est adressé à « Dr OULD ROUIS EL HACHMI », « », Ami HSEN, FADIA, ZAHIA ,MERIEM SOYUAD et toute l'équipe du laboratoire d'analyse de biologie médicale du Dr OULD ROUIS à Blida pour leur collaboration.

Mes chères amies : Fatma Zohra, Soumia, Hamida, Meriem, Narimen, Asmaa, Sarrah, Amina, Yasmin , Souad

Tous les étudiants de ma promotion

Tous ceux que j'aime et qui m'aiment.

RANDAH

Liste des figures

Figure	Titre	page
Figure 02	Photo de la cellule malassez	55
Figure 03	du milieu chromogène	55
Figure 04	La galerie API 20 E	36
Figure 05	Souche de contrôle (<i>E.coli</i> ATCC 25922)	55
Figure 06	Différents types de BLSE	55
Figure 07	Test de synergie chez <i>E.coli</i>	55
Figure 08	Test confirmation ou technique du double disque	55
Figure 09	Test à l'oxacilline	56
Figure 10	La synergie entre l'Augmentin et Ertapénème(Carbapénèmase de classe A) chez <i>Klebsiella pneumoniae</i>	56
Figure 11	Test du confirmation du <i>klebsiella pneumoniae</i> productrice du carbapénèmase (classe A)	56
Figure 12	E-Test (bandelette maison) (Antibiotique :Céfotaxime)	56
Figure 13, 14	E-Test (bandelette maison) (Antibiotique :Imipénème)	56
Figure 15	E-Test (bandelette maison) (souche de contrôle ATCC 25922) Antibiotique :Imipénème	56
Figure 16	Répartition des tranches d'âge féminin	57
Figure 17	Répartition des tranches d'âge masculin	57
Figure 18	Nombre des cas positifs par rapport au nombre total d'échantillon étudiés	58
Figure 19	Nombre des cas positifs du sexe féminin	59
Figure 18	Répartition des résultats positifs selon le sexe	60
Figure 19	Répartition des résultats positifs en selon le sexe	60
Figure 20	Répartition des résultats positifs en fonction de l'âge	61
Figure 21	Germes isolés	63
Figure 22	Résultats de l'étude de la résistance des Entérobactéries aux β -lactamines	65
Figure 23	Résultats de l'étude de la résistance aux β -lactamines chez les espèces à résistance les plus élevé	67
Figure 24	Taux de résistance d' <i>E.coli</i> aux β -lactamines	70
Figure 25	Taux de résistance de <i>Proteus mirabilis</i> aux β -lactamines	71

Figure 26	Taux de résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux β -lactamines	73
Figure 27	Taux de résistance d' <i>Enterobacter cloacae</i> aux β -lactamines	75
Figure 28	Taux de résistance de <i>Serratia odorifera</i> aux β -lactamines	76
Figure 29	Taux de résistance de <i>Proteus vulgaris</i> aux β -lactamines	78
Figure 30	Taux de phénotype sauvage et résistant	79
Figure 31	Phénotype résistant	79
Figure 32	Phénotype résistant chez <i>E.coli</i>	83
Figure 33	Phénotype résistant chez <i>Klebsiella pneumoniae</i>	84
Figure 34	Phénotype résistant de <i>Proteus mirabilis</i>	85
Figure 35	Phénotype résistant d' <i>Enterobacter cloacae</i>	86
Figure 36	Phénotype de résistant de <i>Klebsiella oxytoca</i>	87
Figure 37	Digramme résume les différentes étapes des tests complémentaires	ANNEXE II

Liste des tableaux

Tableaux	Titre	Page
Tableau02	Classification des β -lactamines	Annexe II
Tableau 03	Classification des carbapénèmases	26
Tableau 04	Les caractères macroscopiques des urines	31
Tableau 05	Interprétation des résultats de l'ECBU	36
Tableau 06	Lecture de la galerie API 20E	ANNEXE III
Tableau 07	Valeurs limites des diamètres des zones d'inhibition et la concentration minimale inhibitrice de la souche de référence utilisée pour le contrôle de qualité : (<i>E.coli</i> ATCC 25922)	ANNEXE III
Tableau 08	Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour les Entérobactéries	ANNEXE III
Tableau 09	Liste des antibiotiques utilisés pour les Entérobactéries	44
Tableau 10	Phénotype de résistance à l'imipénème des entérobactéries par production de carbapénémase	ANNEXE II
Tableau 11	Résultats de l'étude de la résistance des Entérobactéries aux β -lactamines	65
Tableau 12	Résultats de l'étude de la résistance des espèces du groupe 01	70
Tableau 13	Résultats de l'étude de la résistance des espèces du groupe 02	73
Tableau 14	Résultats de l'étude de la résistance des espèces du groupe 03	75
Tableau15	Résultats de l'étude de la résistance des espèces du groupe 05	78
Tableau 16	Distribution des principaux phénotypes de résistance aux β -lactamines	79
Tableau17	Répartition globales des germes selon le phénotype	82
Tableau18	Phénotype résistant d' <i>Escherichia coli</i>	84
Tableau 19	Phénotype résistant de <i>klebsiella pneumoniae</i>	85
Tableau20	Phénotype résistant de <i>Proteus mirabilis</i>	86
Tableau 21	Phénotype résistant d' <i>Enterobacter cloacae</i>	87
Tableau22	Phénotype résistant de <i>Klebsiella oxytoca</i>	88
Tableau I	Tableau représente les espèces du groupe 01	19
Tableau II	Tableau représente les espèces du groupe 02	20
Tableau III	Tableau représente les espèces du groupe 03	21
Tableau IV	Tableau représente les espèces du groupe 04	22
Tableau V	Tableau représente les espèces du groupe 05	23

Liste d'abréviation

ADH	Arginine déshydrogénase
AMC	Amoxicilline+Acide clavulanique
AmpC	B-lactamase de classe C
AMX	Amoxicilline
API 20E	Analytical profile index 20E (E= Entérobactéries)
ATM	Aztréonam
BLSE	B β ta –lactamase à spectre étendu
C1G	Céphalosporines de 1 ^{ère} génération
C2G	Céphalosporines de 2 ^{ème} génération
C3G	Céphalosporines de 3 ^{ème} génération
C4G	Céphalosporines de 4 ^{ème} génération
Case	Céphalosporinase
CA-SFM	Comité de L'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CAZ	Ceftazidime
CFP	Céfopérazone
CIT	Citrate
CLED	Cystéine Lactose Electrolytes
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CMT	Complexe mutant TEM
CPO	Cefpirome
CTX	Céfotaxime
CTX_M	Céfotaximase –Munich
CZO	Céfazoline
ECBU	Examen cyto bactériologique des urines
EDTA	Ethylène diamine tétraacétique
ERT	Ertapénème
FOX	Céfoxitine
GEL	Gélatinase
GES	Guyana Extended-Spectrum Beta-lactamase
GN	Gélose nutritive
H₂S	Sulfure d'hydrogène
I	Intermédiaire

IM+ED	Imipénème +EDTA
IMI	imipénèm-hydrolyzing β -lactamase
IMP	Imipénème
IMP	Plasmid-mediated IMP-type carbapenemases
IND	Indol
ITU	Infection urinaire
KPC	Klebsiella pneumonia Carbapénèmase
LDC	Lysine décarboxylase
MF	Mac Ferland
ML	Milliliter
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standars
NMC-A	not metalloenzyme carbapenemase
ODC	Ornithine décarboxylase
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OXA	OXA (oxacillinase) group of β -lactamases (Class D)
OXA	oxacilline
P.H.N	Pénicillinase haut niveau
P.B.N	Pénicillinase bas niveau
PBP	Penicillin binding proteins
PIP	Pépiracilline
PLP	protéines liant pénicillines
R	Résistance
S	Sensibilité
SHV	Sulfhydryl variable
SME	“ <i>Serratia marcescens</i> enzyme
SME	<i>Serratia marcescens</i> Strains
TDA	Tryptophane désaminase
TEM	Temoneira - nom du malade chez qui la première souche a été isolée
TIC	Ticarcilline
TRI	TEM resistance inhibitor
TTC	Ticarcilline+Acide clavulanique

UFC	Unités Formant Colonie.
VEB	Vietnam Extended-spectrum Beta-lactamase
VIM	(Verona integron-encoded metallo- β -lactamase) (Class B)
VP	Vosges Proskauer

Glossaire

Aigue : survient rapidement, et a des symptômes graves de brève durée : non chronique

Anorexie : perte ou diminution de l'appétit

Antibiogramme : examen bactériologique qui permet d'apprécier la sensibilité ou la résistance d'une bactérie vis-à-vis d'un antibiotique

Anticholinergique : substance inhibant l'action de l'acétylcholine dans le système nerveux

Authentique : Dont la réalité, l'origine ne peut être contestée

Bactéricide : adjectif qualifiant une substance qui tue les bactéries

Bactériémie : passage transitoire de bactéries dans le sang circulant à partir d'un foyer microbien

Bactériostatique : adjectif qualifiant une substance qui inhibe la croissance d'une bactérie sans pour autant la tuer

Bactériurie : présence de bactéries dans les urines

Brulures mictionnelles : des douleurs à type de brulures survenant au cours de la miction

Calcul : concrétion pierreuse qui se forme par précipitation de certains composants de la bile ou de l'urine

Calices : division ou formes de coupes de bassinets du rein

Chronique : évolue lentement et se prolonge

Contamination : une culture contaminée est une culture contenant plus de 2 espèces bactériennes avec des colonies différentes d'aspects et de formes différentes

Culture + (positive) : bactériurie sans leucocyturie

Ensemencement : opération qui consiste à porter des bactéries dans un milieu de culture

Génotype : ensemble des caractères génétiques d'un être vivant qu'ils se traduisent ou non dans son phénotype (ensemble des caractères physiques et biologiques d'un individu)

Gloméronephrite : toute maladie rénale caractérisée par une atteinte du glomérule

Glomérule : unité de filtration du sang dans le rein

Hématurie : présence de sang dans les urines

Homéostasie : capacité des organismes à maintenir constante toute une série de paramètres physiologique afin de préserver les équilibres de leur milieu intérieur

Ictère : coloration jaune de la peau, de la sclérotique (le blanc de l'œil) et des muqueuses, due à l'accumulation de la bilirubine dans le sang

Isolement : ensemencement effectué dans un but de séparation de façon à obtenir à partir des bactéries présentes des colonies nettement distinctes, il permet d'obtenir les cultures indispensables à toute étude et identification bactériologique

Laxatif : médicament utilisé dans le traitement de la constipation

Laxatifs osmotiques : (sorbitol, lactulose, mannitol) retiennent l'eau du corps dans l'intestin

Leucocytes : ou globules blancs, sont des cellules nucléées du sang, jouent un rôle dans la défense contre les agents étrangers

Leucocyturie : présence de leucocytes en quantité excessive dans les urines

Lithiase : maladie caractérisée par la présence de calculs dans un organe ou dans son canal extérieur

Méat : orifice externe de l'urètre

Miction : émission naturelle d'urine par évacuation de la vessie

Néonatale : du fœtus et du nouveau-né

Nourrisson : enfant dont l'âge se situe entre 29 jours (fin de la période néonatale) et 2 ans

Nouveau-né : enfant, depuis le jour de sa naissance jusqu'à son 28^{ème} jour de la vie

Parenchyme rénal : tissu rénal contribuant à l'épuration des déchets de l'organisme

Pelvienne : Qui appartient à la partie inférieure du bassin

Périnée : plancher pelvien ; l'espace situé entre l'anus et le scrotum chez l'homme, et entre l'anus et la vulve chez la femme

Péristaltisme : contractions qui se font de haut en bas dans un organe tubulaire

Phénotype : ensemble des caractéristiques d'un organisme et c'est aussi l'expression de certains éléments du génotype

Phimos : rétrécissement de l'orifice prépuce rendant le décalotage du gland pénien impossible

Pollakiurie : augmentation anormale du nombre de mictions

Ponction sus-pubienne : action consistant à introduire une aiguille dans le tissu rénal pour extraire l'urine

Pyurie : présence de pus dans les urines

Reflux vésico-urétéral : remontée de l'urine de la vessie vers les uretères

Septicémie : état infectieux généralisé dû à la dissémination d'un germe pathogène dans l'organisme par l'intermédiaire du sang

Sérotype : ou serovar, ensemble des caractéristiques antigéniques de certains microorganismes

Sténose : rétrécissement pathologique, congénital ou acquis, du calibre d'un organe, d'un canal ou d'un vaisseau

Symphyse pubienne : articulation cartilagineuse légèrement mobile, située entre les fosses antérieures des os iliaques

Transposant : fragment de chromosome

Résumé

Le présent travail a porté sur l'étude de la résistance aux bêta –lactamines de 436 souches d'entérobactéries isolées d'urines dans un laboratoire d'analyse médicale de ville de Blida.

l'Examen Cyto-Bactériologique des Urines étant le test le plus demandé en bactériologie et le plus grand pourvoyeur d'entérobactéries.

La recherche et l'identification des différents phénotypes de résistance ont été privilégiés car ils permettent non seulement la mise en route d'une **antibiothérapie rationnelle et efficace** mais aussi l'instauration de **mesures préventives** face à l'émergence de souches bactériennes extrêmement dangereuses comme celles productrices de **céphalosporinases hyper produites** ou plus grave, sécrétrices de **carbapénémases**.

Les résultats obtenus sont d'autant plus inquiétants qu'il s'agit de souches isolées en médecine de ville et non en milieu hospitalier

nous avons remarqué, la présence des phénotypes de résistance suivants : (22,01%),Pénicillinase Haut niveau , (11,23%) Pénicillinase bas niveau, (10,32%) TRI , (8,49%) BLSE , (3,44%) céphalosporinase haut niveau,(0,69%). BLSE +céphalosporinase haut niveau +carbapénèmase (0,69%).

L'étude des phénotypes peut commencer aisément dans un laboratoire de routine, avec des moyens limités pour peu que certaines précautions techniques soient prises et qu'un certain niveau d'expertise existe.

Mots clés : phénotype de résistance , antibiothérapie, céphalosporinase hyperproduites, carbapénèmase, Entérobactéries

BLSE

Summary

This work has focused on the study of resistance to beta-lactam 436 strains of *Enterobacteriaceae* isolated from urine in a medical lab city, Cyto-Bacteriological examination of urine being the most requested test in bacteriology and the largest provider of *Enterobacteriaceae*.

Research and the identification of different resistance phenotypes were favored because they allow not only the start of a rational and effective antibiotic but also the introduction of preventive measures against the emergence of extremely dangerous bacterial strains such as producing hyper cephalosporinases or worse, secreting carbapenemases.

The results are all the more worrying that these isolated strains in general practice and non-hospital we noticed the presence of resistance phenotypes following: (22.01%) High level penicillinase, (11.23%) penicillinase low, (10.32%) TRI , (8.49%)ESBL, (3.44%) high cephalosporinase level, (0.69%) ESBL + high-level cephalosporinase carbapenemase.

The study phenotypes can start easily in a routine laboratory with limited means little to some technical precautions are taken and a certain level of expertise exists.

Keywords: phenotype, antibiotics, cephalosporinase hyperproduites, carbapenemase, TRI ESBL, *Enterobacteriaceae*.

ملخص

وقد ركز هذا العمل على دراسة المقاومة لبينا لاكتام ل 436 سلالة من البكتيريا المعوية المعزولة من البول في المختبر الطبي لولاية البليده

الفحص سيتوبكتريولوجي للبول يعتبر الاختبار الاكثر طلبا في علم الجراثيم و أكبر مزود للمعلومه. ويفضل البحث وتحديد

الظواهر المقاومة المختلفة لأنها تسمح ليس فقط باختيار المضادات الحيوية الفعالة ولكن أيضا اتخاذ تدابير أثناء

النتائج المقلقه كما لاحظنا وجود مقاومة الظواهر التالية: بنسليناز المستوى (22.01٪)، بنسليناز carbapenemases.

، سيفالوسبوريناز عالية مستوى (8.49٪) ESBL، (10.32٪) IRR، (11.23٪) منخفضة ESBL + (3.44٪)،

و على مستوى معين من الخبرة موجود (سيفالوسبوريناز رفيع المستوى) (0.69٪ carbapenemase).

الكلمات الرئيسية

، hyperproduites: النمط الظاهري، والمضادات

carbapenemase ، TRI- ESBL

Sommaire

Chapitre I : Partie bibliographique

L'antibiorésistance

I.1.Les antibiotiques.....
I.1.1.définition.....
I.1.2.Classification des antibiotiques.....
I.1.3. Classification des β -lactamines
II. résistance des entérobactéries au bêta-lactamines.....
II.1.Définition.....
II.2Types de résistances bactériennes.....
➤ Naturelle.....
➤ Acquisée.....
II.2.3.Support génétique de la résistance.....
➤ Mutation chromosomique.....
➤ La résistance par acquisition des gènes exogènes.....
II.2.4.Mécanisme de résistance aux antibiotiques.....
II.2.4.1.Inactivation de l'antibiotique par production d'enzymes.....
❖ Types de Bêta-lactamases
➤ Bêta-lactamases chromosomiques.....
➤ Bêta-lactamases plasmidiques.....
II.2.4.2. Modification de la cible des antibiotiques
II.2.4.3. Imperméabilité de la paroi bactérienne.....
II.2.4.4.Excrétion de l'antibiotique par un mécanisme d'efflux.....
III. Phénotype de résistance des entérobactéries vis-à-vis les bêta-lactamases
III.1. Définition.....
III.2. Phénotype de résistance des entérobactéries.....
III.2.1.Résistance naturelle ou phénotype naturelle « sauvage ».....

III.2.3.Règles de lecture interprétative.....

III.2.4.Concentration minimale inhibitrice.....

ChapitreII : Matériel et méthode

I. Matériel.....

I.1.Matériel biologique.....

I.2.Matériel non biologique.....

II. Méthodes.....

II.1 Prélèvement.....

II.2.Différents méthodes de prélèvements.....

II.3. Traitement de prélèvement.....

II.4.Examen cyto bactériologique des urines « ECBU ».....

II.4.1.Examen macroscopique.....

II.4.2.Examen microscopique.....

II.4.2.1.Examen à l'état frais.....

II.4.2.2.Examen bactériologique.....

a)-Choix des milieux de cultures.....

- Milieux pour numération bactérienne.....
- Milieux d'isolement.....
- Milieu chromogène.....

b)-Méthodes utilisées.....

- Méthode à l'anse calibrée
- Méthode de KASS.....

II.4.2.3.Interprétation de la bactériurie.....

II.5.Identification et tests d'orientations

II.6.Contrôle de qualité.....

II.7.Antibiogramme.....

II.8.Catégorisation cliniques finale et lecture interprétative

II.9.Tests complémentaires.....

Chapitre III : Résultat et interprétation

Résultat.....

Discussion.....

Conclusion.....

Références bibliographiques

Annexes

INTRODUCTION

La **résistance bactérienne aux antibiotiques** est devenue un **problème de santé publique majeur et mondial**. L'utilisation massive et anarchique des antibiotiques en médecine humaine, en médecine vétérinaire et même dans les élevages de certains animaux destinés à la consommation, est à l'origine de la sélection de souches résistantes voire multi-résistantes.

Concomitamment, la recherche de nouvelles molécules actives s'essouffle eu égard à la difficulté de cette tâche et à son coût faramineux pour les laboratoires pharmaceutiques. Paradoxalement, ce sont ces mêmes laboratoires qui incitent à la prescription abusive de leurs antibiotiques dans un but de rentabilité.

Les laboratoires pharmaceutiques se détournent de l'antibiothérapie pour se tourner vers des créneaux de recherche beaucoup plus rentables comme celui des maladies chroniques ou des maladies dégénératives.

Les antibiotiques, particulièrement les molécules de dernière génération, deviennent des armes parfois ultimes qu'il faut manipuler avec une extrême prudence et parcimonie afin de ne pas retrouver certains patients dans des situations « **d'impasse thérapeutique** », phénomène de plus en plus rencontré avec des « **bactéries résistantes à tout** ».

Une véritable révolution s'impose, non seulement dans le maniement de ces médicaments par une formation médicale continue performante mais également par l'instauration de véritables **stratégies d'antibiothérapie** et d'**hygiène hospitalière**.

L'utilisation rigoureuse et rationnelle des antibiotiques nécessite une parfaite connaissance de la molécule utilisée, de sa famille, des mécanismes de résistance susceptibles d'être rencontrés ou d'apparaître.

Le traitement antibiotique se doit de viser deux objectifs en même temps :

- l'un immédiat ou à très court terme : le traitement du patient par le produit le mieux indiqué, répondant aux critères d'**efficacité**, d'**innocuité**, de **disponibilité**, de **faible coût** etc.
- l'autre, à plus long terme : la **préservation de l'écosystème bactérien** de l'établissement de santé en évitant au maximum la sélection des germes résistants.

La **lecture interprétative de l'antibiogramme** et la connaissance des phénotypes de résistance procèdent de cette logique dans une démarche d'**expertise** à même de concilier **efficacité thérapeutique et pérennité** de cette dernière.

La lecture interprétative n'est malheureusement pas chose facile, particulièrement pour les antibiotiques membres de la famille des bêta-lactamines, objet de ce travail.

Le but de cette étude est, devant l'extrême complexité des mécanismes de résistance et la **diversité des phénotypes**, d'arriver à identifier ceux responsables de résistance aux bêta lactamines chez les entérobactéries isolées en médecine de ville.

L'identification de certains phénotypes dangereux ou extrêmement dangereux est d'une **importance capitale** quant au choix du traitement et l'instauration de mesures préventives dans les meilleurs délais afin de préserver les autres patients ou les futurs malades des graves échecs thérapeutiques qui les guettent. La connaissance de la fréquence de découverte des différents phénotypes est tout aussi importante sur le plan épidémiologique.

L'approfondissement de l'étude des phénotypes de résistance aux bêta-lactamines fait inévitablement appel aux techniques de biologie moléculaire, irréalisable à notre niveau pour des raisons de coût.

L'espoir caressé par cette étude phénotypique, outre l'identification, est d'arriver à établir un **algorithme** pratique, adapté aux moyens d'un laboratoire de ville, permettant une approche d'identification intégrée ou intégrable dans le travail de routine d'un laboratoire de microbiologie médicale.

I . L'antibiorésistance :

I.1. Les antibiotiques :

I.1.1.Définition :

On appelle « Antibiotique » toute substance naturelle d'origine biologique élaborée par un organisme vivant, substance chimique produite par synthèse ou substance semi synthétique obtenue par modification chimique d'une molécule de base naturelle ayant les propriétés suivantes :

- Activité antibactérienne.
- Activité en milieu organique.

Les antibiotiques ont la propriété d'interférer directement avec la prolifération des micro-organismes à des concentrations tolérées par l'hôte (**Adam et Drouillard, 2009**).

I.1.2. Classification des antibiotiques :

La classification des antibiotiques peut se faire selon :

- **L'origine** : élaboré par un organisme (naturel) ou produit par synthèse (synthétique ou semi synthétique).
- **Spectre d'activité** : liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large).
- **Mode d'action** :

Les antibiotiques agissent à l'échelon moléculaire au niveau d'une ou de plusieurs étapes métaboliques indispensable à la vie de la bactérie. Ils agissent par la toxicité sélective au niveau de la paroi bactérienne, membrane cytoplasmique, ainsi que sur la synthèse protéines et des acides nucléiques (**Auckenthaler, 1999**).

- **Nature chimique** :

Les antibiotiques sont classés selon leur structure chimique en 13 familles principales, la plus importante est la famille des β -lactamines

❖ Toutes les β -lactamines sont disposées autour d'une structure chimique commune : le cycle β -lactame (hétérocycle à 5 atomes), qui est responsable de l'activité antimicrobienne (**Dabernat, 1999**). Selon la nature de l'hétérocycle associé au cycle β -lactames, on distingue :

- Les pénames (pénicillines)
- Les céphèmes (céphalosporines)
- Les pénèmes (carbapénèmes)
- Les inhibiteurs des β -lactamases

- Les monobactames (**Fauchère et avril, 2002**)

I.1.3. Classification des β -lactamines : (Tableau 02)

Les β -lactamines restent toujours la famille d'antibiotiques la plus utilisée, la plus diversifiée et la moins toxique. Elle est toujours en pleine évolution, avec des produits paraissant continuellement (**Newman, 1990**).

- **Mode d'action des β -lactamines :**

Toutes les β -lactamines ont le même mécanisme d'action : Elles bloquent la synthèse du peptidoglycane qui est le polymère majeur spécifique de la paroi des bactéries Gram(+) et Gram (-) Cette dernière est une enveloppe rigide. Elle a pour rôle de protéger la bactérie des agents extérieurs et d'assurer les échanges avec l'environnement (**Cavallo et al, 2004**).

Les β -lactamines présentent une analogie structurale avec la terminaison D-ala-D-ala du précurseur du peptidoglycane .Elle se fixe de manière covalente sur des protéines membranaires, appelées protéines de liaison à la pénicilline PLP ou PBP (Penicillin Binding Proteins). Ces protéines sont des enzymes impliquées dans la phase finale de la synthèse du peptidoglycane, C'est-à-dire l'étape de polymérisation à partir de sous-unités faites d'un disaccharide-peptide.L'activité enzymatique des PLP est inhibé par leur liaison avec les β -lactamines.

Les β -lactamines ont un effet bactéricide : éclatement et autolyse de bactérie, et un effet bactériostatique (**Moulin et Coqueral,2002**).

I.2 : La résistance des entérobactéries aux β -lactamines :

Depuis l'introduction des antibiotiques en thérapeutique, on assiste à l'émergence très rapide de nombreuses souches bactériennes insensibles à un ou plusieurs antibiotiques (**Rouveix, 1990**).

La résistance est actuellement un véritable problème de santé publique pour la prise en charge des malades. Les hôpitaux payent un lourd tribut aux bactéries antibiorésistantes qui génèrent le plus souvent les infections nosocomiales

I.2.1 : Définition :

Une espèce bactérienne est dite « résistante » à un antibiotique si cette dernière est capable de se multiplier et de croître en présence de concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe la croissance des autres souches de la même espèce .En effet ,cette résistance se caractérise par son caractère naturel ou acquis, son mécanisme et son support génétique. (**Fauchère et Avril, 2002**).

I.2.2 : Types de résistances bactériennes :

La résistance d'une souche bactérienne peut être :

- **Naturelle (intrinsèque) :**

C'est une insensibilité aux antibiotiques, existant naturellement chez tous les membres d'un genre ou d'une espèce bactérienne. Elle fait donc, partie du patrimoine génétique normal du germe (**Bèrche et al, 1997**).

➤ **Acquise :**

C'est l'acquisition de nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotiques. Ce nouveau gène peut être obtenu soit par mutation au niveau du chromosome qui est un phénomène rare soit par transfert d'ADN de plasmides conjugatifs ou de transposons (mécanisme le plus fréquent) (**Jumpeau et al. 1994**).

I.2.3 : Support génétique de la résistance :

➤ **Mutation chromosomique :**

Représente 10 à 20% des mutations acquises. C'est l'apparition d'une mutation, c'est -à-dire l'apparition d'un nouveau caractère par suite d'une modification d'un gène porté par le chromosome bactérien. Elle s'effectue de façon spontanée. Les mutations sont stables et héréditaires (**Béraud, 2001**)

➤ **La résistance par acquisition des gènes exogènes :**

• **Plasmide :**

Très fréquente (80-90%). Elle est liée à l'acquisition d'un élément génétique transférable, petite molécule d'ADN extra-chromosomique appelé plasmide (**Rouveix, 1992**).

La plupart des plasmides sont auto-replicables, portant plusieurs gènes de résistance vis-à-vis d'antibiotiques variés expliquant la survenue de bactéries multi résistantes

Ils sont aussi auto- transférables par conjugaison à une autre bactérie, pas nécessairement de même espèce

• **Intégron :**

Ce sont des petites unités génétiques constituées d'un gène d'intégron codant l'insertion de l'élément dans une région génomique, d'un gène de résistance et d'un promoteur fort .Les génomes bactériens contiennent de nombreux intégrons silencieux qui s'expriment dès que des antibiotiques seront présent dans le milieu

Ils peuvent s'intégrer successivement dans une unité transférable (chromosome ou plasmide), donc ils enrichissent ces éléments transférables en gènes de résistance.

• **Transposons :**

Ce sont des unités génétiques mobiles constituées d'une zone centrale contenant nombre limité de gènes pouvant coder des caractères divers de l'antibiorésistance et de deux séquences d'insertion. Grace à cette structure, les transposons capable de s'insérer, sans homologie, en de nombreux endroit du génome tant dans le chromosome que dans le plasmide. Ces transposons sont des restructurations et donc d'évolution et d'adaptation du génome bactérien (**Fauchère et Avril ,2002**).

I.2.4. Mécanisme de résistance aux antibiotiques :

Pour agir, les β -lactamines doivent pouvoir atteindre leur cible, qui est les PLP. Dans un premier temps, elles doivent pénétrer à travers la membrane externe qui est une barrière de perméabilité présente chez les bactéries à Gram négatif puis traverser le peptidoglycane bactérien et l'espace périplasmique pour ce lier avec une certaine affinité aux PLP présentes sur la membrane cytoplasmique et indispensable à la synthèse de la paroi bactérienne.

A chacun de ces étapes, la bactérie peut opposer un ou plusieurs moyens de défense

(Cavallo et al, 2004)

On peut classer les mécanismes de résistance en quatre groupes :

- Inactivation de l'antibiotique par production d'enzymes détruisant les antibiotiques (Ex : β -lactamases).
- Modification de la cible de l'antibiotique (modification du récepteur de l'antibiotique (Ex : Modification des PLP).
- Diminution de la perméabilité membranaire (modification des porines).
- Excrétion de l'antibiotique par un mécanisme d'efflux (Fauchère et al., 2002).

I.2.4.1. Inactivation de l'antibiotique par la production d'enzymes :

L'un des mécanismes le plus souvent en cause est la résistance liée à la synthèse de β -lactamases qui sont des enzymes (type sérine A, B ou C) ou métallo-enzymes (classe B)) qui inactivent les β -lactamines par ouverture du noyau β -lactame.

Il en existe une grande variété ; on peut les classer selon les β -lactamines qu'elles hydrolysent de manière préférentielle (par exemple pénicillinase, céphalosporinase), leur sensibilité à divers inhibiteurs, ou suivant qu'elles sont codées par des gènes chromosomiques ou plasmidiques (Fauchère, 1997).

❖ Types de β -lactamases :

➤ β -lactamases chromosomiques :

Ces enzymes sont souvent des céphalosporinases (les céphalosporines sont leurs substrats préférentiels). Les enzymes se fixent sur les substrats en hydrolysant ou en bloquant leur fixation ultérieure sur les PLP. Les inhibiteurs de β -lactamases, comme l'acide clavulanique, n'inhibent pas ces enzymes.

Les gènes codant pour ces enzymes sont naturellement présents chez beaucoup d'entérobactéries (notamment *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*). Ces gènes ne s'expriment qu'en présence d'inducteurs qui sont presque toujours des β -lactamines (**imipénème et céfoxitine**) sont les plus forts inducteurs).

Ces enzymes peuvent être produites à bas niveau par les souches sauvages (céphalosporinase de bas niveau ou réprimée). Une mutation sur les gènes régulateurs aboutit à une hyperproduction de ces enzymes (Céphalosporinase de haut niveau ou dérèprimée) (Fauchère et Avril, 2002).

Exemple :✓ **Pénicillinases chromosomiques :**

Les pénicillinases chromosomiques sont des pénicillinases constitutives qui sont spécifiques à *Klebsiella* et *Levinea*.

Elles confèrent une résistance naturelle aux pénicillines A, aux carboxypénicillines.

Vu le bas niveau de production d'enzymes, elles sont sensibles aux β -lactamines, aux inhibiteurs des β -lactamases. (Martin et Gounf, 2000),

✓ **Céphalosporinases :**

Elles sont codées par un gène chromosomique et ont une localisation périplasmidique. Elles sont produites à faible quantité par certains genre tels que : les *Enterobacter*, les *Citrobacter*, les *Proteus* les *Morganella*, les *Providencia*, les *Pseudomonas*, les *Acinetobacter* et les *Serratia*. Ces genres sont résistants aux aminopénicillines et aux céphalosporines de 1ère génération. Mais ils sont sensibles à la plupart des céphalosporines de 2ème et 3ème génération, aux acyluréidopénicillines, monobactames, carbapénèmes. (Martin et Gounf, 2000),

✓ **Céphalosporinases inductibles :**

La production de céphalosporinase chromosomique est souvent inductible. Des inducteurs (tels que les bêta lactamines) peuvent lever l'action du répresseur chargé du contrôle du gène qui règle la production de cette céphalosporinase. Ce gène est alors activement transcrit et ainsi la production de l'enzyme augmente.

✓ **Céphalosporinases constitutives :**

Certaines espèces peuvent perdre par mutation le contrôle de la production de céphalosporinase qui est alors dérégulée et donc produite abondamment. Ces souches modifiées deviennent résistantes à toutes les bêta lactamines sauf les amidinopénicillines et les carbapénèmes.

✓ **Céphalosporinases d'*Escherichia coli* :**

Chez 7% des souches, une céphalosporinase est mise en évidence. Cette céphalosporinase est due à l'augmentation par mutation de la production de la céphalosporinase chromosomique naturelle.

Elle détruit les pénicillines A, les céphalosporines de 1ère génération, la céfoxitine. Les autres céphalosporines de 2ème et de 3ème génération, l'aztréonam et les pénèmes restent actifs. (Phillipon A., 2008)

➤ **β-lactamase plasmidique :**

Ces enzymes sont surtout des pénicillinases mais certaines hydrolysent aussi les céphalosporines. Les inhibiteurs de la β-lactamase inhibent au moins partiellement l'activité de ces enzymes.

Les gènes codant pour ces enzymes sont plasmidique.ils s'expriment en absence de tout inducteur.

Les enzymes produites sont très nombreuses et désignées par des sigles qui rappellent, soit le nom du patient chez lequel elles ont été isolées la première fois, soit leur profile d'activités.

On connaît plusieurs séries de ces enzymes, avec pour chaque série plus de 25 enzymes différentes (TEM 1à26, OXA, SHV,). Ces enzymes sont notamment produites par les entérobactéries Exemple : *Enterobacter cloacae* produit une pénicilline type TEM 1).

Certains de ces enzymes (TEM, SHV) ont subi des mutations qui les ont rendus actives sur un très grand nombre de substrats incluant, outre les pénicillines, la plupart des céphalosporines. Ces enzymes mutées ont été dénommées β-lactamases à spectre élargi (BLSE). (Martin et Gounf, 2000),

✓ **Pénicillinases plasmidiques :**

Leur spectre d'action comprend celui des pénicillinases chromosomiques auquel on ajoute une céphalosporine de 3ème génération : le céfoperazone.

Elles sont sensibles à l'action des inhibiteurs des β-lactamases. (Acide clavulanique, Sulbactam, Tazobactam). (Phillipone A., 2008)

✓ **β-lactamases à spectre élargi (βLSE) :**

Elles sont surtout retrouvées chez les *Klebsiella pneumoniae* et plus rarement chez les *Enterobacter*, les *Citrobacter* ou les *Escherichia coli*.

Elles hydrolysent toutes les bêta-lactamines jusqu'aux céphalosporines de 3ème génération. Elles sont plasmidiques, transférables et sensibles aux inhibiteurs des bêta-lactamases.

Leur spectre d'action inclut toutes les bêta-lactamines à l'exception des céphamycines et des carbapénèmes (**Imipénème**). Elles sont sensibles à l'action des inhibiteurs des bêta-lactamases.

Les bacilles à Gram négatif ont une résistance liée à la synthèse de pénicillinases chromosomiques comme chez *Klebsiella* et *Levinea* qui résistent naturellement aux pénicillines A et carboxypénicillines soit :

- par synthèse de céphalosporinases chromosomiques (comme chez *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacea* et d'autres espèces) leur conférant une résistance aux Aminopénicillines et aux céphalosporines de 1^{ère} génération (**Martin et Gounf, 2000**),

- par synthèse de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) qui sont des enzymes apparues à la suite d'une modification survenue sur des plasmides qui les codent.

Ces enzymes hydrolysent toutes les β -lactamines jusqu'aux céphalosporines de 3^{ème} génération. On les trouve surtout chez *Klebsiella pneumoniae* et plus rarement chez *E. coli*, *Citrobacter* et *Enterobacter* (**Dehecq et al., 2004**).

I.2.4.2. Modification de la cibles des l'antibiotiques :

Modification des PLP :

Les protéines liant les pénicillines ou « PLP » sont des enzymes qui catalysent l'étape finale de la biosynthèse du peptidoglycane et qui sont la cible des bêta-lactamines. Une modification des PLP est principalement décrite chez les bactéries à Gram positif et, beaucoup plus rarement, chez des bactéries à Gram négatif. La modification d'affinité des PLP résulte de trois mécanismes :

- . Diminution de l'affinité des PLP pour les bêta-lactamines.
- . Augmentation de la synthèse des PLP existantes avec hyper-expression de PLP possédant naturellement une faible affinité pour les bêta-lactamines.
- . Synthèse d'une ou de plusieurs nouvelles PLP insensibles aux bêta-lactamines (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*) et liée à l'acquisition de nouveaux gènes. (**Euzèby, 1999**).

I.2.4.3. Imperméabilité de la paroi bactérienne :

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau. La sensibilité aux β -lactamines dépend du nombre de porines fonctionnelle. L'altération des porines par mutation à l'origine de résistance acquise aux β -lactamines, soit par une modification structurale d'une des porines essentielles ce qui a été décrit chez *E.coli*, soit par une diminution quantitative des porines, qui est la situation la plus fréquente. (**Cavallo et al ,2004**)

I.2.4.4. Excrétion de l'antibiotique par un mécanisme d'efflux :

Il existe chez les bactéries des systèmes permettant d'excréter certains antibiotiques. Ces systèmes jouent un rôle dans la résistance naturelle. Sous l'effet de mutations, leur niveau d'expression peut augmenter et faire apparaître une résistance acquise pouvant toucher simultanément plusieurs familles d'antibiotiques (par exemple fluoroquinolones et β -lactamines).

Le phénomène a été décrit surtout chez les bactéries à Gram négatif. La résistance à la tétracycline est due le plus souvent à l'acquisition d'un gène responsable d'un mécanisme d'efflux (Avril et Carlet, 1998).

II. Phénotypes de résistance des entérobactéries vis-à-vis les β -lactamines :

II.1. Définition :

Le phénotype est l'état d'un caractère observable (caractère anatomique, morphologique, moléculaire, physiologique, ou éthologique) chez un organisme vivant.

Au sein de chaque espèce, on distingue le phénotype sauvage ou sensible déterminé par les mécanismes naturels de résistance et les phénotypes résistants déterminés par des mécanismes acquis de résistance (Jehl F., et al, 2002)

II.2. Phénotype de résistance des entérobactéries :

II.2.1. Résistance naturelle ou phénotype « sauvage » :

Les entérobactéries produisent naturellement divers β -lactamases, ce qui permet de les classer en cinq groupes phénotypiques de résistance :

- **Groupe 01** : *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica*, *Shigella spp*
- **Groupe 02** : *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter koseri*
- **Groupe 03** : *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Serratia odorifera*, *Yersinia enterocolitica*.
- **Groupe 04** : *Yersinia enterocolitica* , *Serratia fonticola*.
- **Groupe 05** : *Kluyvera ascorbata*, *Kluyvera cryocrescens*, *Proteus vulgaris* .
- (Phillipone A., 2008)

a)- **Groupe 01** : phénotype sensible « sauvage » :

Salmonelle spp et *Proteus mirabilis* sont dépourvus de β -lactamase à l'état « sauvage » et sont naturellement sensibles aux aminopénicillines ,carboxypénicillines ,uréidopénicillines ,à l'aztréonam, aux céphalosporines et aux carbapénème.

E.coli et *Shigella spp.* sont naturellement sensibles aux aminopénicillines ,carboxypénicillines ,uréidopénicillines ,à l'aztréonam,aux céphalosporines et aux carbapénème.

Cependant, ces dernières produisent à très bas niveau une céphalosporinase chromosomique non inductible de type AmpC qui peut entraîner, chez certains souches, une réduction de la sensibilité aux

aminopénicillines, à leurs association au clavulanate et/ou céphalosporine de première génération. (Neuwirth et al,1995).

b)-Groupe 02 : Phénotype « pénicillinase bas niveau » : (Tableau. II)

Klebsiella pneumoniae, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter Koseri*, *Citrobacter amalonaticus* et *Escherichia hermani* produisent naturellement et de façon constitutive (non induite par les β -lactamines, excepté chez *Citrobacter amalonaticus*) des enzymes chromosomiques de classe A sensible aux inhibiteurs :

- Les enzymes de types SHV-1 pour *Klebsiella pneumoniae*.
- Les enzymes de type OXY pour *Klebsiella oxytoca*.
- Les enzymes CKO pour *Citrobacter Koseri*
- L'enzyme CdiA pour *Citrobacter amalonaticus*
- L'enzyme HER-1 pour *Escherichia hermani*

Elles confèrent une résistance patente aux aminopénicillines et aux carboxypénicillines et souvent inapparente aux uréidopénicillines.

Ce phénotype de résistance, appelé « pénicillinase de bas niveau », se caractérise par la persistance d'un diamètre d'inhibition autour des disques d'aminopénicillines (contrairement au phénotype « pénicillinase haut niveau ou pénicillinase acquise » caractérisé par l'absence de diamètre d'inhibition autour de ces disques). Les associations pénicillines-inhibiteurs sont actives. (Chanal .C et al, 2000).

c)-Groupe 03 : Phénotype « céphalosporinase de bas niveau » :(Tableau III)

Les entérobactéries appartenant à ce groupe réunissent des productrices de céphalosporinases de classe (AmpC) chromosomique et inductibles par les β -lactamines (molécules fortement inductrices :Céfoxitine, imipénème, Clavulanate). (Phillipone A., 2008)

Ces céphalosporinases sont très répandues chez les entérobactéries isolées en bactériologie clinique :*Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*,(et les autres espèces de ce genre) ,*Citrobacter freundii*, *MorganellaMorgani*,*Hafnia alvei*, *Providencia Stuartii* et *Pantoea agglomerans*).

Le phénotype sauvage de ces espèces, souvent appelé « céphalosporinase de bas niveau », comprend une résistance aux aminopénicillines, à leurs associations aux β -lactamines inhibitrices et aux C1G.

Le comportement vis-à-vis les céphalosporine du 2^{ème} génération et les céphamycines permet de répartir les espèces en trois sous groupes :

Les espèces sensibles aux cefuroxime et à la céfoxitine (céphamycine) : *Hafnia alvei*, *Providencia Stuartii*, *Pantoea agglomerans*.

Les espèces plus résistantes au céfuroxime qu'à la céfoxitine : *Serratia marcescens*, *Morganella morgani*.

Les espèces les plus résistantes au céfuroxime qu'à la céfoxitine : *Serratia marcescens* et *Morganella morgani*. (Phillipone A., 2008)

d)-Groupe 04 : phénotype « Penicillinase bas niveau+Céphalosporinase inductible » :

Yersinia enterocolitica et *Serratia fonticola* produisent naturellement, respectivement, une céphalosporinase inductible de classe C et une enzyme de classe A.

Chez *Yersinia enterocolitica* cette dernière est une pénicillinase constitutive de classe A produite à bas niveau et chez *Serratia fonticola*, l'enzyme de classe A est une β -lactamase inductible. (Tableau IV)

Yersinia enterocolitica est résistante aux aminopénicillines, à leur association avec le clavulanate, aux carboxypénicillines et aux C1G, la résistance aux uréïdopénicillines n'apparaît pas in vitro.

Le phénotype de résistance de *Serratia fonticola* est similaire, cependant, le cefuroxime n'est pas actif et la résistance à l'association aminopénicilline- β -lactamines inhibitrices, qui devrait normalement être induite par l'enzyme AmpC, ne s'exprime pas ou à très bas niveau in vitro. (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, 2006).

e)-Groupe 05 : phénotype « β -lactamase à spectre étendu chromosomique » : (Tableau V)

Les entérobactéries *Kluyvera ascorbata*, *Kluyvera cryocrescens* et *Erwinia* produisent naturellement des β -lactamases à spectre étendu de classe A. Ces BLSE, souvent exprimées à bas niveau, confèrent une diminution de sensibilité ou une résistance aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines, aux C1G et aux C2G, à l'exception des céphamycines.

La résistance aux uréïdopénicillines et aux C3G est souvent inapparente. Aucune règle de lecture interprétative n'a été proposée à ce jour pour ces espèces.

II.2.2. Résistance acquise ou phénotype « résistant » :

A la résistance naturelle aux β -lactamines peuvent s'ajouter un ou plusieurs mécanismes de résistance acquise. La résistance acquise par production de β -lactamase est le mécanisme prépondérant.

Cependant, la fréquence des autres mécanismes de résistance, souvent exprimé à bas niveau, pourrait être sous estimé faute d'études épidémiologiques.

a)-Phénotype « Pénicillinase de haut niveau » ou « Pénicillinase acquise » :

Le phénotype « pénicillinase de haut niveau » est d'expression variable selon la nature du promoteur des gènes de structure, le nombre de copie, des gènes et l'espèce bactérienne.

L'expression est souvent faible chez *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii* et *Providencia*.

Le phénotype de résistance se présente donc sous différentes formes qui évoluent entre deux extrêmes :

- Une activité pénicillinase faible responsable d'une résistance limitée aux aminopénicillines (le diamètre d'inhibition est généralement absent contrairement à ce qui est observé dans la résistance naturelle des espèces du groupe 2) et aux carboxypénicillines. La sensibilité aux uréidopénicillines et aux C1G apparaît peu ou pas affectée
- Une activité pénicillinase forte responsable d'une résistance aux aminopénicillines (le diamètre d'inhibition est généralement absent contrairement à ce qui est observé dans la résistance naturelle des espèces du groupe 02) et aux carboxypénicillines.
- La sensibilité aux uréidopénicillines et C1G apparaît peu ou pas affectée.
- En raison des enzymes impliquées dans ce phénomène, il est recommandé d'interpréter les résultats « sensible » en « intermédiaire » pour toutes les pénicillines si la production d'une pénicillinase est suspectée. (**Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, 2006**).
- **Interprétation :**
En raison des enzymes impliquées dans ce phénotype, il est recommandé d'interpréter les résultats « sensible » en « intermédiaire » pour toutes les pénicillines si la production d'une pénicillinase est suspectée.

b)-Phénotype « pénicillinase résistant aux inhibiteurs » :

Le phénotype « pénicillinase résistante aux inhibiteurs » a été initialement décrit chez *Escherichia coli* en 1991. Il comporte une résistance aux aminopénicillines, aux

carboxypénicillines et à moindre niveau, aux uréidopénicillines, comme dans le phénotype précédent.

Cependant, il s'en distingue par une résistance aux associations des aminopénicillines et des carboxypénicillines avec les β -lactamines inhibitrices alors que les C1G conservent généralement leur efficacité.

- **Interprétation :**

En cas d'expression faible comme certaines souches de *Proteus mirabilis*, les uréidopénicillines peuvent paraître efficaces. L'activité des enzymes mises en jeu fait subsister un doute sur l'efficacité réelle de ces molécules. Par ailleurs, l'étude de la cinétique bactéricide des associations pénicillines- β -lactamines inhibitrices montre parfois une bactériostase ou une faible décroissance de la population bactérienne suivie par une croissance après 6 h à 24 h d'incubation. Aussi il semble souhaitable de convertir les résultats « sensible » en « intermédiaire » pour les pénicillines et leurs associations aux β -lactamines inhibitrices. (Chanal.c et al, 2000).

c)-Phénotype « β -lactamase à spectre étendu » :

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

En règle générale, cette résistance est apparente pour au moins une de ces molécules, sauf quand l'expression est très faible comme parfois chez *Proteus mirabilis*.

La plupart des BLSE sont plus sensibles aux β -lactamines inhibitrices que les pénicillinases à large spectre TEM-1 et SHV-1. quelques BLSE comme les enzymes CMT (Complex mutant TEM), présentent cependant une sensibilité diminuée aux inhibiteurs. L'efficacité des associations pénicillines- β -lactamines inhibitrices n'est donc pas constante car dépendante du type enzymatique et de son niveau de production.

Cependant, la sensibilité aux β -lactamines inhibitrices reste généralement suffisante pour être à la base de la détection de ce phénotype qui repose sur la mise en évidence d'une image de synergie entre les inhibiteurs et les C3G et /ou les C4G et/ou l'aztréonam. Les carbapénèmes et les céphamycines ne sont généralement pas hydrolysés par les BLSE.

Toutes fois, une diminution de la sensibilité à ces molécules récemment été rapportée en Europe et au Japon chez *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*. Ces souches produisant des enzymes possédant une faible activité carbapénémase et et dérivées par mutation ponctuelle des BLSE de type GES (carbapénémase de classe A) (Arakawa.T et al, 2000).

- **Interprétation :**

Bien que conférant des CMI parfois très faible, les BLSE sont à l'origine de nombreux échecs thérapeutiques. A l'exception des associations aux β -lactamines inhibitrices, des céphamycines et des carbapénèmes inhibitrices, des céphamycines et des carbapénèmes, les β -lactamines ne doivent pas être rendues « sensible » mais « intermédiaire », si le test de synergie est positif pour au moins une C3G, C4G ou l'aztréonam (**National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004**).

d)-Phénotype « Céphalosporinase de haut niveau » :

Le phénotype « céphalosporinase de haut niveau » correspond à une résistance plus ou moins marquée aux pénicillines, aux C1G, aux C2G, à l'aztréonam et au moins une C3G. Le test de synergie est négatif entre les C3G, les C4G ou l'aztréonam et les β -lactamines inhibitrices.

Les céphamycines ne sont pas actives, exception faite vis-à-vis l'espèce *Hfnia alvei* et les C4G restent le plus souvent efficaces. La résistance aux C3G peut être totalement ou partiellement restaurée en présence de cloxacilline (50-300mg/l).

- **Interprétation :**

Si une entérobactérie est résistante à au moins une C3G et que le test de synergie est négatif, les C3G ne doivent pas être rendues « sensibles ».

Cette règle interprétative se limite actuellement aux seules souches du groupe 03 productrices d'une AmpC chromosomique et inductible. Cependant, la fréquence croissante de ce phénotype en dehors des espèces du groupe 03 pourrait amener à une extension de cette règle à l'ensemble des Entérobactériaceae. Cependant, il n'existe pas de consensus sur ce point actuellement). (**Phillippon.A.G et G.A.Jacoby, 2002**).

e)-Phénotype hyperoxy :

Des souches de *Klebsiella oxytoca* sont résistantes à haut niveau à l'ensemble des pénicillines, aux C1G, aux C2G à l'exception des céphamycines et à bas ou haut niveau à l'aztréonam.

Le test de synergie avec le clavulanate est positif avec l'aztréonam, variable avec le céfotaxime, rarement positif avec les C4G et ceftazidime. Le niveau de résistance, toujours plus élevé pour l'aztréonam que pour les C3G et les C4G, permet de différencier le phénotype « hyperoxy » du phénotype « BLSE »

- **Interprétation :**

Le résultat interprété de l'antibiogramme tient compte du test de synergie obtenu pour chaque C3G et C4G. Les C3G et C4G apparemment efficaces doivent être rendues « intermédiaire » si le test de synergie est positif pour la molécule concernée.

(Philippon.A.G et G.A.Jacoby,2002)

➤ **Phénotype Résistance aux carbapénèmes :**

De rares souches de *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* et *Serratia fonticola* produisent des carbapénémases de classe A chromosomiques et inductibles par les β -lactamines. Ces souches ont une sensibilité diminuée ou sont résistantes aux pénicillines, aux C1G, au C2G, à l'aztréonam et à l'imipénème.

Elles restent sensibles aux C3G et C4G. Les carbapénémases de classe A de type KPC et GES sont plus inquiétantes car codées par des plasmides qui ont permis leur diffusion chez de nombreuses espèces telles que *Klebsiella pneumoniae*, *klebsiella oxytoca*, *Enterobacter spp* .et *Salmonella enterica*. Elles peuvent conférer une résistance à l'ensemble des β -lactamines, y compris les céphmycines, les C3G, les C4G et les carbapénèmes. Bien que parfois réduite, leur sensibilité aux β -lactamines inhibitrices permet en général d'observer une image de synergie entre les disques contenant les clavulanates et de l'imipénème.

Pour être observée, la synergie peut nécessiter un rapprochement des disques ou l'utilisation de la technique des disques combinés.

Des carbapénémases plasmidiques de classe B ont été caractérisées chez les entérobactéries au Japon, et plus rarement en Europe. Ces enzymes toutes les β -lactamines à l'exception de l'aztréonam.(Nordman.P et L .Poirel ,2002).

✓ **Tableau 01 : Classification des carbapénémases :**

Classification d'Ambler	Types d'enzymes	Spectre d'activité	Germes
A type sérine	KPC	Toutes les β -lactamines	Entérobactéries <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
A type sérine	SME	Carbapénème et aztréonam mais pas C3G	Serratia marcescens
A type sérine	NMC-A,IMI	Carbapénème et aztréonam mais pas C3G	Enterobacter spp <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
B métallo-lactamase	GES	Imipénème et C3G	Entérobactéries

D type sérine	IMP,VIM	Toutes les β -lactamines sauf aztréonam	Entérobactéries <i>Acinetobacter</i> spp
D type sérine	OXA	Carbapénèmes(faible activité)	<i>Acinetobacter</i> spp Entérobactéries

(OMS, 2011)

II.2.3.Règles de lecture interprétative :

1/-Interpréter **Intermédiaire** les résultats **Sensible** (faible expression de la résistance naturelle) dans les cas suivants :

- *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter diversus* et *Escherichia hermannii*, sensible aux amino et/ou aux carboxy et/ou aux uréido-pénicillines.
- *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii* et *Hafnia alvei*, sensible aux amino-pénicillines et/ou aux céphalosporines de première génération et/ou à l'association amoxicilline + acide clavulanique et ampicilline + sulbactam.
- *Proteus vulgaris* et *Proteus penneri*, sensible aux amino-pénicillines et/ou aux céphalosporines de première génération. (Comité de L'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) Recommandations, 2010).

2- Interpréter **intermédiaire** un résultat **sensible** aux carboxy- et/ou aux uréido-pénicillines chez *Proteus mirabilis* résistant aux amino-pénicillines.

3/- Interpréter **intermédiaire** un résultat **sensible** aux uréido-pénicillines chez toute entérobactérie,intermédiaire ou résistant aux carboxy-pénicillines.

4/- Interpréter **intermédiaire** un résultat **sensible** à toutes les céphalosporines sauf céfépime et cefpirome si la souche est catégorisée intermédiaire ou résistant à céfotaxime et/ou ceftriaxone et/ou ceftazidime et/ou aztréonam en l'absence de synergie entre ces molécules et l'acide clavulanique .

Ce phénotype est évocateur d'une céphalosporinase chromosomique hyperproduite (entérobactérie du groupe3 et *Escherichia. coli*) ou d'une céphalosporinase plasmidique (toutes espèces d'entérobactéries).

La réalisation d'un antibiogramme standard sur gélose Mueller-Hinton additionnée de 250 mg/l de cloxacilline (inhibiteur de céphalosporinases) permet de vérifier que la résistance observée est bien liée à ce type de mécanisme (restauration de la sensibilité aux molécules précitées en l'absence de tout autre mécanisme de résistance aux β -lactamines) et de détecter une éventuelle

β -lactamase à spectre élargi associée qui aurait été masquée par une hyperproduction de céphalosporinase. (**Comité de L'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) Recommandations, 2010**).

5/- Interpréter **intermédiaire** un résultat **sensible** à toutes les céphalosporines sauf les céphamycines (céfoxitine et céfotétan) et à l'aztréonam en présence d'une synergie significative entre au moins l'une des céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) ou l'aztréonam et AMC. Ce phénotype est évocateur d'une β -lactamase à spectre élargi (BLSE).

Cette synergie significative (typiquement "en bouchon de champagne") est habituellement visible sur l'antibiogramme standard où les disques sont distants de 30 mm (centre à centre).

Toutefois, chez les souches résistantes à haut niveau aux β -lactamines (souches cumulant plusieurs mécanismes de résistance, dont l'hyperproduction de céphalosporinase), la détection d'une BLSE est facilitée par la recherche d'une synergie entre des disques de céfépime ou ceftazidime et d'AMC, que l'on peut rapprocher, et/ou la réalisation d'un antibiogramme standard (comprenant éventuellement des disques de C3G + AMC) sur gélose Mueller- Hinton additionnée de 250 mg/L de cloxacilline.

- Chez certaines espèces intrinsèquement très sensibles aux β -lactamines (*Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. penneri*, *P. stuartii* et *P. rettgeri*), les BLSE s'expriment à bas niveau. Leur détection est facilitée par la recherche d'une synergie entre les C3G ou l'aztréonam et AMC avec des disques placés à une distance de 40-45 mm.

Un test de synergie positif évoque une hyperproduction de la β -lactamase naturelle chromosomique et beaucoup plus rarement la présence d'une BLSE, surtout s'il n'y a pas de résistance acquise aux autres familles. (**Comité de L'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) Recommandations, 2010**).

La présence d'une BLSE peut être confirmée en quantifiant la synergie soit par un antibiogramme comportant des disques de céfotaxime, ceftazidime et céfépime simples et combinés à l'acide clavulanique, soit par la mesure de la CMI de ces molécules testées seules ou associées à l'acide clavulanique.

- Chez *Klebsiella oxytoca*, un test de synergie positif (image "en entonnoir") avec l'aztréonam et/ou la ceftriaxone, mais négatif avec la ceftazidime, évoque une hyperproduction de la β -lactamase naturelle chromosomique. Interpréter intermédiaire les seuls résultats sensibles associés à une synergie. (**Comité de L'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) Recommandations, 2010**).

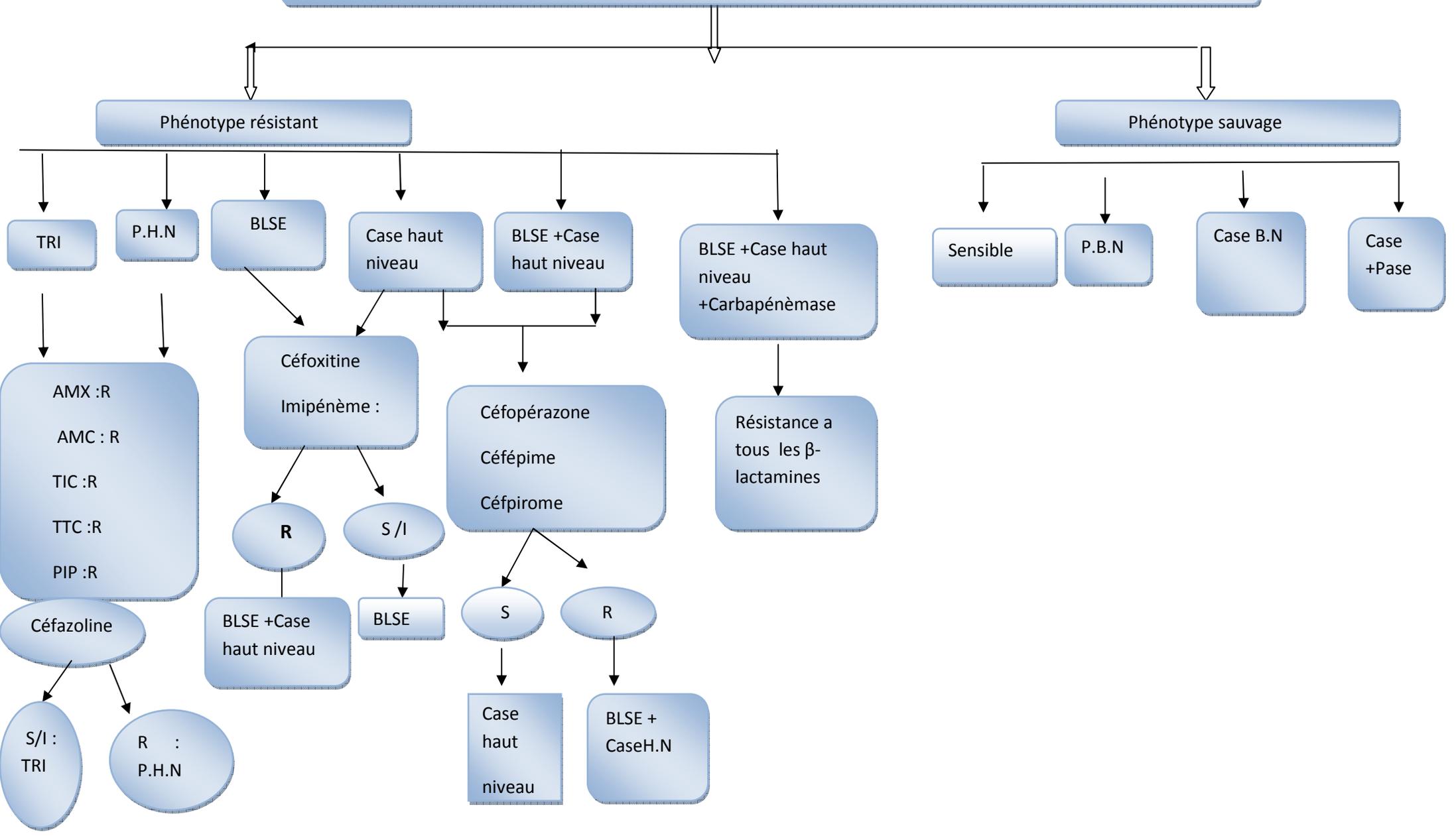
III.2.4. Concentration minimale inhibitrice :

➤ **Définition :**

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice : plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe toute culture visible d'une souche bactérienne après 18 heures de culture à 37°C. Cette valeur caractérise l'effet bactériostatique d'un antibiotique.

CMB : Concentration Minimale Bactéricide : Plus petite concentration d'antibiotique ne laissant subsister 0,01% ou moins de survivants de l'inoculum initial après 18 heures de culture à 37°C. Cette valeur caractérise l'effet bactéricide d'un antibiotique. (**Craig, W.A, 1998**)

Un algorithme approximatif pour le Phénotype de résistance chez les Entérobactéries



Groupe 01

Phénotype sauvage

« Sensible à tout » (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonelle*)
ou « Céphalosporinasedetrès bas niveau » (*Escherichia coli*, *Shigella*)

Tableau I : Interprétation des phénotypes du groupe 01

Antibiotiques	Sauvage	Phénotype résistant						
		Pase (bas niveau)	Pase (haut niveau)	Case (bas niveau)	Case (haut niveau)	Case+Pase	BLSE	TRI
Amoxicilline	S/I	R	R	I/R	R	R	R	R
Amoxicilline+acide Clavulanique	S/I	S/I/R	S/I/R	I/R	R	R	I/R	I/R
Ticarcilline+Ac	S	S / I / R	S/I/R	S	I/R	R	R	I/R
Pipéracilline+Tazobactam	S	S/I	S/I/R	I/R	R	R	R	R
Ticarcilline	S	R	R	S	I/R	R	R	R
Pipéracilline	S	I/R	R	S	I/R	R	R	R
Céfazoline	S	S	S/I/R	I/R	R	R	R	S
Céfoxitine	S	S	S	S	R	R	S	S
Céfotaxime	S	S	S	S	R	R	R	S
Céftazidime	S	S	S	S	I/R	I/R	I/R	S
Céfipérazone	S	S	S	S	S	S	I/R	S
Céfprome	S	S	S	S	S	S	I/R	S
Aztréonam	S	S	S	S	I/R	I/R	I/R	S
Imipénème	S	S	S	S	S	S	S	S

(Comité de l'Antibiogramme de la société Française de Microbiologie, 2006)

Groupe 02**Phénotype sauvage : Pénicillinase bas niveau****Principales espèces : *Klebsiella pneumoniae*,***Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter koseri*,**Tableau II : Interprétation des phénotypes du groupe 02 :**

Antibiotiques	Sauvage (Pase, bas niveau)	Phénotype résistance acquise				
		Pase de haut niveau)	Case de haut niveau	BLSE	TRI	K.oxytoca Hyperproduction De β -lactamase chromosomique
Amoxicilline	R	R	R	R	R	R
Amoxicilline+Ac	S	R	S/I/R	R	R	I/R
Ticarcilline	R	R	R	R	R	R
Pipéracilline	I/R	R	R	R	R	R
Ticarcillie +Ac	S	S/I/R	S/I/R	R	R	I/R
Pipéracilline+ Tazobactam	S	S/I	S/I/R	I/R	I/R	S/I
Céfazoline	S	S/I/R	R	R	S	R
Céfoxitine	S	S	S	S	S	S
Céfotaxime	S	S	I/R	R	S	I
Céftazidime	S	S	I/R	R	S	S
Céfopérazone	S	S	I/R	R	S	S
Céfprome	S	S	S	I/R	S	S
Aztréonam	S	S	I/R	R	S	R
Imipénème	S	S	S	S	S	S

(Comité de l'Antibiogramme de la société Française de Microbiologie, 2006)

Groupe 03

Phénotype sauvage : Production naturelle des céphalosporinase

Principales espèces : *Enterobacter spp* , *Citrobacter freundii* , *Serratia spp*

Morganella morganii , *Providencia spp* , *Hafnei alvei*

Tableau III : Interprétation des phénotypes du groupe 03

Antibiotiques	sauvage	Phénotype résistant			
		Pase haut niveau	Case hyper produite	BLSE	Case+BLSE
Amoxicilline	R	R	R	R	R
Amoxicilline+Acide clavulanique	R	R	IR	R	R
Ticarcilline	S	R	R	R	R
Pipéracilline	S	R	R	R	R
Ticarcilline+Acide clavulanique	S	SI	I/R	I/R	I/R
Pipéracilline+Tazobactam	S	S/I	I/R	I/R	I/R
Céfazoline	R	R	R	R	R
Céfoxitine	S/I/R	S/I/R	R	S/I/R	I/R
Céfotaxime	S	S	I/R	R	R
Ceftazidime	S	S	I/R	R	R
Céfopérazone	S	S	S	R	I/R
Cefpirome	S	S	S	I/R	R
Aztréonam	S	S	I/R	R	R
Imipénème	S	S	S	S	R

(Comité de l'Antibiogramme de la société Française de Microbiologie, 2006)

Groupe 04**Phénotype sauvage : Céphalosporinase inductible + Pénicillinase bas niveau****Principales espèces : *Yersinia enterocolitica*, *Serratia fonticola***Tableau IV : **Interprétation des phénotypes du groupe 04**

Antibiotiques	Sauvage	Phénotype résistant
		BLSE
Amoxicilline	R	R
Amoxicilline+Acide clavulanique	R	R
Ticarcilline	R	R
Pipéracilline	R	R
Ticarcilline+Acide clavulanique	I/R	R
Pipéracilline+Tazobactam	I/R	R
Céfazoline	R	R
Céfoxitine	S	R
Céfotaxime	S	R
Ceftazidime	S	R
Céfopérazone	S	S
Cefpirome	S	S
Aztréonam	S	S
Imipénème	S	S

(Comité de l'Antibiogramme de la société Française de Microbiologie, 2006)

Groupe 05

Phénotype sauvage : β -lactamase à spectre étendu chromosomique

Principales espèces : *Kluyvera ascorbata*, *Kluyvera cryocrescens*,

Citrobacter sedlakii, *Erwinia persicina*

Tableau V : Interprétation des phénotypes du groupe 05 :

Antibiotiques	Phénotype sauvage	Phénotype résistant	
		Pénicillinase chromosomique	BLSE
Amoxicilline	R	R	R
Amoxicilline+Acide clavulanique	S	R	R
Ticarcilline	R	R	R
Pipéracilline	S	R	R
Ticarcilline+Acide clavulanique	S	I/R	R
Pipéracilline+Tazobactam	S	I/R	R
Céfazoline	I/R	R	R
Céfoxitine	S	S	S
Céfotaxime	S	R	R
Céftazidime	S	S	R
Céfopérazone		S	R
Cefpirome	S	S	I/R
Aztréonam	S	S	I/R
Imipénème	S	S	R

(Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie,2006)

Site du travail

Ce travail a été réalisé au laboratoire d'analyses de biologie médicale du Dr OULD ROUIS à Blida, au niveau de l'unité de bactériologie, sur une période s'étalant de 1 avril au 30 novembre 2013.

Les objectifs de ce travail est l'étude de la résistance aux β -lactamines des Entérobactéries à travers une approche phénotypique.

L'ECBU des urines étant le prélèvement le plus demandé au laboratoire et au niveau du quelles nous isolons le plus d'Entérobactéries, notre choix c'est naturellement porté sur ce type de prélèvement.

I.MATERIEL :

I.1.MATERIEL BIOLOGIQUE :

Les prélèvements étudiés sont les urines au niveau desquelles nous avons effectué l'isolement, l'identification et l'antibiogramme des bactéries responsables d'infection urinaire.

Pour ce travail, seules les Entérobactéries ont été prises en considération.

I.2. MATERIEL NON BIOLOGIQUE :

Ce matériel est représenté par : les appareillages, la verrerie et autres matériels, les milieux de cultures, les réactifs et les antibiotiques en disques ou injectables.

II-M ETHODES :

II-1/ Prélèvement :

Objectif : Obtenir un prélèvement de bonne qualité.

- Il est impératif d'avoir un prélèvement de bonne qualité afin que l'analyse soit performante d'où la nécessité d'obtenir les premières urines du matin ou, à défaut des urines ayant stagné au moins trois heures dans la vessie.
- Le premier jet urinaire est éliminé et les 20 à 50ml suivant seront recueillies dans un récipient stérile.
- Le prélèvement doit être effectué avant la mise en route d'une antibiothérapie.(sauf demande expresse du prescripteur :(mesure de l'efficacité du traitement)
- Il doit être accompagné d'une fiche de renseignements cliniques comportant :
 - Nom, Prénom sexe et âge du malade, signes cliniques (brûlures mictionnelles, fièvre).
 - Le traitement déjà administré et sa durée.

II.2. Différentes méthodes de prélèvement :

a)- Chez les malades non sondés :

- **Chez l'homme :**

Le patient doit, au réveil se désinfecter le méat urinaire à l'eau et au savon, bien rincer puis recueillir les urines dans le récipient stérile après élimination du premier jet.

- **Chez la femme :**

Après lavage hygiénique des mains et toilette soignée au savon de la région vulvaire suivi d'un rinçage, écarter les plis vulvaires d'une main et de l'autre rejeter les premiers ml d'urine et recueillir les 10ml dans le flacon stérile.

- **Chez le nourrisson :**

Placer une poche stérile adhésive après toilette soignée des organes génitaux et du périnée et maintenir en place au maximum 30min. Retirer la poche dès que l'enfant a uriné.

- **Chez les malades sondés :**

De préférence faire le prélèvement le jour de la pose de la nouvelle sonde. Après clampage et désinfection de la sonde, on prélève l'urine par ponction à l'aide d'une seringue stérile.

b)- Ponction sus-pubienne :

L'urine vésicale normalement stérile, ce type de prélèvement est exceptionnellement effectué lorsque le patient ne peut pas uriner.

II. 3. Traitement des prélèvements :

Il faut toujours préférer réaliser le prélèvement au laboratoire. Dans le cas contraire, les urines doivent arriver au laboratoire en moins de deux heures avec un transport à + 4 °C, et stockées à +4°C le temps de les traiter.

Chaque prélèvement d'urines doit être accompagné de la fiche de renseignements. Ces renseignements sont indispensables car ils permettront au microbiologiste d'optimiser l'ECBU et son interprétation. Ils concernent l'âge et le sexe du patient, le mode et l'heure du prélèvement, les motifs de la demande, les antécédents de l'infection urinaire, la notion de maladie concomitante et le traitement éventuellement déjà institué.

II.4. Examen cyto bactériologique des urines « ECBU » :

L'ECBU permet de diagnostiquer une infection urinaire et d'isoler ainsi le germe en cause afin de guider le médecin dans son diagnostic et sa prescription antibiotique selon le résultat de l'antibiogramme. Cette étude comprend une étude macroscopique, une étude microscopique et une mise en culture afin de rechercher, de dénombrer et d'identifier l'agent causal.

II.4.1. Examen macroscopique :

C'est l'observation (après homogénéisation) de l'aspect et de la couleur à l'œil nu ainsi que l'odeur des urines. La caractérisation des urines se fait selon le **tableau**

Tableau 04: Les caractères macroscopiques des urines.

	Urine normale	Urine pathologique
Couleur	Jaune ambrée	-Rouge : hématurie, pigment alimentaire, médicamenteux -Verdâtre : pigment biliaire -Jaune orangé
Aspect	Clair transparent	-Trouble : cristaux -Purulent : leucocytes
Odeur	Pas ou peu d'odeur	-Ammoniacale : fermentation de l'urée → présence de bactéries -Autre : acétonique, fétide

(Carbannelle et al., 1988)

II.4.2. Examen microscopique :

Il doit être effectué dans les deux heures qui suivent le prélèvement afin de limiter l'altération des éléments cellulaires.

II.4.2.1. Examen à l'état frais :

C'est un examen qui se fait entre lame et lamelle, ou mieux encore sur cellules hématimétriques (Nageotte ou Malassez).

Il présente de ce fait un double intérêt :

Quantitatif : Numération des éléments cellulaires (uniquement les cellules hématimétriques)

Qualitatif : Description des différents éléments cellulaires

a)-Examen de l'urine entière sur cellule à numération :

➤ Cellule de Malassez :

Elle permet la numération des leucocytes par mm^3 . La cellule de Malassez (de profondeur 0.2 mm) est constituée de 10 bandes verticales de 0.25 mm de large et de 10 bandes horizontales, de 0.20 mm de large formant 100 rectangles. (**Figure 02**)

➤ Cellule de Nageotte :

La cellule de Nageotte a une dimension de 10mm de largeur sur 10mm de longueur avec une profondeur de 0.5mm et un volume total correspondant à 50mm^3 .

Les cellules hématimétriques permettent de dénombrer :

- **Les leucocytes :(polynucléaires, lymphocytes) :**

Lorsqu'ils sont intacts, ils se présentent comme des disques granuleux à l'intérieur desquels le noyau apparaît plus réfringent ; lorsqu'ils sont altérés, les leucocytes ont des contours irréguliers, fripés. La présence de leucocytes dans les urines signe l'existence d'une réaction inflammatoire.

Cependant de véritables réactions inflammatoires peuvent ne pas s'accompagner d'une leucocyturie élevée (foyer inflammatoire bien circonscrit, dilution des urines, lyse des leucocytes dans l'échantillon), la présence de leucocytes en amas témoigne de l'ouverture d'un foyer inflammatoire (micro-abcès).

L'altération des leucocytes peut être liée à de mauvaises conditions des conservations du prélèvement avant son examen.

- **Les cylindres :**

Sont des éléments de grande taille épousant la forme d'une partie du tubule rénal. Ils sont repérés à partir d'un examen entre lame et lamelle de l'urine totale à l'objectif x 10.

- **Les cristaux urinaires :**

L'urine contient des substances peu solubles qui s'y trouvent pratiquement à l'état de solution saturée. Dans le cas d'une excrétion accrue de ces substances, celles-ci peuvent précipiter sous forme cristalline et on les retrouve dans l'urine.

Les cristaux observés peuvent correspondre à un constituant normal de l'urine ou bien à un métabolite anormal dont elle est physiologiquement dépourvue. Certains cristaux sont retrouvés exclusivement dans une urine acide et d'autres dans une urine alcaline.

La cristallisation dépend aussi de la température, une urine limpide après miction peut devenir trouble par précipitation de cristaux après refroidissement de l'urine.

La cristallisation peut induire en erreur le médecin en faisant penser à une pyurie.

- **Les bactéries :**

A l'état frais on peut apprécier la présence éventuelle de bactéries, leur forme (cocci ou bacilles) et leur mobilité.

- **Les parasites :**

-*Trichomonas vaginalis* : parasite protozoaire globuleux, d'un diamètre de 15 µm en moyenne, mobile dans les urines fraîches ou il se déplace en tourbillonnant grâce à une membrane ondulante et quatre flagelles, il témoigne d'une contamination génitale.

- Oeufs de *Schistosoma haematobium* : (Agent de la bilharziose urinaire)

- **Levures** : Elles présentent à l'état frais une forme sphérique ou ovalaire, de taille variable (5 à 12 µm). Certaines montrent un bourgeonnement à l'un de leur pôle.
- **Spermatozoïdes** : Peuvent être observés dans les urines fraîches. Mobiles, ils sont constitués d'une très petite tête (5 µm) prolongée d'un long flagelle souple de 50 µm.
Leur présence affirme une contamination urétrale ou encore une éjaculation rétrograde.
(A.Benslimani, K.Rahal, 2001)

b)-Examen direct après coloration simple:

L'examen microscopique d'un frottis après coloration au bleu de méthylène ou à la coloration de Gram permet d'observer les micro-organismes présents et de s'orienter éventuellement sur le choix des milieux de culture à utiliser.

❖ Coloration au bleu de méthylène :

🚦 Principe :

La coloration au bleu de méthylène permet l'étude des éléments cellulaires et des bactéries : Elle évalue la qualité et l'état de leucocytes, et précise le type morphologique des bactéries. Les levures sont bien appréciées au bleu de méthylène.

🚦 Technique :

- Déposer une goutte d'urine sur une lame,
- laisser sécher et fixer soit à la flamme du bec bunsen ou par l'alcool (recouvrir la lame à l'alcool, rejeter l'alcool, flamber)
- inonder la lame avec du bleu de méthylène,
- laisser agir 30sec à 1min. Après cela, rincer à l'eau du robinet, laisser sécher (faire passer au dessus de la flamme du bec bunsen en tenant la lame avec les doigts).

🚦 Lecture :

Elle se fait au microscope optique (G×100) avec une goutte d'huile à immersion déposée sur le frottis.

❖ Coloration de Gram :

🚦 Principe :

Cette technique permet de mettre en évidence des différences de structure de la paroi des bactéries corrélées à des différences de sensibilité aux antibiotiques : la coloration de Gram, associée à l'analyse de la forme des bactéries et à l'arrangement spécifique de celles-ci, permet de préjuger de l'identité d'un germe et d'orienter le choix du traitement antibiotique.

✚ Technique

- Déposer une goutte d'urine sur une lame, laisser sécher, et fixer à la flamme du bec bunsen.
- Recouvrir le frottis par le violet de gentiane, laisse agir 1min puis rincer à l'eau.
- Verser du lugol sur une lame et laisser agir 2minutes puis rincer à l'eau.
- Décolorer la lame avec l'alcool 90°C pendant quelques secondes et rincer immédiatement à l'eau
- Recoloration à la fucshine basique pendant 1min.
- Rincer la lame à l'eau.
- Sécher la lame et examiner au microscope à l'objectif X100 avec une goutte d'huile à immersion.

✚ Lecture

Les bactéries colorées en **violet** sont des bactéries à **Gram positif**

Les bactéries colorées en **rose** sont des bactéries à **Gram négatif**

II.4.2.2. Examen bactériologique « Uroculture »

Permet l'isolement et le dénombrement des germes responsables de l'infection urinaire, elle est donc qualitative et quantitative.

a)-Choix des milieux de culture :

✓ Milieu pour numération bactérienne : (Milieu non chromogènes)

Les milieux utilisés doivent permettre une numération des bactéries les plus fréquemment rencontrées, c'est à dire les entérobactéries, les *Pseudomonas*, les *Staphylocoques* et les *Entérocoques* qui sont toutes des bactéries peu exigeantes et à culture rapide.

En routine, on utilise une gélose nutritive (GN) et le milieu Cysteine Lactose Electrolytes Déficiant (CLED) pour cultiver les bactéries .

✓ Milieu d'isolement :

On utilise pour l'isolement des bactéries peu exigeantes, des milieux sélectifs tels que :

- Le milieu de Mac Conkey qui permet d'inhiber les bactéries à Gram+ et le développement en nappe du *Proteus*.
- Le milieu Hektoen: est un milieu sélectif permettant l'isolement des entérobactéries pathogènes et de certains bacilles à gram négatif non entérobactéries (*Pseudomonas*, *Acinétobacter*, *Aéromonas*.....)
- Si on suspecte des bactéries à croissance difficile, d'autres milieux de culture devront être utilisés : gélose au sang frais ou cuit afin d'isoler des Streptocoques ou des *Haemophilus*.

❖ Milieux chromogènes :

✚ Principe :

Le milieu chromogène est un milieu très pratique pour reconnaître facilement et rapidement le germe ou les germes responsables de l'infection retrouvée, car avec son pouvoir de faire pousser des colonies très diverses avec aspects et couleurs particulières qui permettent de différencier les espèces bactériennes à l'œil nu et sans avoir besoin d'une identification biochimique. (**Figure 03**)

b)-Méthodes utilisées :

❖ Méthode à l'anse calibrée :

✚ Principe :

- Bien sécher les boîtes de Pétri qui contiennent le milieu de culture.
- Commencer par homogénéiser le prélèvement par agitation.
- A l'aide d'une anse de platine calibrée (10 μ l) stérilisée (ou d'une anse en plastique jetable, stérile), prendre une goutte d'urine pure et la décharger en appuyant la boucle sur le haut de la gélose.
- Tirer de ce point une verticale jusqu'au bas de la boîte.
- Faites des stries serrées perpendiculaire à la strie centrale en commençant par le haut de la boîte sur toute la surface de la gélose.
- Avant de faire les stries, il est nécessaire de flamber l'anse de platine.
- Sans recharger l'anse, faire des stries perpendiculaires serrées en partant du point de dépôt puis des stries plus larges à partir du milieu de la gélose pour avoir un bon isolement des colonies.

✚ Incubation :

Mise à l'étuve des boîtes à 37°C pendant 24 heures.

✚ Lecture :

Après 18 heures à 37 °C, chaque bactérie ou amas de bactéries présent dans l'urine donne naissance à une colonie visible à l'œil nu.

L'absence de culture (lorsque des bactéries ont été vues à l'examen direct, chez des malades non traités par un antibiotique) doit faire conduire à relancer l'ECBU sur des milieux plus riches à la recherche de bactéries exigeantes (gélose au sang frais ou au sang cuit :chocolat)et incubé en atmosphère contenant 10% de CO₂).

❖ Méthode de référence : Méthode de KASS :

✚ Principe :

0.1 ml d'urine bien mélangée est diluée dans 9.9 ml (dilution au un $1/100^{\text{ème}}$) d'eau distillée stérile à l'aide d'une pipette calibrée à 0.1 ml ; puis 0.1 ml de cette dilution est ensuite aussitôt étalée sur une gélose nutritive avec un râteau stérile. L'interprétation se fait selon la formule de Kass :

n : Nombre de colonies sur la boîte

Résultat = n. 1000 (facteur de dilution (100+10))

✚ Interprétation :

Chaque colonie qui pousse à partir de l'urine diluée correspond à 1000UFC dans 01 ml d'échantillon. Une bactériurie significative est considérée devant une numération > 100 colonies sur gélose nutritive ce qui correspond à $> 10^5$ UFC/ml.

II.4.2.3. Interprétation de la bactériurie :

Après la numération de l'urine, il faudra interpréter les résultats pour juger de la présence ou l'absence d'infection urinaire, pour cela il va falloir se référer aux critères de KASS :

- ❖ Une bactériurie inférieure à 10^3 , veut dire absence d'infection urinaire.
- ❖ Une bactériurie entre 10^3 et 10^5 , signifie un résultat incertain qui demande un contrôle.
- ❖ Une bactériurie supérieure à 10^5 , objective la présence d'infection urinaire.

L'interprétation doit, cependant, impérativement tenir compte de l'absence ou de la présence d'une leucocyturie chiffrée).

Tableau 05 : Interprétation des résultats de l'ECBU

Leucocyturie	Bactériurie	Interprétation
$1/\text{mm}^3$ à $18/\text{mm}^3$	$<10^3$	Absence d'infection urinaire
$1/\text{mm}^3$ à $18/\text{mm}^3$	$>10^5$	Culture positive
$18/\text{mm}^3$ à $22/\text{mm}^3$	$<10^3$	Culture négative
$18/\text{mm}^3$ à $22/\text{mm}^3$	$>10^5$	Culture positive
$23/\text{mm}^3$	$<10^3$	Leucocyturie sans bactériurie
$23/\text{mm}^3$	$>10^5$	Infection urinaire certaine
	$\geq 10^5$ 2 à 3 types de bactéries	Flore bactérienne polymorphe (contamination)

(H. Darbas et al, 2006)

Remarque :

En réalité, l'interprétation se fait au cas par cas et tient compte de la leucocyturie et de la clinique, car les critères de KASS sont souvent remis en question.

II .4.4. Identification et tests d'orientation :

II.4.4.1. Test d'orientation : un seul test a été utilisé

❖ Test de l'oxydase :

✚ Principe :

Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram négatif, il permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé.

Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N- diméthyl -paraphénylène diamine.

Ce réactif est incolore et en présence de l'enzyme, il libère un composé rose-rouge, noircissant à l'air

Réactif incolore → composé rosé grâce au phénylène diamine oxydase

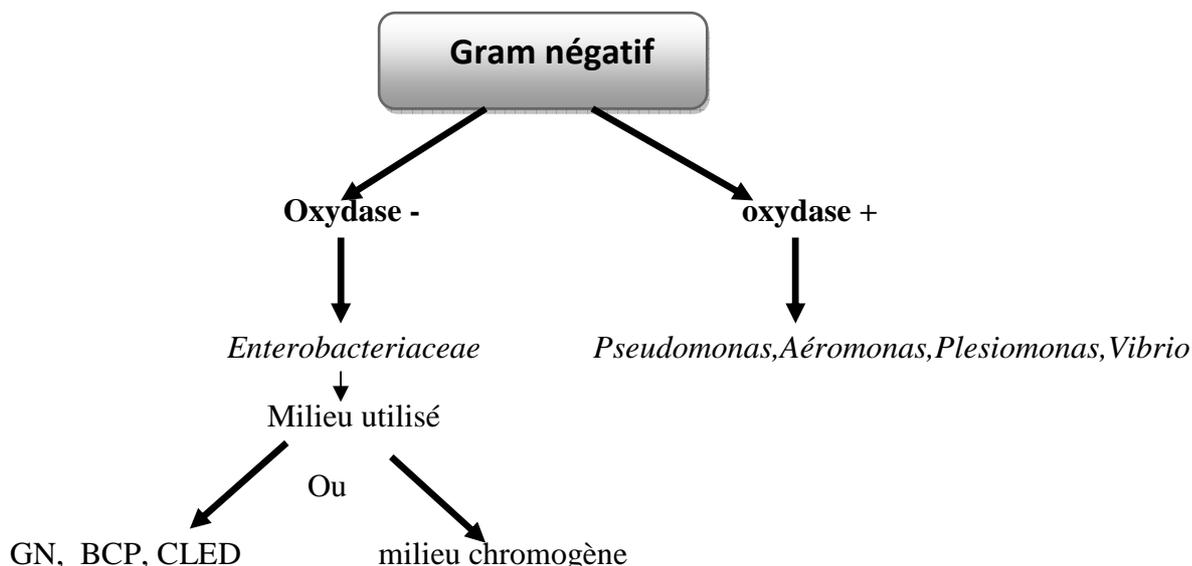
✚ Mode opératoire :

- Humidifier le disque d'oxydase
- Prélever une colonie bactérienne et la déposer sur un disque d'oxydase (papier buvard imbibé de 1% d'oxalate de N-méthyle para -phénylène diamine).

✚ Lecture :

Les colonies qui possèdent une oxydase(+), donnent une coloration violette foncée puis noire → exemple *Pseudomonas*.

Les colonies oxydase (-) ne changent pas de coloration → exemple : *Entérobactéries*



❖ Identification biochimique des bactéries à Gram négatif :

L'identification biochimique des Entérobactéries est réalisée par l'utilisation de la galerie API 20 E commercialisée qui permet l'identification biochimique des Entérobactéries et autres bactéries à croissance facile (exemple : *Acinetobacter*, *Pseudomonas*).

La galerie Api 20 E comporte vingt (20) microtubules, contenant des substrats déshydratés correspondant à vingt caractères biochimiques.

➤ Galerie API 20 E :

L'API est un système standardisé pour l'identification des bactéries selon les caractères biochimiques.

🚩 Principe :

La galerie API comporte 20 micro tubes contenant des substrats déshydratés. Les micro tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux déshydratés. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou après l'addition de réactifs .La lecture de ces réactions se fait d'abord à l'œil nu.

Il est possible d'utiliser le catalogue d'identification ou le logiciel d'aide de diagnostic .



Figure 04 :La galerie API 20 E

Cupule

micro tube contenant le milieu déshydraté

❖ Mode opératoire :

• Préparation de la galerie :

-Répartir environ 5ml d'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.

-Déposer la galerie dans la boîte d'incubation

• Préparation de la suspension bactérienne :

A l'aide d'une pipette pasteur stérile deux à quatre colonies identiques de la souche à étudier sont prélevées et introduites dans un tube contenant 10ml d'eau stérile.

Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 MF ou à une densité optique de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm.

- **Ensemencement de la galerie API 20 E :**

Les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL sont remplis avec la suspension bactérienne.

Pour les autres tests on remplit uniquement le tube.

Les cupules des tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S sont couvertes d'huile de vaseline afin de créer une anaérobiose.

- **Incubation :**

La boîte d'incubation est fermée puis placée dans l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures.

- **Identification de la souche**

- ✓ **Lecture de la galerie API 20 E :(Annexe III).**

La lecture de la galerie, doit se faire en se référant au tableau de lecture (tableau : annexe).

On code l'ensemble des réactions en un profil numérique de sept chiffres qui nous permet d'identifier la bactérie.

-

-Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

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

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

On Note sur la fiche de résultats toutes les réactions positives et négatives.

Il existe un logiciel pour la lecture des API System (Biomérieux) en fonction des caractères révélés par la galerie biochimique, ceci constitue un gain de temps pour l'interprétation des galeries API.

Cependant la lecture par cet automate peut poser quelques problèmes lors de la révélation tardive de quelques caractères biochimiques.

Un effort d'identification par le biologiste est hautement souhaitable afin de ne pas tomber dans la facilité, en utilisant le logiciel d'identification. Il bon d'avoir en tête un algorithme d'identification

II.6. Contrôle de qualité :

II.6.1. Objectifs :

- Le contrôle de qualité a pour but de vérifier:
 - La précision et la fiabilité de la technique des tests de sensibilité.
 - La performance des réactifs utilisés dans les tests
 - La performance du personnel qui effectue les tests et la lecture.
- Afin de se conformer à ces exigences, plusieurs souches de référence peuvent être utilisées:
 - Escherichia coli* **ATCC 25922** (Figure 05)
 - Escherichia coli* **ATCC 35218**
 - Klebsiella pneumoniae* **ATCC 700603**
 - Pseudomonas aeruginosa* **ATCC 27853**
 - Staphylococcus aureus* **ATCC 25923**
 - Staphylococcus aureus* **ATCC 43300**
 - Staphylococcus aureus* **ATCC 43866**
 - Staphylococcus aureus* **ATCC 29213**
 - Enterococcus faecalis* **ATCC 29212**
 - Haemophilus influenzae* **ATCC 49247**
 - Streptococcus pneumoniae* **ATCC 49619**

Ces souches sont gracieusement mises à notre disposition par le laboratoire d'antibiothérapie de l'Institut Pasteur d'Algérie (service du Pr Rahal).

III.6.2. Procédure de contrôle:

Le contrôle de qualité doit se faire à chaque nouveau lot de Muller Hinton et ou d'antibiotiques. Ce travail de contrôle doit être permanent. Il est conseillé de désigner dans chaque laboratoire une personne chargée de la supervision du contrôle de qualité.

Les souches de référence devant être obligatoirement testées sont:

- *Escherichia. coli* **ATCC 25922**
- *Staphylococcus . aureus* **ATCC 25923**
- *Pseudomonas. aeruginosa* **ATCC 27853**
- *Klebsiella. pneumoniae* **ATCC 49619**
- *Haemophilus. influenzae* **ATCC 49247**

Une fois par semaine, ces souches de seront testées dans les mêmes conditions opératoires que celles décrites pour les bactéries isolées.

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

Faire une analyse mensuelle, de l'ensemble des tests de contrôle de qualité, par molécule et par technicien.

Si les résultats ne sont pas satisfaisants, il faudra contrôler chacun des paramètres suivants :

- ✚ La lecture et l'interprétation des diamètres des zones d'inhibition
- ✚ Le milieu de culture
- ✚ L'inoculum
- ✚ Les disques d'antibiotiques
- ✚ Les souches de référence.

Remarque : Le contrôle de qualité doit être pratiqué par tous les techniciens et jamais par un seul.

a)- Lecture et interprétation :

- La lecture de l'antibiogramme doit se faire à l'aide d'un pied à coulisse. Elle doit être précise
- Pour éviter au maximum les erreurs de lecture en maintient l'instrument de mesure perpendiculairement à la boîte.
- La lecture se fait à l'extérieur de la boîte sans enlever le couvercle.
- Il faut vérifier que les interprétations (S, I, R) correspondent bien aux diamètres mesurés.
- Les mesures des diamètres d'inhibition seront soigneusement prises, et comparées aux valeurs critiques figurant dans le **tableau de lecture n°=07 (Annexe III)**
- Il faut éviter les confusions entre les différents tableaux de lecture.
- Les deux causes principales d'erreur sont un mauvais ensemencement (stries non serrées) et une mauvaise mesure des diamètres.

b)-Contrôle du milieu :

✓ **pH :**

Doit être de 7.2 à 7.4. Il faut le contrôler pour chaque nouveau lot de MH, à l'aide d'un pH mètre.

Remarque :

Si le pH est <7.2, certains antibiotiques perdent leurs activités tels que les aminosides.

Par contre, d'autres antibiotiques ont une activité augmentée comme par exemple les cyclines.

Si le pH est >7.4 des effets contraires peuvent être observés.

✓ Humidité :

Les boîtes doivent être convenablement séchées avant l'ensemencement.

c)-Contrôle de l'inoculum :

Si l'inoculum n'est pas une culture pure ou s'il contient une concentration de bactéries qui n'est pas identique au standard de Mc Ferland (il doit avoir une D.O de 0,08 à 0,10 lue à 625nm), les résultats du test de sensibilité seront affectés. Par exemple, un organisme résistant pourra apparaître sensible si l'inoculum est trop léger.

d)-Disques d'antibiotiques :

- Avant d'utiliser toute cartouche d'antibiotique, il faut vérifier la date de péremption, surtout pour les β -lactamines, ainsi que la charge des disques.
- Le stock de cartouches d'antibiotiques doit être conservé, à -20°C , les cartouches dans leurs étuis correctement rebouchés. Les applicateurs, munis de cartouches d'antibiotiques sont conservés à $+4^{\circ}\text{C}$.
- Tout disque mouillé, ou ayant été directement au contact de la glace, ou bien encore conservé à température ambiante ne devrait pas être utilisé.
- Les cartouches doivent être retirées du congélateur 1 à 2 heures avant leur utilisation.

e)-Conservations des Souches de référence :

Pour éviter une dérive génétique de la souche de référence, il est recommandé d'effectuer le contrôle de qualité à partir d'un échantillon initial et non d'un échantillon issu de repiquages successifs. Pour ce faire, il est utile de conserver (congeler) un nombre suffisant d'échantillons initiaux en rapport avec la fréquence du contrôle interne.

Ainsi, à leur réception, les souches de références lyophilisées sont ré-isolées sur gélose nutritive après culture en bouillon. La pureté, l'identification et l'antibiogramme sont contrôlés pour vérifier la conformité. (King A et D.F.Brown ,2001).

II.7.Antibiogramme :**✚ Principe**

L'antibiogramme est le test de sensibilité aux antibiotiques par la technique de diffusion en milieu gélosé. Ce test de réalisation assez simple mais délicat a fait l'objet d'une étude dirigée par l'OMS dans le but d'élaborer des règles de standardisation de l'antibiogramme. Cette méthode est préconisée par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) et est recommandée par l'OMS.

✚ Milieu de culture

Entérobactéries: gélose Muller-Hinton coulé en boîtes de pétri sur une épaisseur de 4mm. Les géloses doivent être séchées avant l'emploi.

Mode opératoire :**✓ Préparation de l'inoculum :**

- A partir d'une culture pure de 18 à 24 heures sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger l'anse dans 5 à 10ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 MF ou à une densité optique de 0,08 à 0,10 lue à 625nm
- L'utilisation d'un densitomètre ou un spectrophotomètre est fortement souhaitable.
- L'inoculum bactérien doit être ensemencé dans les 15 minutes qui suivent sa préparation.
- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, soit de l'eau physiologique stérile s'il est trop dense.

✓ Ensemencement :

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en tournant la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération deux 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 on ensemence plusieurs boîtes de pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

✓ Application des Disques D'antibiotiques :

- La réserve des disques imprégnés d'antibiotiques doivent être gardées au réfrigérateur (4°C).
- Une fois les disques retirés du réfrigérateur, laisser à température ambiante les récipients fermés, pendant environ une heure, pour permettre à la température de s'équilibrer ; cela limite la condensation qui se produit quand l'air entre en contact avec les disques.
- Les disques d'antibiotiques sont déposés doucement sur la gélose à l'aide de pince ou un distributeur de 6 disques sur une boîte de 90mm de diamètre.
- Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de pince pour s'assurer de son application, une fois appliqué le disque ne doit pas être déplacé.
- Les disques doivent être espacés de 24 mm, centre à centre.

✓ Incubation :

Une fois que les disques sont placés sur la gélose, il faut incuber la boîte à 37°C pendant 16 à 18 heures dans l'étuve

✓ Lecture :

- Après une nuit d'incubation et à l'aide d'un pied à coulisse, mesurer avec précision le diamètre de chaque zone d'inhibition (diamètre du disque compris) en mm et noter le résultat.

- Les diamètres des zones d'inhibition doivent être comparés au tableau des valeurs critiques des zones d'inhibition publiées par CLSI et notées en fonction des catégories suivantes : sensible (S), intermédiaire (I) et résistant (R) pour chaque antibiotique testé. (**Annexe III**)
- Le diamètre de la zone claire extérieure doit également être mesuré et l'interprétation sera notée pour chaque diamètre.

Remarque :

Les colonies se développant dans la zone claire d'inhibition peuvent représenter des variants résistants ou un inoculum mixte. Pour ces colonies, il faudra également déterminer le diamètre d'inhibition qui sera obtenu en mesurant et en doublant la distance comprise entre les colonies les plus proches du disque et le centre du disque.

Les colonies à l'intérieur de la zone seront prélevées, ré-isolées, ré-identifiées et re-testées par l'épreuve de diffusion en gélose pour confirmer les résultats précédents. La présence de colonies dans une zone d'inhibition peut prédire une éventuelle résistance du microorganisme à cet agent.

Tableau 09 : Liste des antibiotiques utilisés pour les entérobactéries :

Entérobactéries	
Liste standard (bêta -lactamines) (1^{ère} boîte)	Liste complémentaire (2^{ème} boîte)
Amoxicilline	Ticarcilline
Amoxicilline+Acide clavulanique	Ticarcilline+Acide clavulanique
Céfazoline	Pipéracilline
Céfoxitine	Céfopérazone
Céfotaxime	Céfepime
Imipénème	Cefpirome
Ertapénème	Aztréonam

(CA-SFM, 2010)

II.8.Catégorisation clinique finale et lecture interprétative :

La lecture de l'antibiogramme seule ne suffit pas et peut même être à l'origine de graves erreurs préjudiciables au patient traité.

La lecture, c'est-à-dire la mesure des diamètres d'inhibition et leur interprétation doit obligatoirement tenir compte du germe identifié ainsi qu'un certain nombre de données surtout cliniques afin de réaliser une « lecture interprétative ». Seule cette lecture interprétative permettra de réaliser l'approche thérapeutique la plus convenable.

Par ailleurs, cette lecture interprétative est d'une grande importance épidémiologique car elle permet souvent la détection de mécanismes de résistance redoutables (bêta-lactamases à spectre étendu par exemple).

II.9.Tests complémentaires :

L'étude de certain phénotype de résistance a nécessité le recours à des tests complémentaires.

Les souches a étudié, préalablement congelées, ont été décongelées et réisolées sur gélose et en même temps mise en culture en bouillon BHIB.

Une identification et un antibiogramme sont refaits afin de s'assurer du diagnostic et du profil de résistance préalablement établis.

II.9.1.Recherche de la β -lactamase à spectre élargi (BLSE) chez les entérobactéries :

a/-Définition :

Les BLSE désignent des enzymes « β -lactamases » produites par les entérobactéries, entraînant une diminution de l'activité des céphalosporines 3^{ème} génération (C3G) (Céfotaxime, Ceftriaxone, Ceftazidime) et des Monobactames (Aztréonam), mais n'ayant aucune activité vis-à-vis des céphamycines (Céfoxitine, Moxalactam) ni des Carbapénème). (OMS, 2011)

Les BLSE sont redoutables car d'une part, elles peuvent passer inaperçue et être à l'origine d'un échec thérapeutique et d'autre part, l'apparition des bactéries productrices des BLSE dans les services hospitalière est hautement inéquitable sur le plan épidémiologique.

Ces BLSE peuvent ne pas apparaître sur le premier antibiogramme et nécessitent alors des artifices techniques susceptibles de les mettre en évidence.

b /-Quand rechercher une BLSE :

Selon les recommandations du CLSI, la recherche de la BLSE pour l'interprétation de la sensibilité des Entérobactéries aux céphalosporines n'est plus obligatoire.

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

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

- ❖ Céfotaxime (CTX \leq 27mm),
- ❖ Ceftazidime(CAZ \leq 22mm),
- ❖ Ceftriaxone(CRO \leq 25mm),
- ❖ Aztréonam(ATM \leq 27mm) (**Figure 06**)

c/-Méthode de détection de la BLSE :**c.1.Test de synergie :****❖ Technique :**

La recherche de la BLSE se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme en déposant un disque d'Amoxicilline+Acide clavulanique (AMC20/10 μ g) à 30 mm, centre à centre d'un disque de céphalosporine de 3^{ème} génération (Céfotaxime : CTX 30 μ g ou Ceftriaxone :CRO30 μ g).

❖ Incubation :

18heures à 35°C.

Remarque :

- ✓ Cette technique permet la mise en évidence des TEM et SHV.
- ✓ Pour les autres BLSE de classe A (CTX-M, CMT), le test de synergie doit être fait dans les mêmes conditions standards de l'antibiogramme en déposant un disque d'AMC à 30mm centre à centre d'un disque de :Ceftazidime, Céfotaxime ou Ceftriaxone et aztréonam en raison de l'existence de phénotypes de résistance différents(Céfotaximase ou Ceftazidimase).

❖ Lecture :

La production d'enzyme peut se traduire par l'apparition d'une image de synergie (ou bouchon de champagne) entre les disques (**Figure 07**)

- ✓ AMC et CTX
- ✓ AMC et CAZ
- ✓ AMC et ATM

❖ **Recommandation :**

- ✓ Chez *Proteus mirabilis*, *Proteus penneri*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Providencia Stuartii*, les BLSE s'expriment à bas niveau ; dans ce cas, le test de synergie est optimisé en disposant les disques à une distance de 40 à 45 mm au lieu de 30 mm.
- ✓ En l'absence d'une image de synergie, la production de BLSE sera suspectée devant toute diminution du diamètre autour des disques de céphalosporine de 3^{ème} génération.

Elle peut être due à :

- ✚ Soit à la synthèse d'une BLSE CMT (Complexe Mutants TEM).

La recherche de CMT, dans ce cas, se fera en approchant les disques CTX-AMC de 20 mm et 25 mm au lieu de 30 mm.

- ✚ soit à l'association de plusieurs mécanismes : par exemple BLSE+céphalosporinase hyperproduites (*Entérobactéries*). Les céphalosporinase hyperproduites masquant les BLSE.

La détection des BLSE (dans ce cas) chez les souches hyper productrices de céphalosporinase se fera :

- Soit par la recherche d'une synergie entre Augmentin AMC et Céfepime (CFP 30 µg) ou Cefpirome (CPO 30 µg) (céphalosporines de 4^{ème} génération), car ce sont des molécules stables à l'action de la céphalosporinase hyper produite (**recommandation du CA-SFM-2011**)
- Soit par l'inactivation de la céphalosporinase hyperproduite en incluant de la cloxacilline (0,25 mg-0,3 mg/ml) dans la gélose pour les entérobactéries du groupe O3.
- Soit par l'usage de disque ou de bandelette E-test combinant une céphalosporine de 3^{ème} génération et un inhibiteur enzymatique.

❖ **Risque d'erreur d'interprétation :**

Chez *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*, *Citrobacter Koseri*, le test de synergie est positif avec aztréonam et /ou Ceftriaxone, mais reste négatif avec Ceftazidime dont l'activité est conservée, signe de l'hyperproduction de β -lactamase naturelle chromosomique ou aztréonamase

c.2. Test confirmation ou technique du double disque :(Figure 08)

Ce test devra être fait systématiquement devant :

L'absence de synergie avec diminution des diamètres des C3G,

La présence d'une résistance aux molécules suivantes : Ampicilline, Ticarcilline, Céfazoline avec un diamètre <6 mm, par contre l'AMC présente un diamètre d'inhibition.

❖ Technique :

Ce test se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme

- Déposer un disque d'AMC et un disque de C3G (CTX ou CRO) à une distance de 30mm (centre à centre).
- Certains auteurs signalent une meilleure détection des BLSE en testant un disque de Céfopérazone (75µg) avec un disque de TCC (75/10µg)
- Laisser diffuser les antibiotiques pendant une heures, à la température ambiante (sur la paillasse), la boîte sera déposée couvercle vers haut.
- Après une heure d'incubation, ôter le disque d'AMC (ou de TCC) et le remplacer par un disque de CTX ou CRO(ou CAZ).
- Incuber la boîte à 18heures à 35°C.

❖ Lecture et interprétation :

Le test du double disque est positif quand le diamètre d'inhibition autour de la céphalosporine de 3^{ème} génération, appliqué après diffusion du disque AMC ou TCC est ≥ 5 mm rapport au diamètre d'inhibition autour du disque de céphalosporine de 3^{ème} génération.

Exemple :

Diamètre de Céfotaxime (CTX)=16mm ; diamètre de CTX+AMC=21mm donc souche BLSE(+).

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

➤ L'interprétation du consiste à répondre :

Suite à la révision "des breaks points" des céphalosporines, la lecture interprétative anciennement basée sur la détection ou non d'une BLSE n'est plus nécessaire. La réponse R, I, S se fait en se référant au seul diamètre mesurés.

A souligner cependant que la détection phénotypique de la BLSE garde tout son intérêt dans les études épidémiologique et hygiène hospitalière.

❖ Contrôle de qualité :

Les mêmes techniques seront réalisées en parallèle pour les souches :

E.coli ATCC 25922 non productrices de BLSE.

Klebsiella pneumoniae ATCC700603 productrice de BLSE. (**recommandation du CA-SFM-2011**)

c.3. Test à la cloxacilline :

❖ Principe :

Pour certaines souches de bacilles à Gram négatif, il est parfois difficile de distinguer sur l'antibiogramme habituel les hypersécrétions de céphalosporinase (CHN) des BLSE.

La cloxacilline, ajoutée au milieu pour l'antibiogramme (MH), inhibe in vitro les céphalosporinases hyper produites et reste inefficace sur les pénicillinases à Gram négatif

Le test à la cloxacilline permet de révéler la présence de BLSE qui est passée inaperçue car masquée par les céphalosporinases hyperproduites.

❖ Technique :

- L'antibiogramme sera réalisé sur Muller-Hinton additionné d'oxacilline selon les étapes suivantes :
- Prendre un flacon de 1g d'oxacilline
- Injecter 4ml d'eau distillée dans le flacon : Solution à 250mg/ml
- Prendre 0,1ml (100µl) de la solution mère (250mg/ml) +10 ml d'eau distillée : On obtient une solution à 2.5mg/ml
- Prendre 2ml de la solution à 2,5mg/ml +18ml de Muller-Hinton fondu
- Pour cette étape, nous avons préparés des tubes stériles (autoclavés) qui contiennent 18ml de Muller-Hinton.
- Déposer 2ml de la solution à 2,5mg/ml dans une boîte stérile
- Rajouter 18ml de Muller-Hinton fondu ramené à 45°C et mélanger le tout par mouvements circulaire de la boîte dans les deux sens.
- Déposer sur la surface gélosée ensemencée les disques d'antibiotiques.
- Incuber les pendant 18heures à 35°C.

❖ Lecture :

Après 18 heures d'incubation, le test à l'oxacilline est interprété en comparant l'antibiogramme réalisé sur Muller-Hinton additionné d'oxacilline à celui réalisé sur Muller-Hinton sans oxacilline.

Remarque :

Durant notre étude, nous avons utilisés l'oxacilline au lieu du cloxacilline(indisponible),l'oxacilline donnant entière satisfaction.

❖ Interprétation : (Figure 09)

L'inhibition des céphalosporinases hyperproduites entraîne :

- ✓ L'apparition des phénotypes sauvages de l'entérobactérie

Ou

- ✓ L'apparition d'autres mécanismes de résistance acquise tels que :

- Synthèse de BLSE
- Pénicillinase
- Imperméabilité

II.9.2. Recherche et approche phénotypique des céphalosporinases hyperproduites:

Ce type de résistance est suspecté lorsqu'il existe une résistance acquise aux C3G avec un test de synergie négatif en particulier chez les espèces non productrices de céphalosporinase telles que :

Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Proteus mirabilis

Dans ce cas, c'est le test à l'oxacilline qui est préconisé

II.9.3. Recherche et approche phénotypique des carbapénèmases :**a. Définition :**

Les carbapénèmes (imipénème, méropénème et ertapénème) restent toujours actives et apparaissent souvent comme le dernier recours thérapeutique.

Cependant, de nombreuses enzymes différentes sont décrites, elles sont majoritairement transférables. Ces enzymes sont dénommées : IMP, VIM, SPM, GIM, KPC, GES, OXA et retrouvés actuellement chez les entérobactéries.

b. Classification :

- ✓ **Carbapénèmases de la classe A d'Ambler :**

Correspond principalement aux enzymes de type KPC, IMI et GES. Elles ont la particularité de voir leur activité in vitro totalement ou partiellement inhibée par l'acide boronique et l'acide clavulanique. Elles hydrolysent toutes les β -lactamines. (**Tableau 10**)

✓ **Carbapénèmases de classe B d'Ambler :**

Correspond aux métallo- β -lactamases de type VIM, IMP et NDM. Ces enzymes hydrolysent très fortement toutes les β -lactamines à l'exception de l'aztréonam. Leur activité in vitro n'est pas affectée par les inhibiteurs suicides de β -lactamases (acide clavulanique et tazobactam). Ce sont des métallo-enzymes qui contiennent un ion zinc dans leur site actif expliquant l'inhibition de leur activité par l'EDTA (chélateur des cations divalents) ou l'acide dipicolinique.

✓ **Carbapénémase de la classe D :**

Correspond essentiellement aux enzymes de type oxacillinases (OXA-48, OXA-163, OXA-181). Ces enzymes hydrolysent fortement les carbapénèmes mais pas ou peu les céphalosporines de 3ème génération. Elles sont résistantes aux inhibiteurs suicides de β -lactamases (acide clavulanique et Tazobactam). Toutefois, leur présence est souvent couplée à la présence d'une β -lactamase à spectre étendu (BLSE), ce qui conduit à une multi résistance des souches sécrétrices. (**Yano, H et al, 2001**)

c. Méthode de détection : La méthode utilisée dépend du type de carbapénémase

➤ **La détection par une synergie entre AMC et IMP :**

Cette méthode est utilisée pour la détection des carbapénèmases de classe A. (**Figure 10**)

✚ **Technique :**

Ce test se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme

- ✓ Déposer un disque d'AMC et un disque d'imipénème ou mieux d'ertapénème à une distance de 30mm (centre à centre).
- ✓ Laisser diffuser les antibiotiques pendant une heure, à la température ambiante (sur la paillasse), la boîte sera déposée couvercle vers haut.
- ✓ Après une heure d'incubation, ôter le disque d'AMC (ou de TCC) et le remplacer par un disque d'imipénème ou d'ertapénème
- ✓ Incuber la boîte à 18heures à 35°C.

✚ **Lecture :(Figure 11)**

La production d'enzyme se traduit par l'apparition d'une image de synergie :Augmentin (AMC) et Imipénème (IMP) ou Augmentin et Ertapénème(ERT).

➤ **Inhibition par l'EDTA :(voir annexeIII)**

Cette méthode est utilisée pour la détection des métallo-Carbapénèmes :

✚ **Mode opératoire :**

Déposer 750µg d'EDTA (soit 4µl d'une solution d'EDTA ,0.5 M, pH : 8) sur un disque d'Imipénème et comparer le diamètre obtenu avec celui d'un disque d'Imipénème seul.

✚ **Lecture :**

L'EDTA inhibe l'enzyme entraînant une augmentation du diamètre d'inhibition du disque IMP+EDTA par rapport au disque Imipénème (IMP) seul.

II.9.4. Technique de l'E-Test :(Figure 12,13 ,14,15)

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

Les E-Test ont révolutionné la mesure de la CMI. Ce sont des bandelettes de papier buvard imprégnées d'un gradient de concentration d'un antibiotique donné commercialisées et non réalisées au niveau des laboratoires (inconvenient : coût élevé).

Nous avons tenté de confectionner ces bandelettes au laboratoire et avons obtenu des résultats prometteurs mais, cette expérience nécessite un certain recul pour véritablement apprécier sa valeur. **(Voir annexe)**

a. Milieu :

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

b. 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 625nm. Ajuster le plus précisément possible. L'utilisation d'un densimètre est fortement souhaitable.
- L'inoculum à 0,5MF est dilué pour certaines bactéries. Se référer aux recommandations du fournisseur.

c. Ensemencement :

Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum

- L'essorer en le pressant fermement (et en tournant) contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération deux (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.
- Ensemencer dans les mêmes conditions la (ou les) souches de référence.

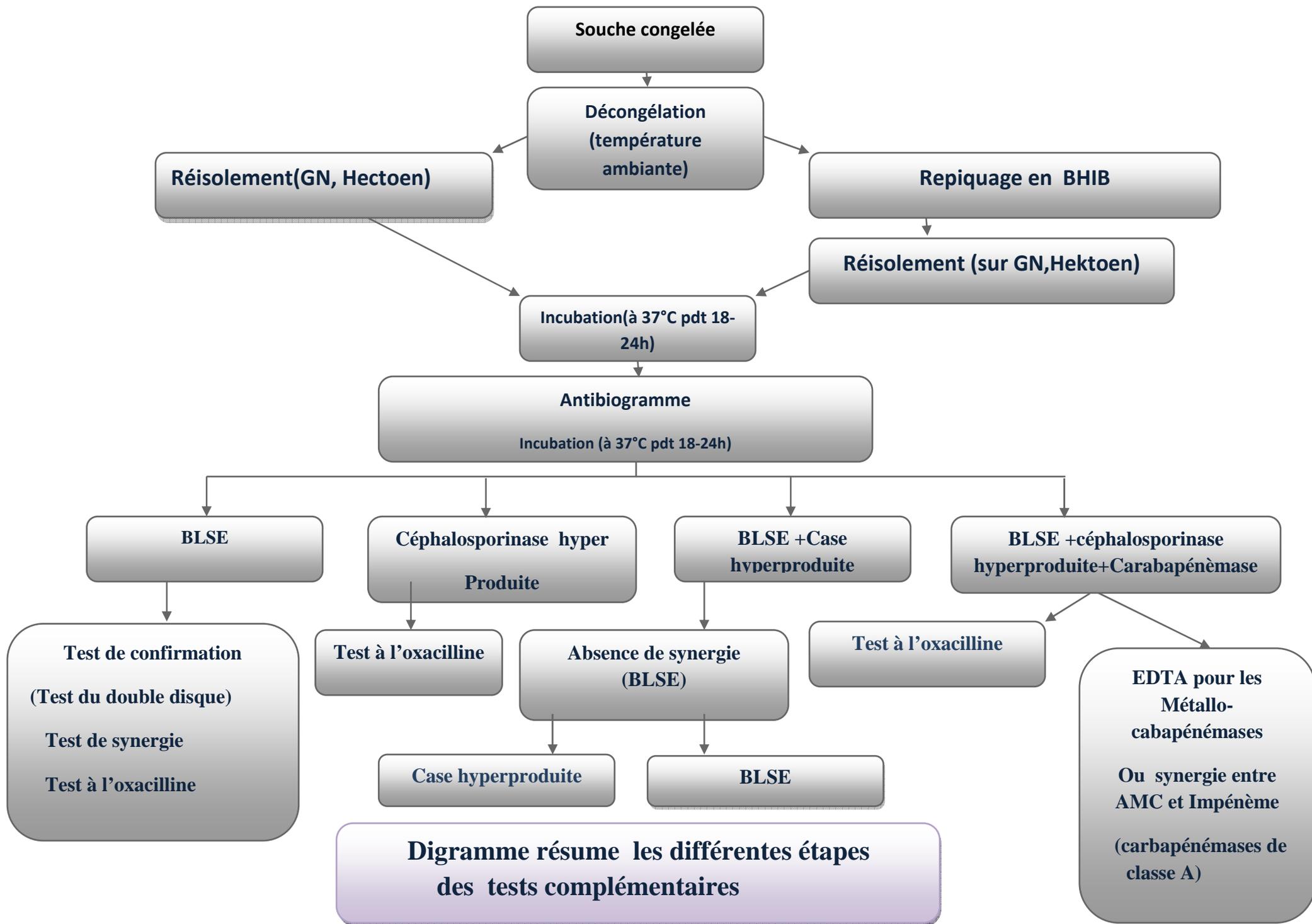
d. Dépôt de la bandelette E-test : "bandelettes maison" :

- Prélever la bandelette à l'aide de pinces bactériologiques préalablement flambées au bec Bunsen ; le contact avec la pince doit se faire au niveau de l'extrémité marquée E ; à noter que l'utilisation d'un applicateur (à commander auprès du fournisseur de bandelettes E-test) est recommander pour les bandelettes du commerce.
- Déposer la bandelette délicatement sur la surface gélosée, en commençant par l'extrémité correspondant aux concentrations les plus faibles de l'antibiotique testé puis en progressant jusqu'aux concentrations les plus élevées. Éviter la formation de bulles d'air entre la gélose et la bandelette ne peut être déplacée.
- A noter que l'on ne peut déposer qu'une ou deux bandelettes E-test au maximum par boîte de 90mm de diamètre (risque de chevauchement des ellipses avec plus d'une bandelette).
- Laisser la boîte couvercle en haut pendant 15mn ou plus.
- Incuber la boîte dans les conditions requises selon la nature de la bactérie testée.

e. Lecture et interprétation :

- La CMI de l'antibiotique testé est lue à l'œil nu, boîte ouverte et bien éclairée.
- Elle correspond à la graduation, située à la jonction entre l'ellipse (dessinée par l'inhibition de la culture bactérienne) et les bandelettes E-test.
- Lire en suite la CMI de la souche bactérienne testée.
- Se référer aux recommandations du fournisseur pour l'interprétation de cas ambigus (double zone) dans le cas des bandelettes du commerce.

- Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tableaux de lecture correspondantes.
- Classer les bactéries dans l'une des catégories : Sensible, Résistant, Intermédiaire.
(recommandation du CA-SFM-2011)



III. Résultats :

Du mois d'avril à novembre 2013, nous avons recueilli 2710 prélèvements d'urines ; 2274 de ces derniers se sont révélés négatifs, 436 positifs.

III.4.Résultats de l'antibiogramme :

La résistance des Entérobactéries aux antibiotiques est représentée dans le tableau 16 :

Tableau 16 : Résultats de l'étude de La résistance des Entérobactéries aux β -lactamines:

Germe	E.coli (303)		K pneumoniae (73)		P.mirabilis (21)		P.vulgaris (4)		E.cloacae (12)		Citrobacter koseri (2)		C.freundii (1)		Kelebsiella oxytoca (11)		Klebsiella. ornithinolytica (1)		Serratia Odorifera (4)		Serratia Mercesens (1)		Serratia liquefaciens (1)		Kluyvera spp (1)			
	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%		
Amoxicilline	268	88,45	73	100	9	33,34	4	100	12	100	2	100	1	100	10	90,90	1	100	4	100	1	100	1	100	1	100	1	100
Amoxicilline + Acide clavulanique	155	51,16	58	79,45	7	42,86	3	75	7	58,34	2	100	1	100	8	72,73	1	100	2	50	1	100	1	100	0	0	0	0
Céfazoline	122	40,26	43	58,9	3	14,29	3	75	6	50	2	100	1	100	3	27,28	0	0	1	25	1	100	1	100	1	100	1	100
Céfoxitine	28	9,24	8	10,96	2	9,53	2	50	2	16,67	0	0	1	100	2	18,19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Céfotaxime	48	15,84	28	38,36	2	9,53	2	50	5	41,67	0	0	1	100	3	27,28	0	0	1	25	0	0	0	0	0	0	0	0
Céfopérazone	38	12,54	51	69,87	2	9,53	2	50	5	41,67	0	0	1	100	1	9,09	0	0	1	25	0	0	0	0	0	0	0	0
Céftazidime	47	15,51	29	39,73	2	9,53	2	50	5	41,67	0	0	1	100	2	18,19	0	0	1	25	0	0	0	0	0	0	0	0
Céfépime	41	13,53	24	32,88	2	9,53	2	50	2	16,67	0	0	1	100	1	9,09	0	0	1	25	0	0	0	0	0	0	0	0
Céfprome	41	13,53	24	32,88	2	9,53	2	50	2	16,67	0	0	1	100	1	9,09	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ticarcilline	185	61,05	73	100	6	28,57	3	75	10	83,34	0	0	1	100	10	90,90	1	100	2	0	0	0	0	0	0	1	100	
Ticarcilline+ Acide clavulanique	154	50,83	43	58,90	4	19,04	3	75	9	75	0	0	1	100	9	81,82	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pipéracilline	184	60,73	73	100	5	23,80	3	75	10	83,34	0	0	1	100	10	90,90	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aztréonam	30	9,90	26	35,61	2	9,53	2	50	5	41,67	0	0	0	0	3	27,28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Imipénème	1	0,33	2	2,74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ertapénème	1	0,33	2	2,74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Le (tableau16) montre les taux de résistance chez les Entérobactéries vis-à-vis des β -lactamines, toutes résistances confondues : naturelles et acquises. La résistance naturelle est indiquée par la couleur jaune

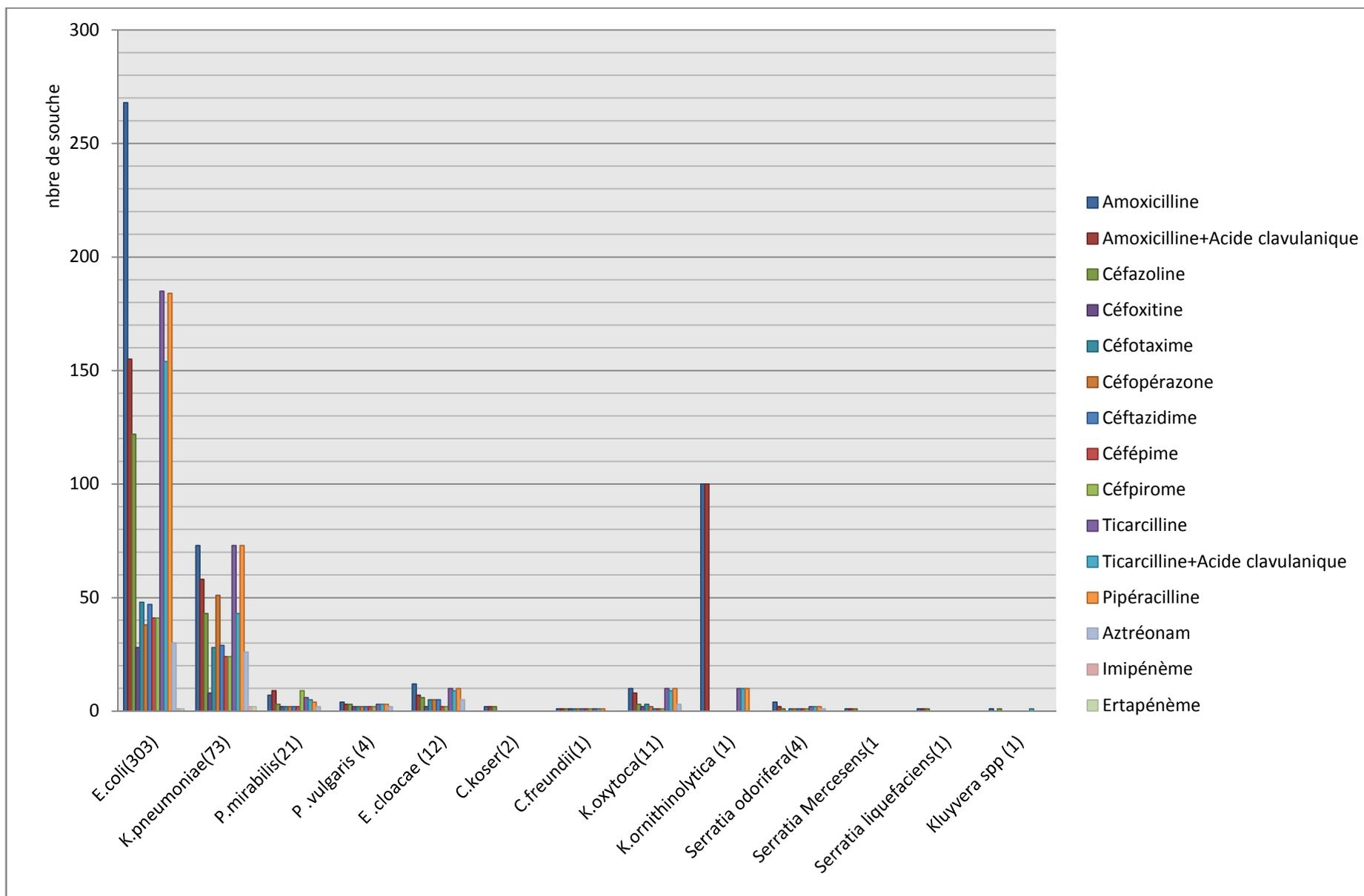


Figure 240 : Résultats de l'étude de La résistance des *Entérobactéries* β -lactamines

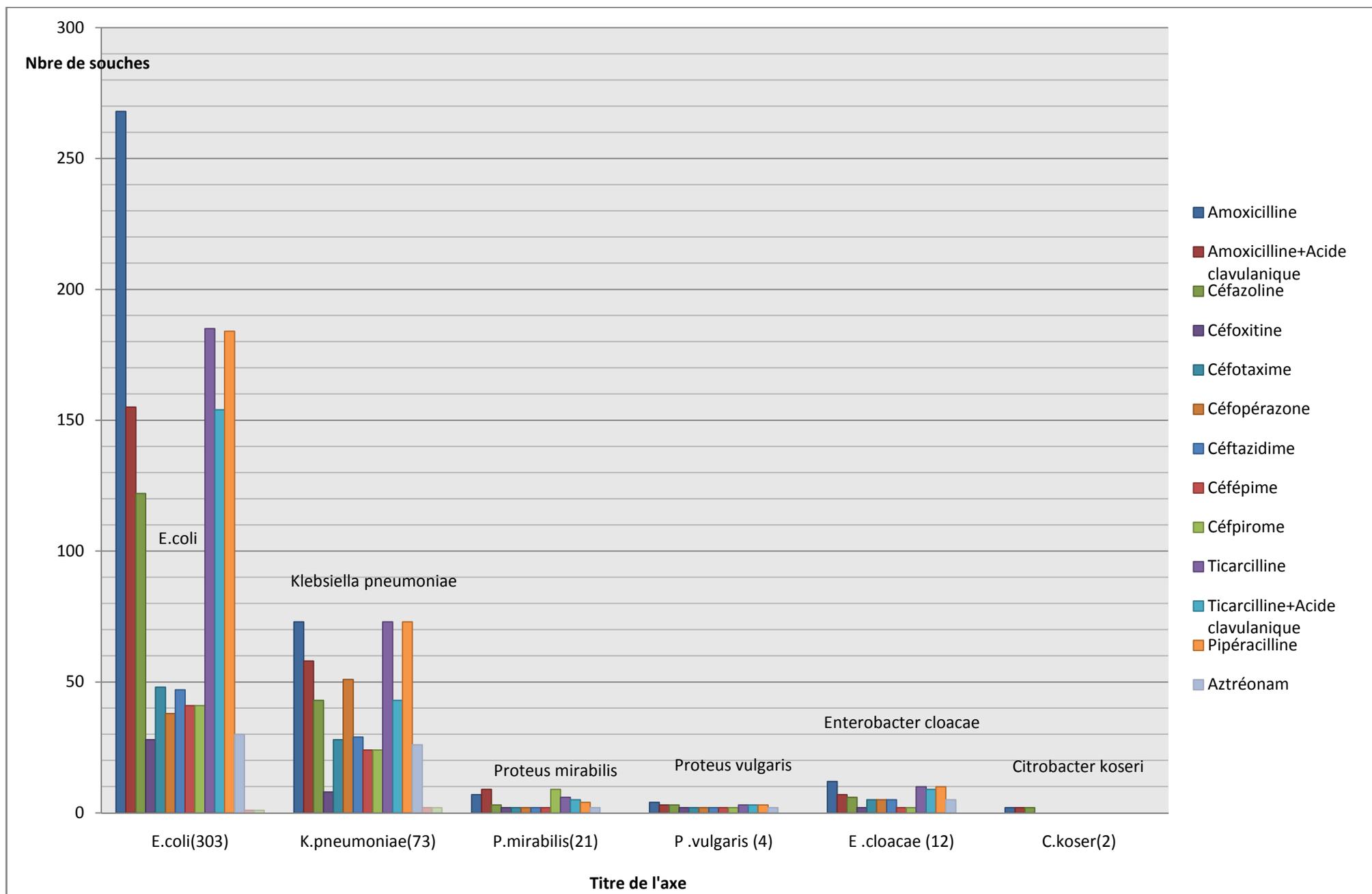


Figure 25 : Résultats de l'étude de La résistance aux β-lactamines chez les espèces à résistance les plus élevées

III.5.Répartition des germes isolés selon les groupes phénotypiques :

Les Entérobactéries retrouvées ont été classées dans les groupes phénotypiques établis par les experts. Ces tableaux contiennent les espèces isolées quelle que soit leur sensibilité aux bêta lactamines.

Groupe 01 : (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica*, *Shigella spp*)

Tableau 17 : Résultats de l'étude de la résistance des espèces du Groupe 01

Germes	Escherichia .coli (303)		Proteus mirabilis (21)	
	Nb	%	Nb	%
Amoxicilline	268	88,45	9	33,34
Amoxicilline+Acidecalvualanique	155	51,16	7	42,86
Céfazoline	122	40,26	3	14,29
Céfoxitine	28	9,24	2	9,53
Céfotaxime	48	15,84	2	9,53
Céfopérazone	38	12,54	2	9,53
Céftazidime	47	15,51	2	9,53
Céfépime	41	13,53	2	9,53
Céfprome	41	13,53	2	9,53
Ticarcilline	185	61,05	6	28,57
Ticarcilline +Acide clavulanique	154	50,83	5	23,81
Pipéracilline	184	60,73	4	19,04
Aztréonam	30	9,90	2	9,52
Imipénème	1	0,33	0	00
Ertapénème	1	0,33	0	00

On remarque que le taux de résistance d'*E.coli* et *Proteus mirabilis* est très élevé aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines et aux ureidopénicillines (respectivement 23 et 42% pour *E.coli* ; 50 et 88% pour *Proteus mirabilis*).

Pour *Proteus mirabilis*, la résistance aux céphalosporines est moins élevée .

E.coli présente une forte résistance aux céphalosporines de 1^{ère} génération (Céfazoline : 40,26% de résistance)

Céfépime et Cefpirome sont dites céphalosporines de 3^{ème} génération élargie ou de 4^{ème} génération. Nous remarquons, qu'elles ne sont pas loin des céphalosporines de 3^{ème} génération (Céfotaxime) en matière de résistance.

Pour l'imipénème, (0,33%) nous avons isolé une seule souche d'*E.coli* résistante. (**Tableau 17**)

➤ *Escherichia .coli*

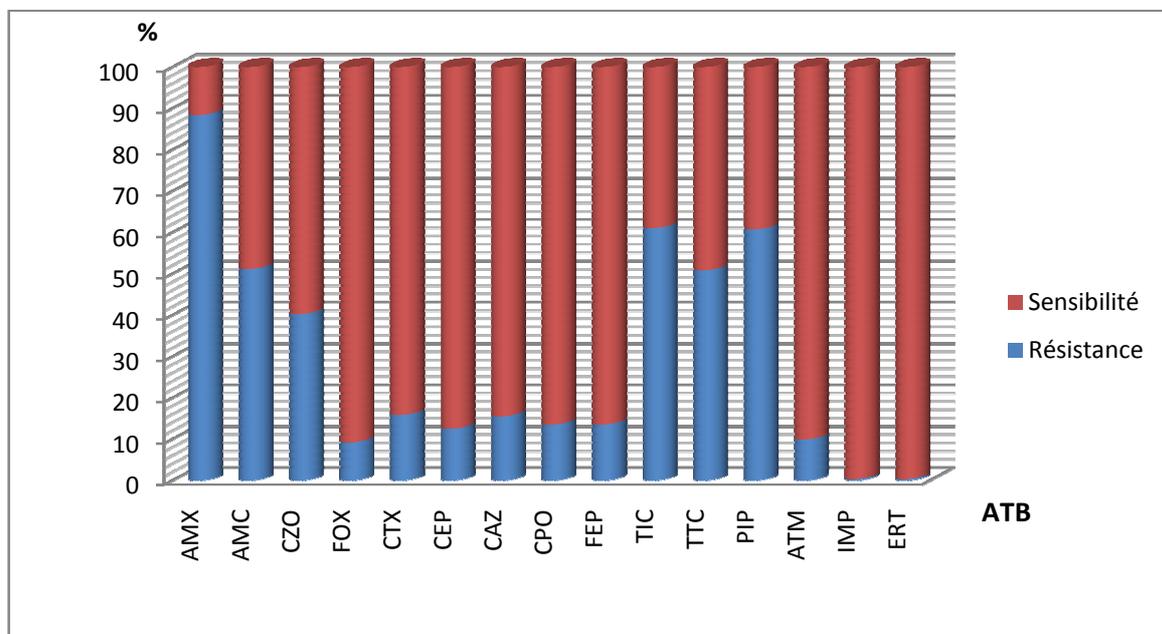


Figure 26 : Taux de résistance d'*Escherichia coli* aux β -lactamines

➤ *Proteus mirabilis* :

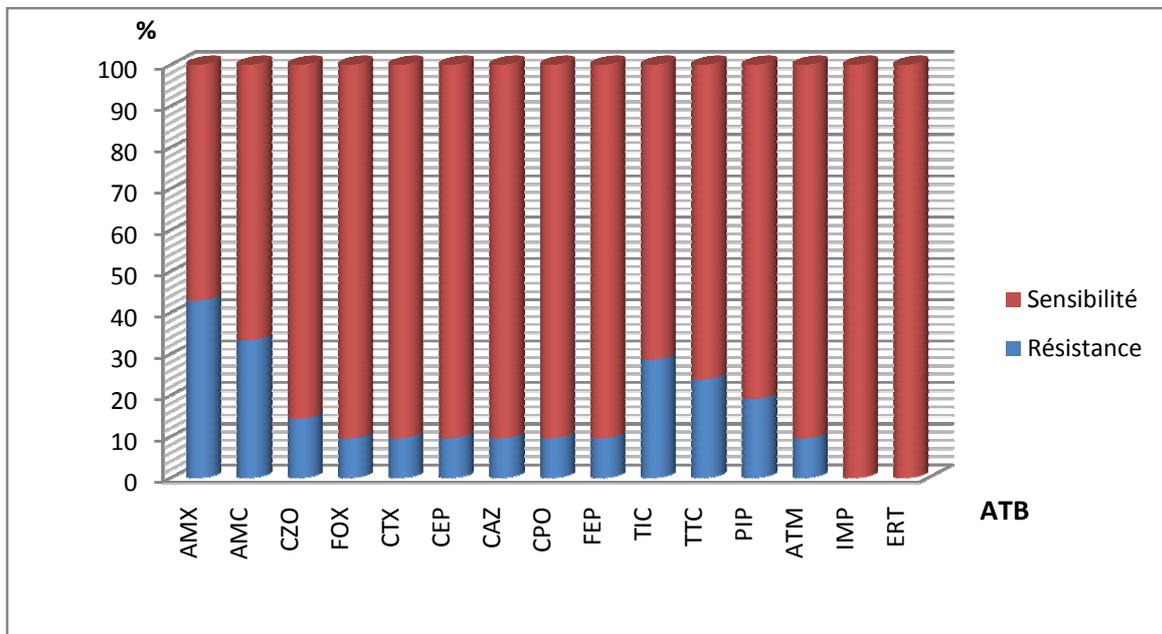


Figure 27 : Taux de résistance de *Proteus mirabilis* aux β -lactamines

Groupe 02 : (*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter koseri* .)

Tableau 18 : Résultats de l'étude de la résistance des espèces du Groupe 02

Germes	<i>K.pneumoniae</i> (73)		<i>K .oxytoca</i> (11)		<i>K. ornithinolytica</i> (1)		<i>C.koseri</i> (2)	
	Nb	(%)	Nb	(%)	Nb	(%)	Nb	(%)
ATB								
Amoxicilline	73	100	10	90,90	1	100	2	100
Amoxicilline +Acide clavulanique	58	79,45	8	72,73	1	100	2	100
Céfazoline	43	58,90	3	27,28	00	00	2	100
Céfoxitine	8	10,96	2	18,19	00	00	2	100
Céfotaxime	28	38,36	3	27,28	00	00	00	00
Céfopérazone	51	69,87	2	9,09	00	00	00	00
Ceftazidime	29	39,73	1	18,19	00	00	00	00
Céfépime	24	32,88	1	9,09	00	00		
Céfpirome	24	32,88	1	9,09	00	00	00	00
Ticarcilline	73	100	10	90,90	1	100	00	00
Ticarcilline+ Acide clavulanique	43	58,90	9	81,82	1	100	00	00
Pipéracilline	73	100	10	90,90	1	100	00	00
Aztreonam	26	35,61	3	27,28	00	00	00	00
Imipénème	2	2,74	00	00	00	00	00	00
Ertapénème	2	2,74	00	00	00	00	00	00

En ce qui concerne les espèces du groupe 02, on remarque un taux de résistance élevé aux amino-carboxy et uréido pénicillines (58 à 100%).

Concernant les céphalosporines, le taux de résistance de *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella oxytoca* semble moins élevé que chez *Escherichia coli* et devient nul pour *Citrobacter koseri*. On note la présence des 2 souches Imipénème R ce qui donne un taux de résistance de 2,74% (Tableau 18).

➤ *Klebsiella pneumoniae*

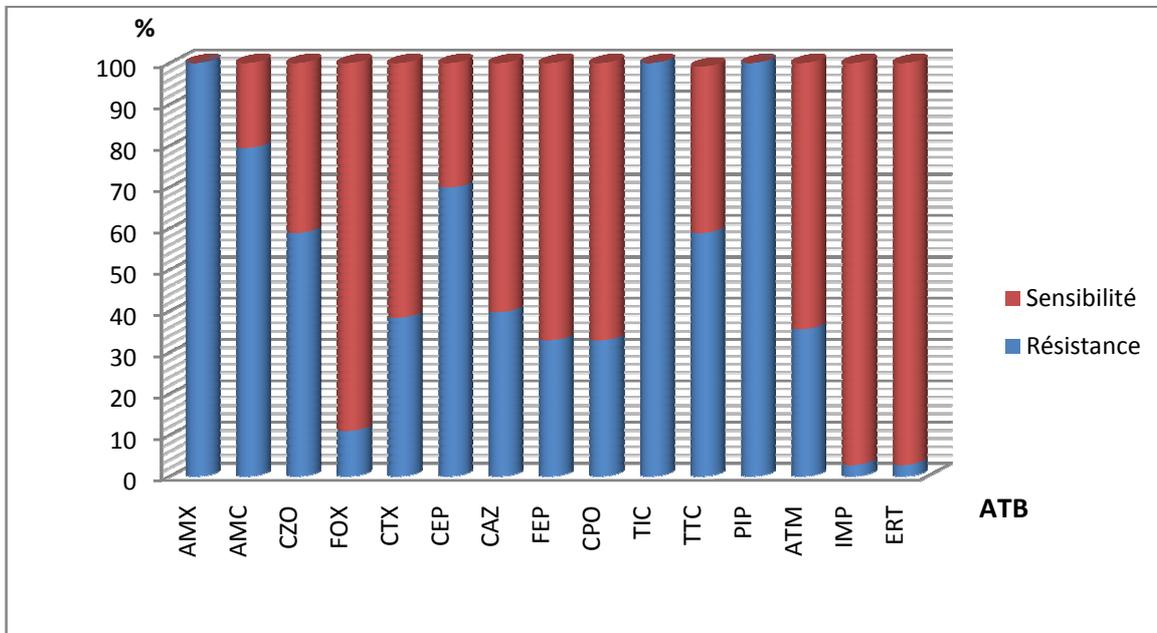


Figure 28: Taux de résistance de *klebsiella pneumoniae* aux β -lactamines

➤ *Klebsiella oxytoca*

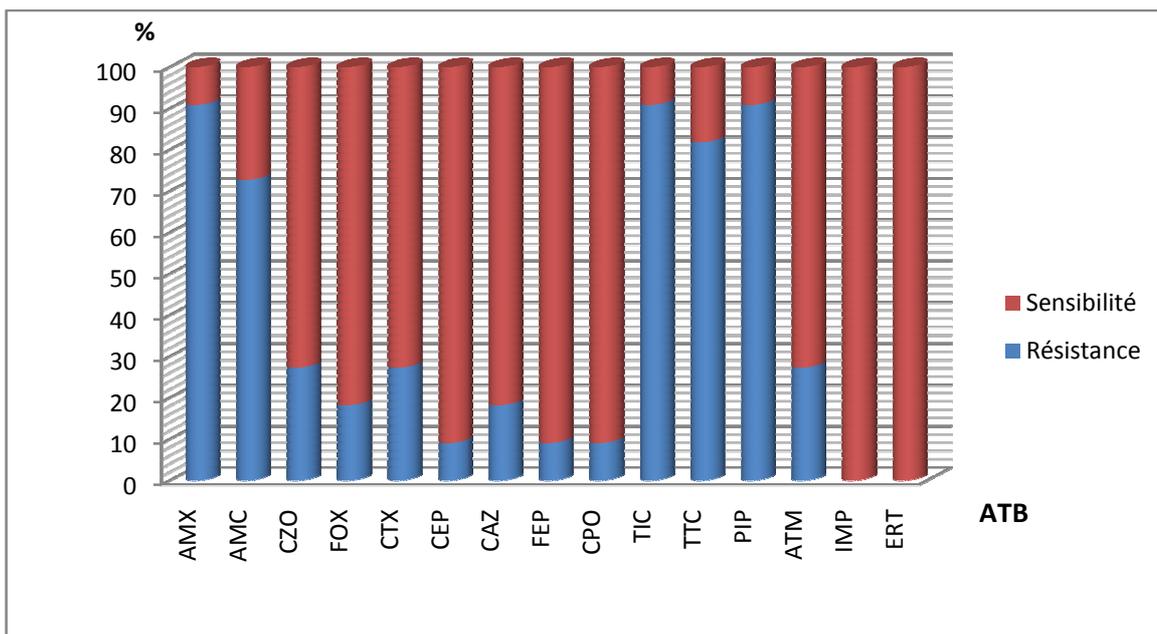


Figure 29: Taux de résistance de *Klebsiella oxytoca* aux β -lactamines

➤ *Klebsiella ornithinolytica* :

Nous avons isolé une seule souche qui présente une résistance

aux :Amoxicillines,Association amoxicilline-Acide clavulanique, céfazoline, Ticarcilline,

Pipéracilline et Ticarcilline +Acide clavulanique

➤ *Citrobacter koseri*

Les deux souches qui ont été isolé sont résistant de 100% aux :Amoxicilline, Amoxicilline-Acide clavulanique ,Céfazoline et Céfoxitine

Groupe 03 : (*Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*,*Serratia odorifera*,*Serratia marcesens*)

Tableau 19 : Résultats de l'étude de la résistance des espèces du Groupe 03

Germes ATB	<i>E. cloacae</i> (12)		<i>C. freundii</i> (1)		<i>S.odorifera</i> (4)		<i>S.marcesens</i> (1)	
	Nb	(%)	Nb	(%)	Nb	(%)	Nb	(%)
Amoxicilline	12	100	1	100	4	100	1	100
Amoxicilline +Acide clavulanique	7	58,34	1	100	2	50	1	100
Céfazoline	6	50	1	100	1	25	1	00
Céfoxitine	2	16,67	1	100	00	00	00	00
Céfotaxime	5	41,67	1	100	1	25	00	00
Céfopérazone	5	41,67	1	100	1	25	00	00
Ceftazidime	5	41,67	1	100	1	25	00	00
Céfépime	2	16,67	1	100	1	25	00	00
Céfprome	2	16,67	1	100	1	25	00	00
Ticarcilline	10	83,34	1	100	2	25	00	00
Ticarcilline +Acide clavulanique	9	75	1	100	2	25	00	00
Pipéracilline	10	83,34	1	100	2	25	00	00
Aztréonam	5	41,67	00	00	1	25	00	00
Imipénème	00	00	00	00	0	00	00	00
Ertapénème	00	00	00	00	0	00	00	00

Nous constatons une résistance de 100% aux amino- pénicillines qui diminue avec les carboxy et ureido- pénicillines.

Une totale résistance à l'association Amoxicilline-Acide clavulanique (Augmentin) est observée pour *Citrobacter freundii* et *Serratia marcescens*.

En ce qui concerne les céphalosporines, *Citrobacter freundii* présente une totale résistance aux C1G,C2G,C3G,C4G.

Pour l'aztréonam, *Enterobacter Cloacae* présente 41,65% de résistance qui diminue pour les autres espèces du groupe.

Une totale sensibilité à l'imipénème et l'ertapénème est observée (**Tableau 19**).

➤ *Enterobacter cloacae*

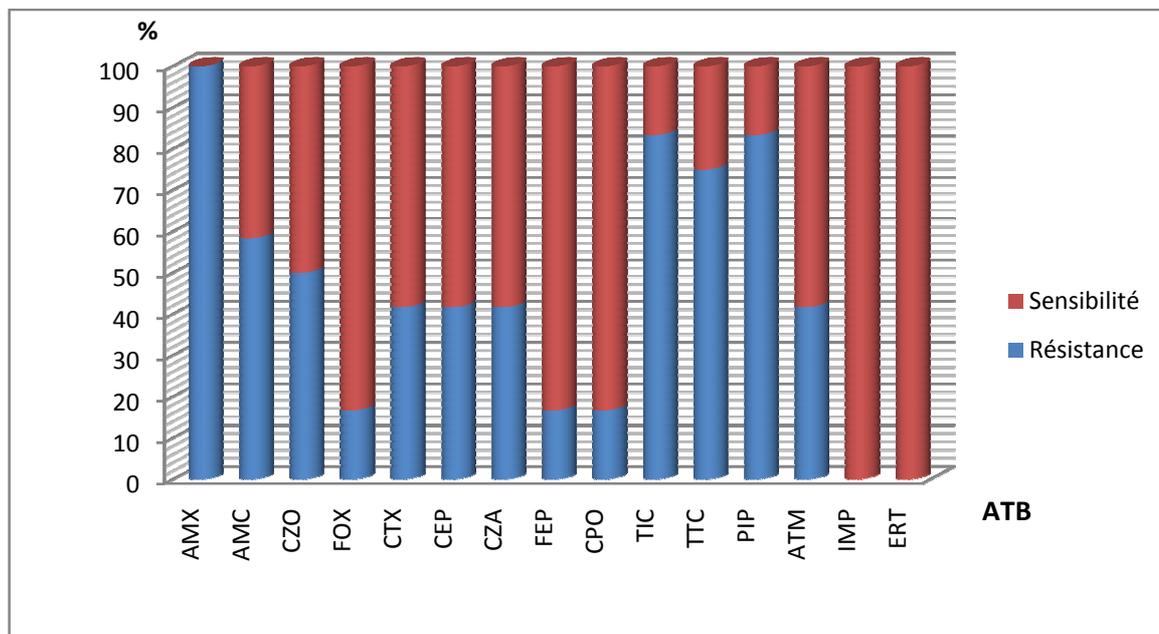


Figure 30 :Taux de résistance d'*Enterobacter cloacae* aux β -lactamines

➤ *Citrobacter freundii* :

Une seule souche qui présente une résistance de 100% aux :Amoxicilline,Augmentin,les céphalosporines,les carboxy et ureido pénicillines

➤ *Serratia odorifera*

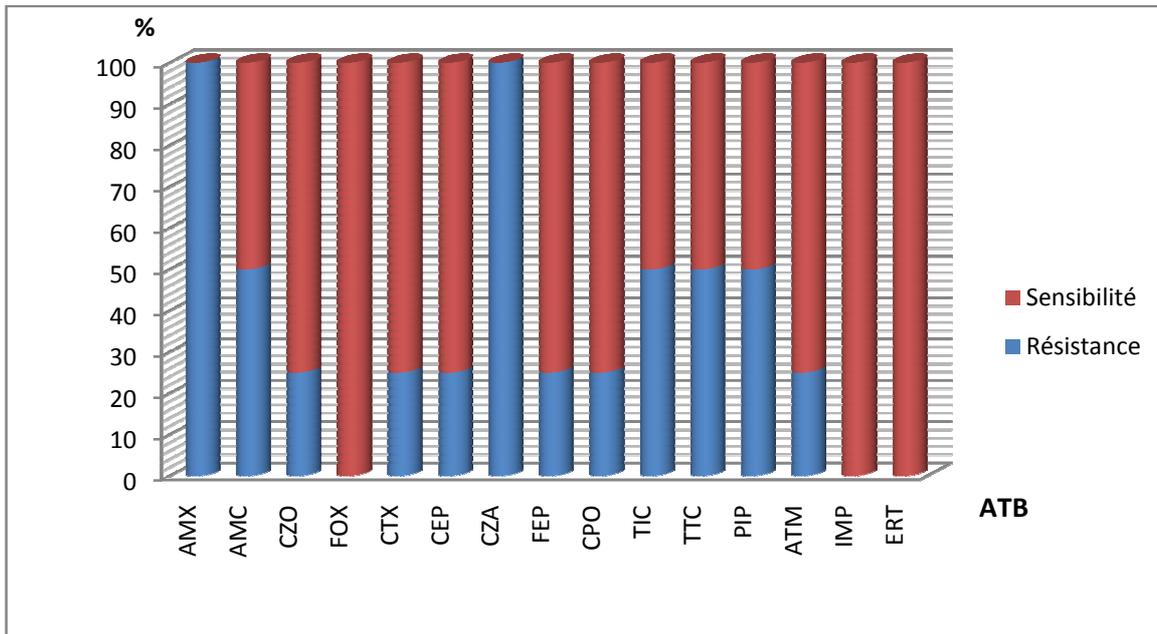


Figure 31 : Taux de résistance de *Serratia odorifera* aux β -lactamines

➤ *Serratia marcescens* :

Cet espèce montre une résistance de 100% à l'amoxicilline, l'Augmentin et Céfazoline

Groupe 04 : (*Yersinia enterocolitica* , *Serratia fonticola*.)

Nous n'avons pas eu la chance d'isoler les espèces du groupe 04, car elles se rencontrent plus rarement.

Groupe 05 : (*Kluyvera ascorbata*, *Kluyvera cryocrescens*, *Proteus vulgaris*).

Tableau 20 : Résultats de l'étude de la résistance du groupe 05

Germes ATB	<i>Proteus vulgaris</i> (4)		<i>Kluyvera spp</i> (1)	
	Nb	%	Nb	%
Amoxicilline	4	100	1	100
Amoxicilline +Acide clavulanique	3	75	0	0
Céfazoline	3	75	1	100
Céfoxitine	2	50	0	0
Céfotaxime	2	50	0	0
Céfopérazone	2	50	0	0
Ceftazidime	2	50	0	0
Céfépime	2	50	0	0
Céfprome	2	50	0	0
Ticarcilline	3	75	1	100
Ticarcilline +Acide clavulanique	3	75	0	0
Pipéracilline	3	75	0	0
Aztréonam	2	50	0	0
Imipénème	0	0	0	0
Ertapénème	0	0	0	0

Proteus vulgaris et *Kluyvera spp* présentent une résistance à 100% à Amoxicilline.

En ce qui concerne les céphalosporines, *Proteus vulgaris* présente un taux de 75% de résistance pour la céfazoline et 50% pour les autres céphalosporines (C2G, C3G, C4G).

Une totale sensibilité à l'Imipénème et l'Ertapénème (**Tableau 20**).

➤ *Proteus vulgaris*

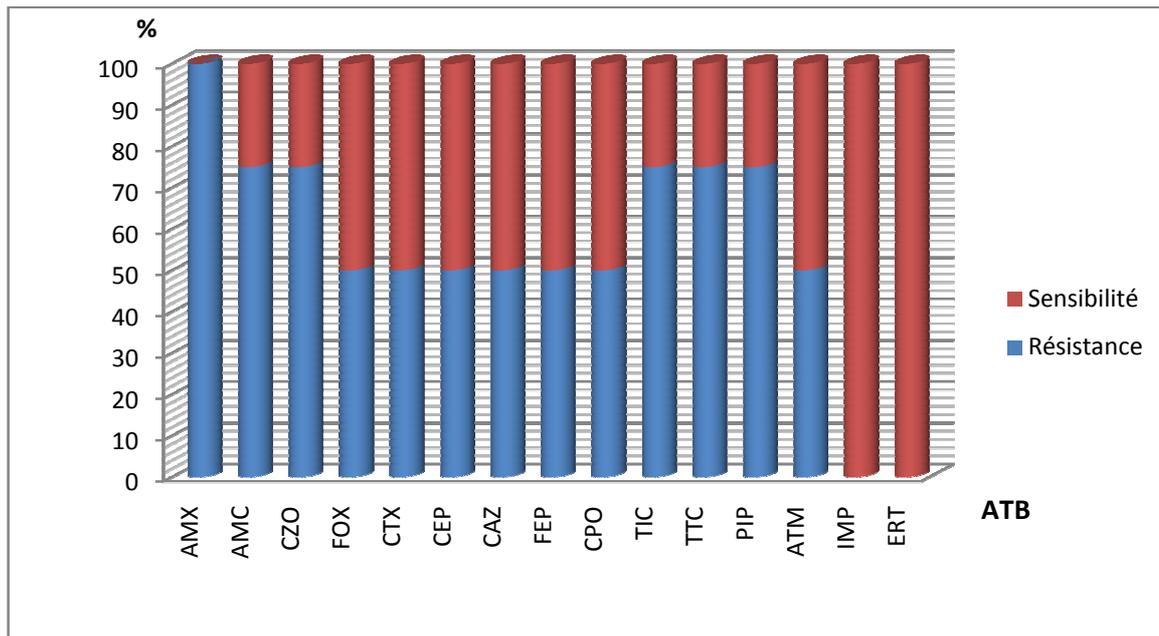


Figure 32 : Taux de résistance de *Proteus vulgaris* aux β-lactamines

➤ *Kluyera spp* :

En ce qui concerne cette souche, nous avons remarqué une résistance de 100% l'Amoxicilline et Ticarcilline

III.6. Phénotype de résistance aux B-lactamines :

Les principaux phénotypes sont résumés dans le tableau

Tableau 21 : Distribution des principaux phénotypes de résistance aux β-lactamines

Phénotype	Phénotype Sauvage	Phénotype résistant								Total
		P.B .N	P.H.N	CASE.bas niveau	CASE. hyper	BLSE+CASE Hyper	BLSE	TRI	CASE.H+ BLSE+Carbp	
Nb de souches	157	49	96	5	15	29	37	45	3	436
%	36	11,23	22,01	1,15	3,44	6,65	8,49	10,32	0,69	100%

Chez les entérobactéries (toutes bactéries confondues), le phénotype sauvage est le plus fréquemment isolé (36%).

Pour la résistance acquise, le phénotype pénicillinase haut niveau (P.H.N) est le plus largement observé (22%).

Le phénotype « BLSE » est à 8,49%, suivi par le phénotype BLSE+céphalosporinase hyperproduite.

Le phénotype BLSE +céphalosporinase hyperproduite + carbapénèmase est plus rarement retrouvé (0,69%).

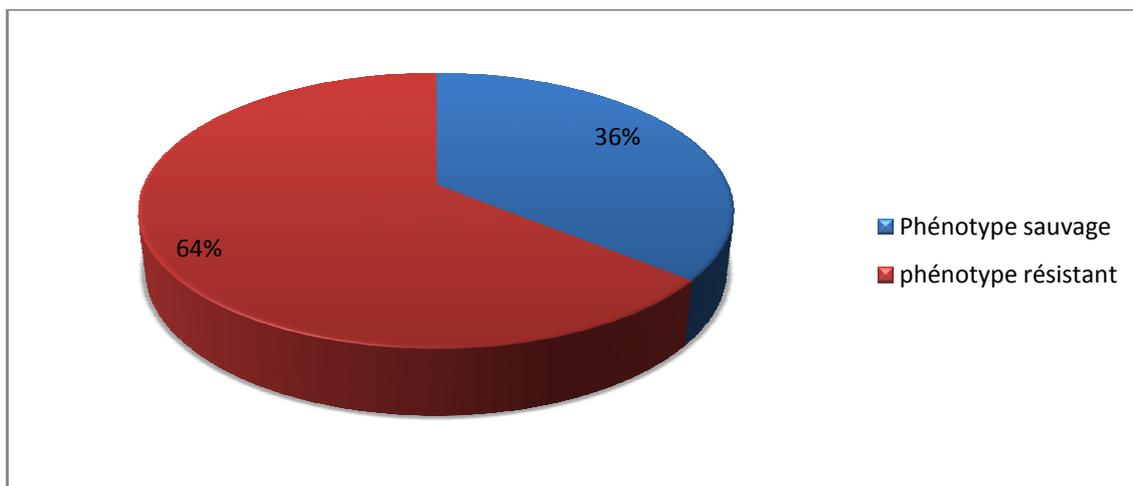


Figure 3 Taux de phénotype sauvage et résistant

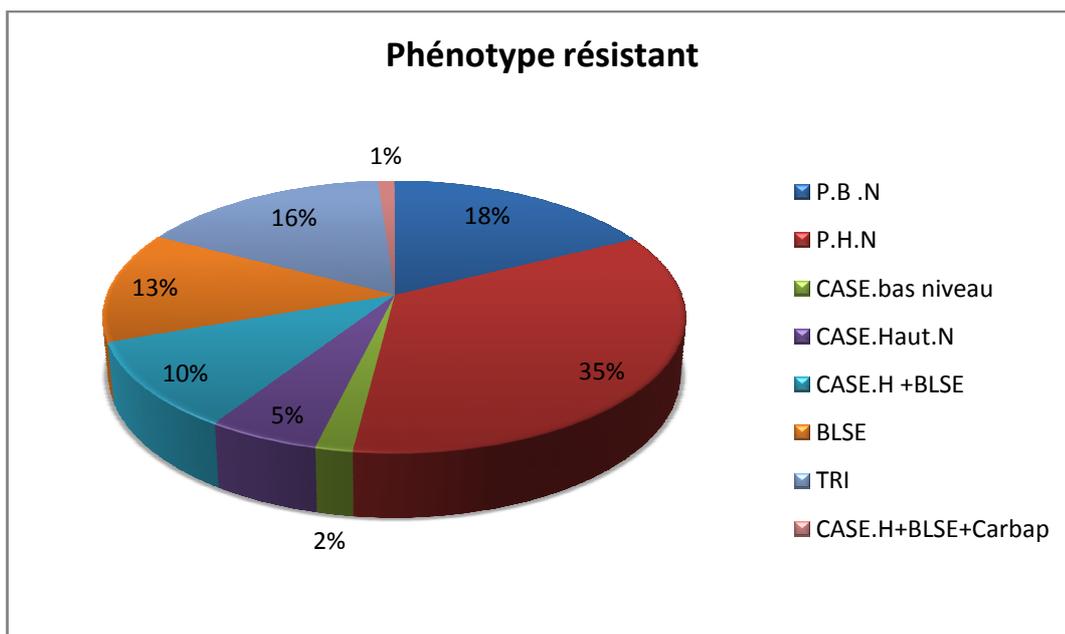


Figure 29 : Phénotype résistant

Germes	E.coli	K. pneumoniae	P. mirabilis	P vulgaris	E.cloacae	K.oxytoca	C.koseri	C.freundii	K.ornithinolytica	S.odorifera	S marcens	S.liquefaciens	Kluyveras pp
Nb des souches isolés total	303	73	21	4	12	11	2	1	1	4	2	1	1
Phénotype sauvage	111	26	11	1	1	5	1	0	0	0	0	1	0
%	36,64	35,62	52,38	25	8,34	45,46	50	0	0	0	0	100	0
Phénotype résistant acquise	192	47	10	3	11	6	1	1	1	4	2	0	0
%	63,37	64,38	47,61	75	91,66	54,55	50	100	100	100	100	0	0

Tableau 22: Répartition globale des germes selon le phénotype

III.6.1.Principaux phénotypes de résistance des Entérobactéries aux β -lactamines :

Escherichia coli :

Ce tableau résume les différents phénotypes résistant chez *Escherichia coli*

Tableau23 : phénotype résistant chez *Escherichia coli*

phénotype	P.B.N	P.H.N	Case bas niveau	TRI	BLSE	Case hyperproduite	BLSE + Case hyperproduite	BLSE+ Case hyper+ Carbapénèmase	Total
Nbre des souches	40	72	4	34	21	8	12	1	192
Pourcentage	20,84	37,5	2,08	17,71	10,94	4,17	6,25	0,52	100

Le tableau 23 montre une forte proportion du phénotype pénicillinase haut niveau (P.H.N) avec un pourcentage de 37,5%, suivi du phénotype pénicillinase bas niveau (20,84%).

Le phénotype TRI vient en 3^{ème} position avec un taux de 17,71%, suivi par le phénotype BLSE, avec un taux de 10,94%.

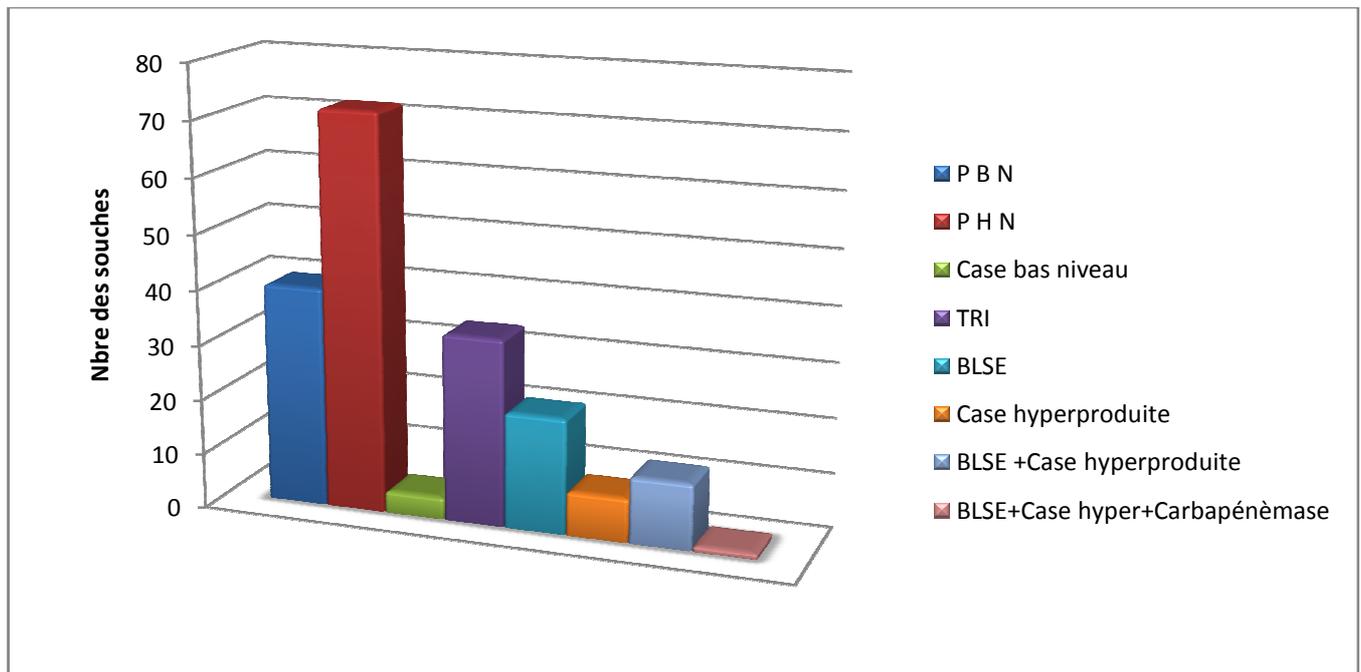


Figure 30: phénotype résistant chez *Escherichia coli*

➤ *Klebsiella pneumoniae* :

Tableau 24 : phénotype de résistance chez *Klebsiella pneumoniae*

Phénotype	P.B.N	P.H.N	Case bas niveau	TRI	BLSE	Case hyperproduite	BLSE + Case hyperproduite	BLSE +Case hyperproduite +Carbapénèmase	Total
Nbre des souches	0	13	0	9	12	0	11	2	47
Pourcentage %	0	27,66	0	19,15	25,54	0	23,40	4,26	100

Le phénotype Pénicillinase bas niveau correspond au phénotype sauvage de *Klebsiella pneumoniae*.

Le phénotype Pénicillinase haut niveau (P.H.N) représente le taux le plus élevé (27,66%), suivi par le phénotype « BLSE » soit un pourcentage de 25,54%.

Le phénotype « BLSE +céphalosporinase hyperproduite occupe la 3^{ème} position avec un taux de 23,40%.

On note la présence du phénotype « BLSE+carbapénèmase hyperproduite +carbapénèmase » avec un taux plus élevé que chez E.coli (4,26%) (**Tableau 24**).

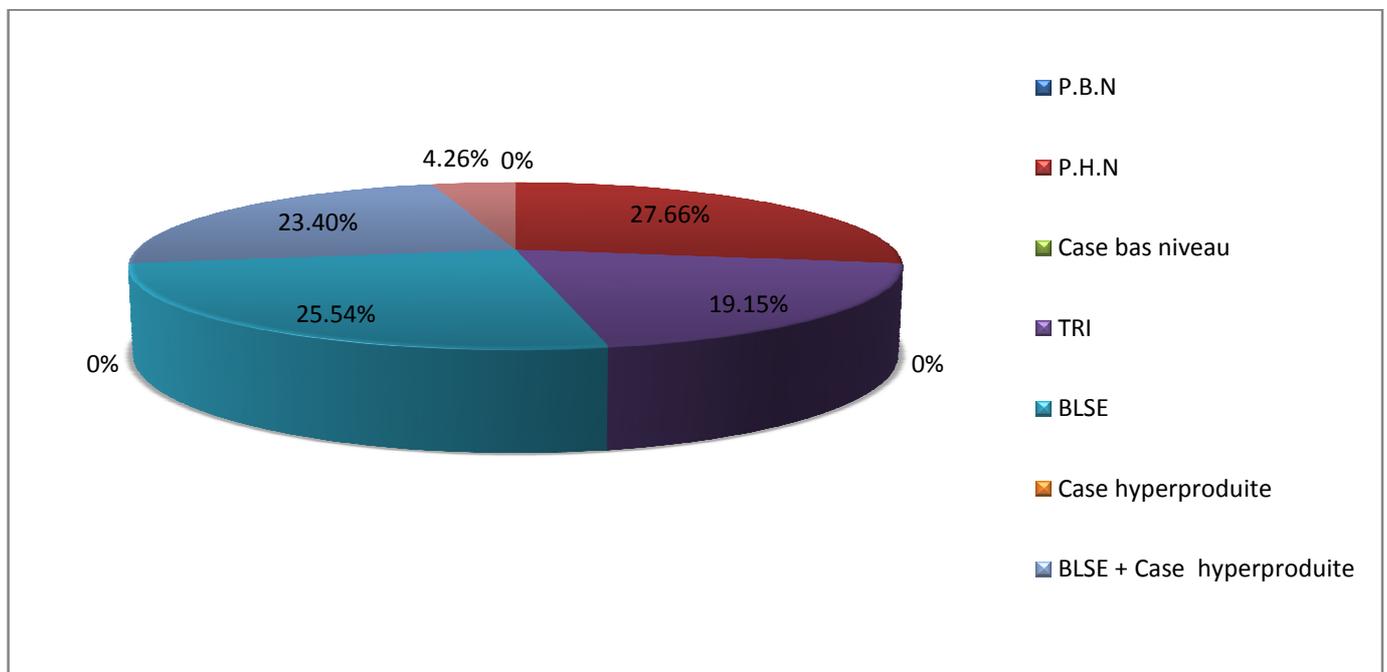
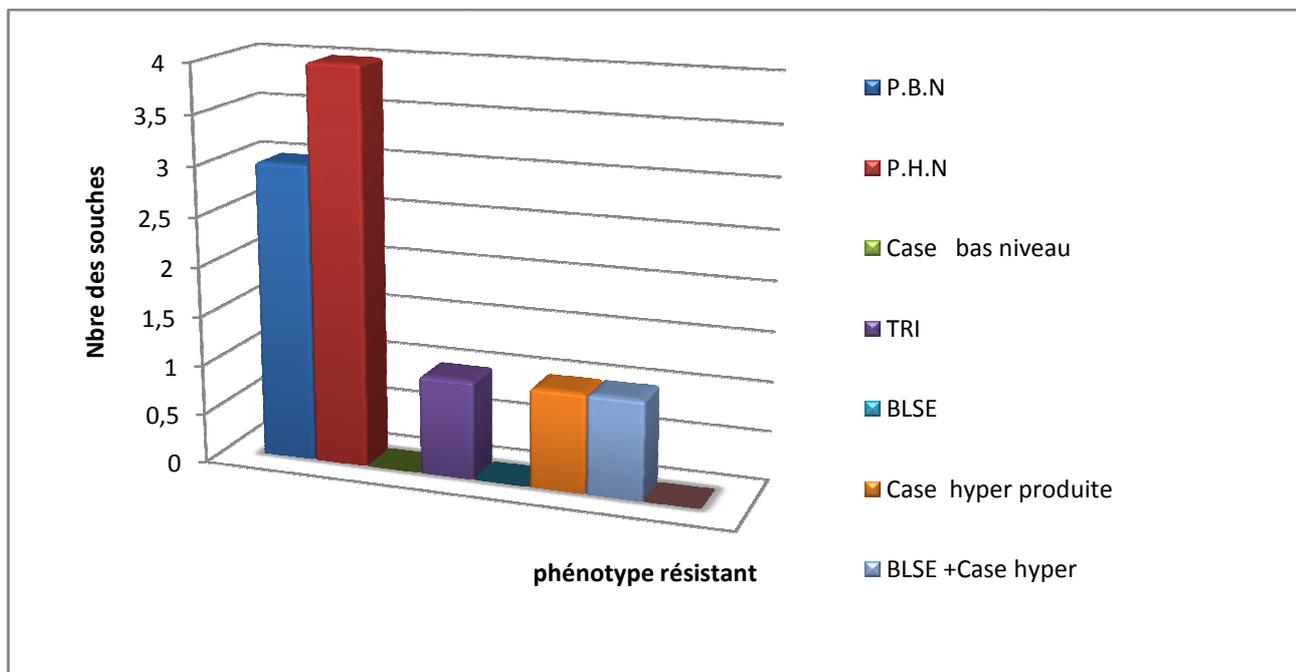


Figure 36: phénotype résistant chez *Klebsiella pneumoniae*

➤ *Proteus mirabilis* :

➤ **Tableau 25: phénotype de résistance chez *Proteus mirabilis* :**

Phénotype	P.B.N	P.H.N	Case bas niveau	TRI	BLSE	Case hyper produite	BLSE +Case hyper	BLSE + Case hyper + Carbapénèmase	Total
Nb des souches	3	4	0	1	0	1	1	0	10
Pourcentage %	30	40	0	10	0	10	10	0	100



➤ **Figure 37 : Phénotype résistant chez *Proteus mirabilis* :**

En ce qui concerne *Proteus mirabilis* et selon (**la figure 37**), on constate que le phénotype pénicillinase haut niveau représente le taux le plus remarquable (40%), suivi par le phénotype pénicillinase bas niveau avec un taux de .

On note un taux de résistance de 10% pour les phénotypes :TRI, céphalosporinase hyperproduite et BLSE+ céphalosporinase hyperproduite.

➤ *Enterobacter cloacae* :

Tableau 26 : phénotype résistant chez *Enterobacter cloacae*

Phénotype	P.B.N	P.H.N	Case Bas niveau	TRI	BLSE	Case hyperproduite	BLSE+ Case hyper produite	BLSE + Case hyper +Carbapénèmase	Total
Nbre des souches	3	3	0	0	2	1	2	0	11
Pourcentage %	27,28	27,28	0	0	18,19	9,09	18,19	0	100

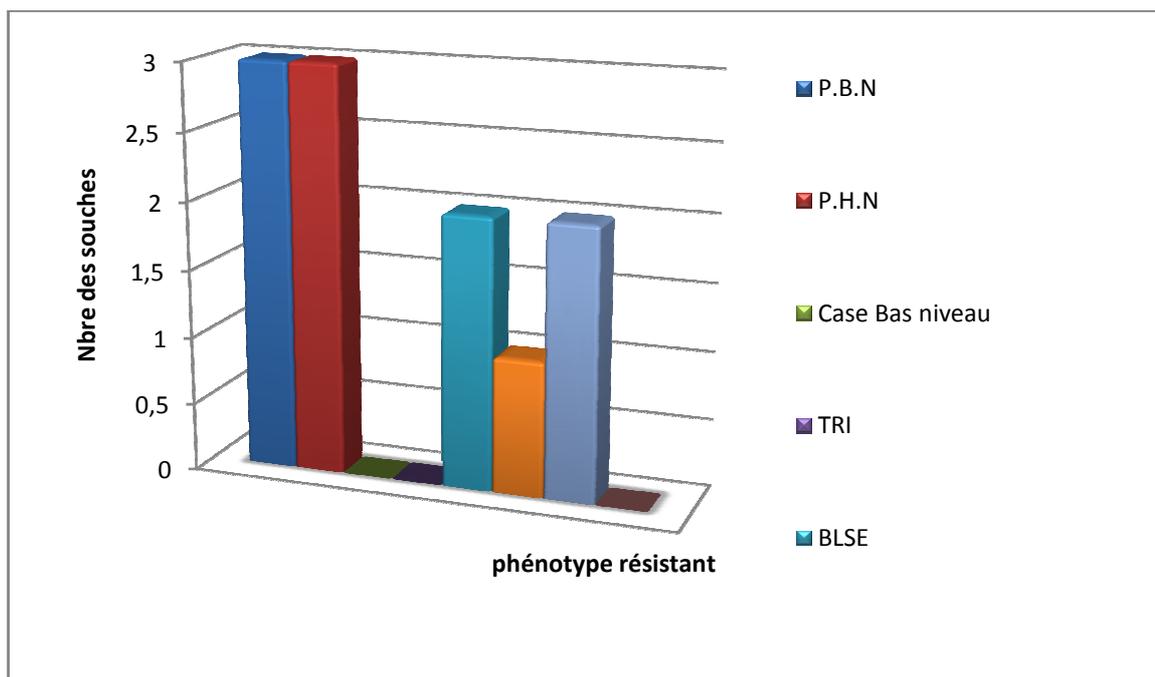


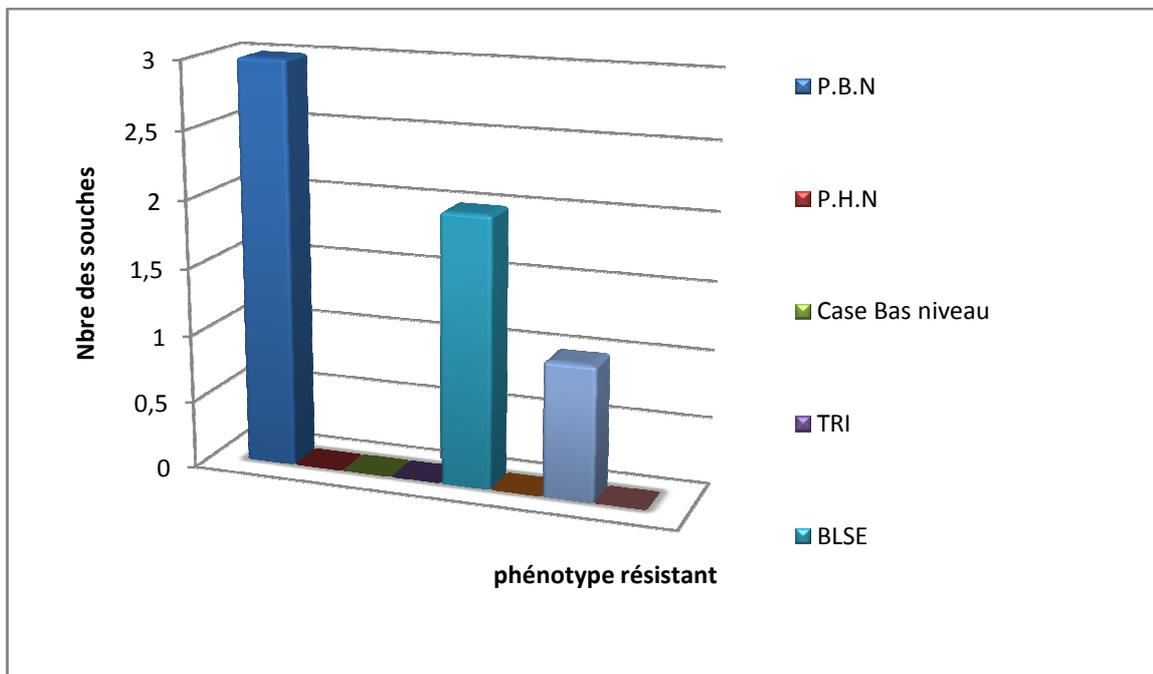
Figure 38 : phénotype résistant chez *Enterobacter cloacae*

On remarque un taux de 27,28% pour pénicillinase haut et bas niveau, suivi par les phénotypes BLSE et BLSE + céphalosporinase hyperproduite avec un taux de 18,19% (**Figure 38**).

➤ *Klebsiella oxytoca* :Tableau 27 : phénotype résistant chez *Klebsiella oxytoca*

Phénotype	P.B.N	P.H.N	Case Bas niveau	TRI	BLSE	Case hyperproduite	BLSE + Case hyper	BLSE + Case hyper + Carabapénèmase	Total
Nbre des souches	3	0	0	0	2	0	1	0	6
Pourcentage %	50	0	0	0	33,34	0	16,67	0	100

On ce qui concerne *Klebsiella oxytoca*, on a selon le (**tableau 27**) un taux de 50% pour pénicillinase bas niveau, suivi par le phénotype BLSE (33,34%).

Figure 39 : phénotype résistant chez *Klebsiella oxytoca*

➤ ***Proteus vulgaris*** :

Nous avons isolé trois souches qui présentent un taux de résistance de 33,34% pour les phénotypes suivants : Pénicillinase haut niveau, céphalosporinase hyperproduite et BLSE+céphalosporinase hyperproduite

➤ ***Citrobacter koseri*** :

Seul le phénotype pénicillinase haut niveau apparaît.

➤ ***Citrobacter freundii*** :

La seule souche isolée est du phénotype céphalosporinase hyperproduite.

➤ ***Klebsiella ornithinolytica*** :

La seule souche isolée est de la pénicillinase haut niveau.

➤ ***Serratia odorifera*** :

Nous avons constaté la présence de phénotype pénicillinase haut niveau (50%), suivi par les phénotypes Céphalosporinase haut niveau et BLSE +céphalosporinase hyperproduite(25%)

➤ ***Serratia marcescens***

Deux souches du même phénotype :Céphalosporinase bas niveau (50%) ,Céphalosporinase hyperproduite (50%).

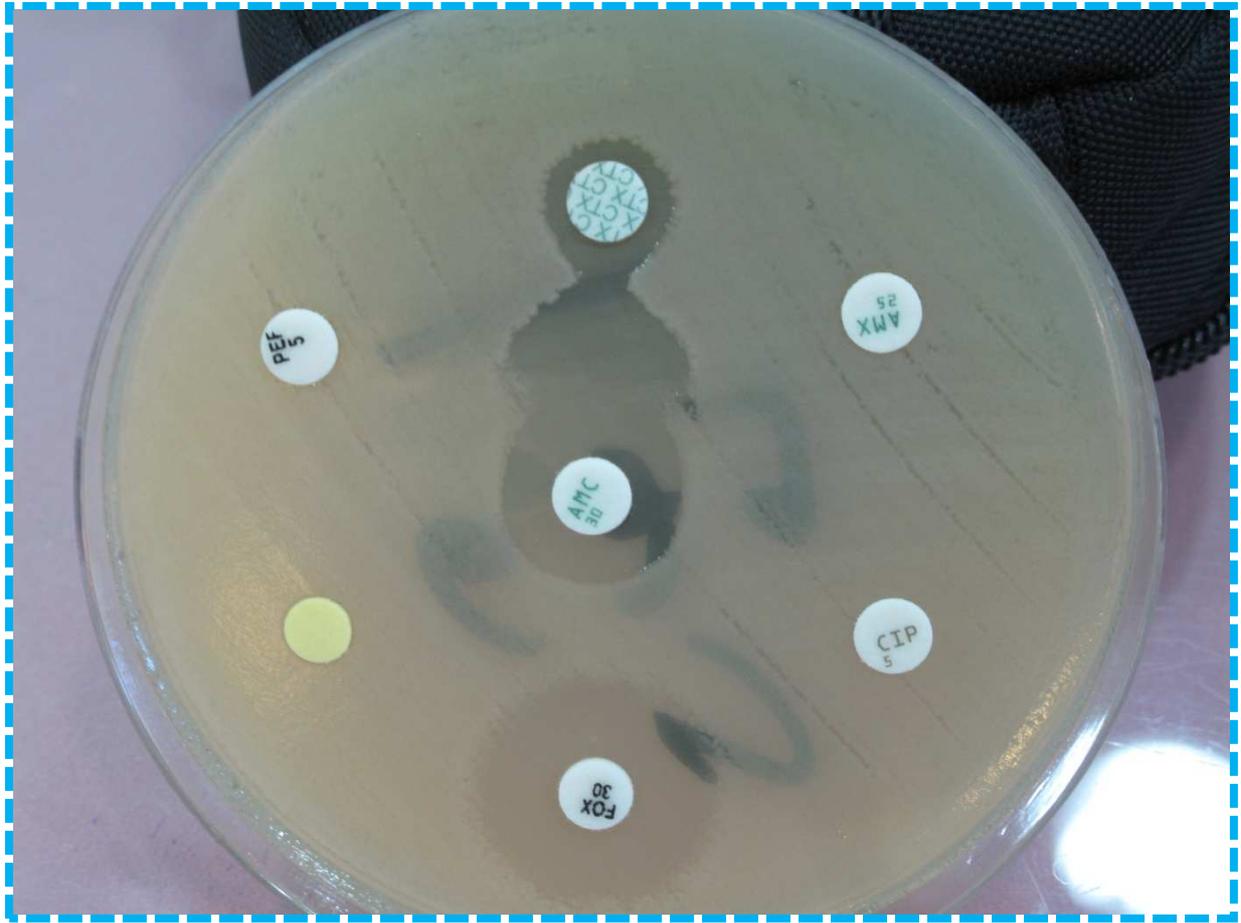
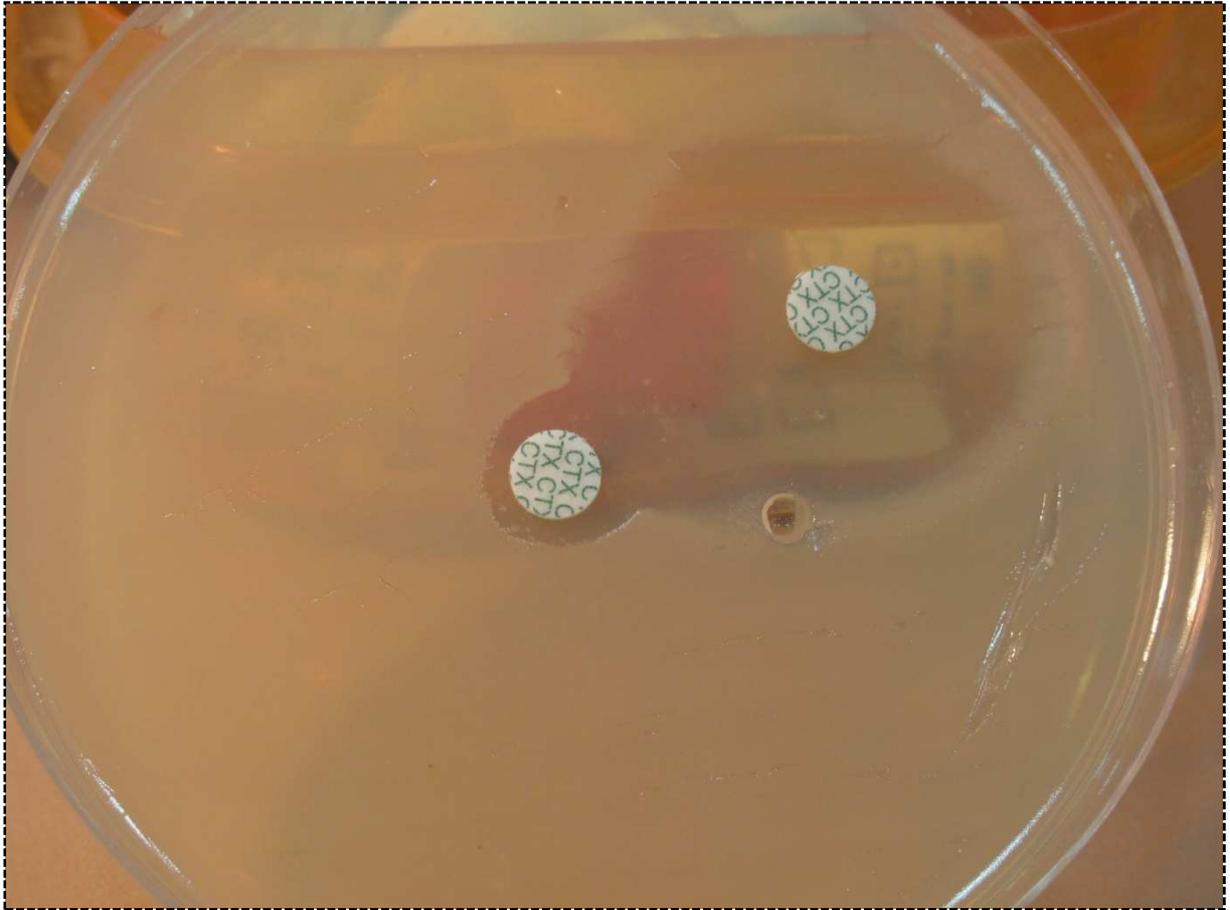


Figure 07 :Test de synergie



**Figure 08 : Test de confirmation
ou technique du double disque**

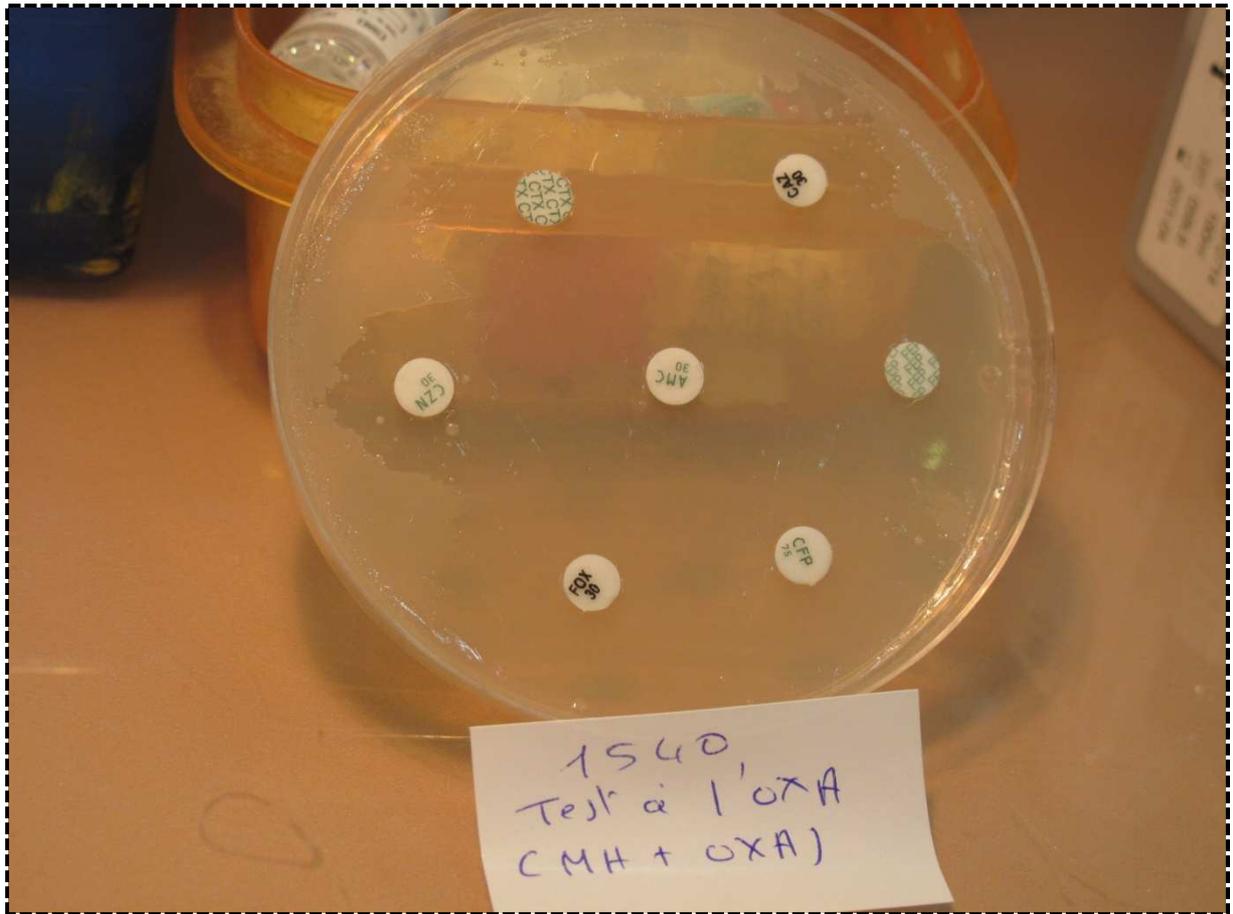


Figure 09 : Test à l'oxacilline

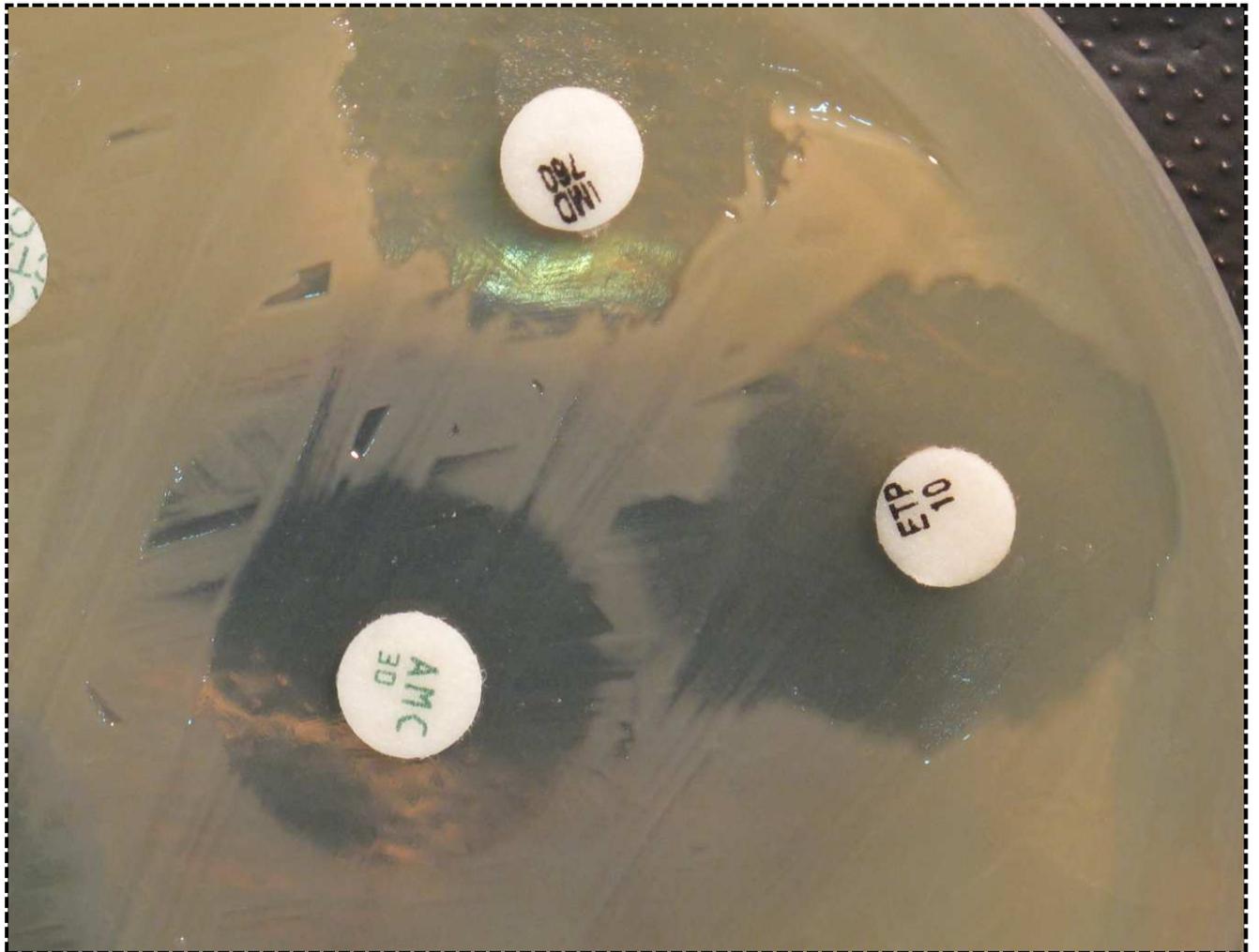


Figure 11 : Test de confirmation du *klebsiella pneumoniae* productrice du carbapénèmase (classe A)

Figure 06 :Différent types de BLSE

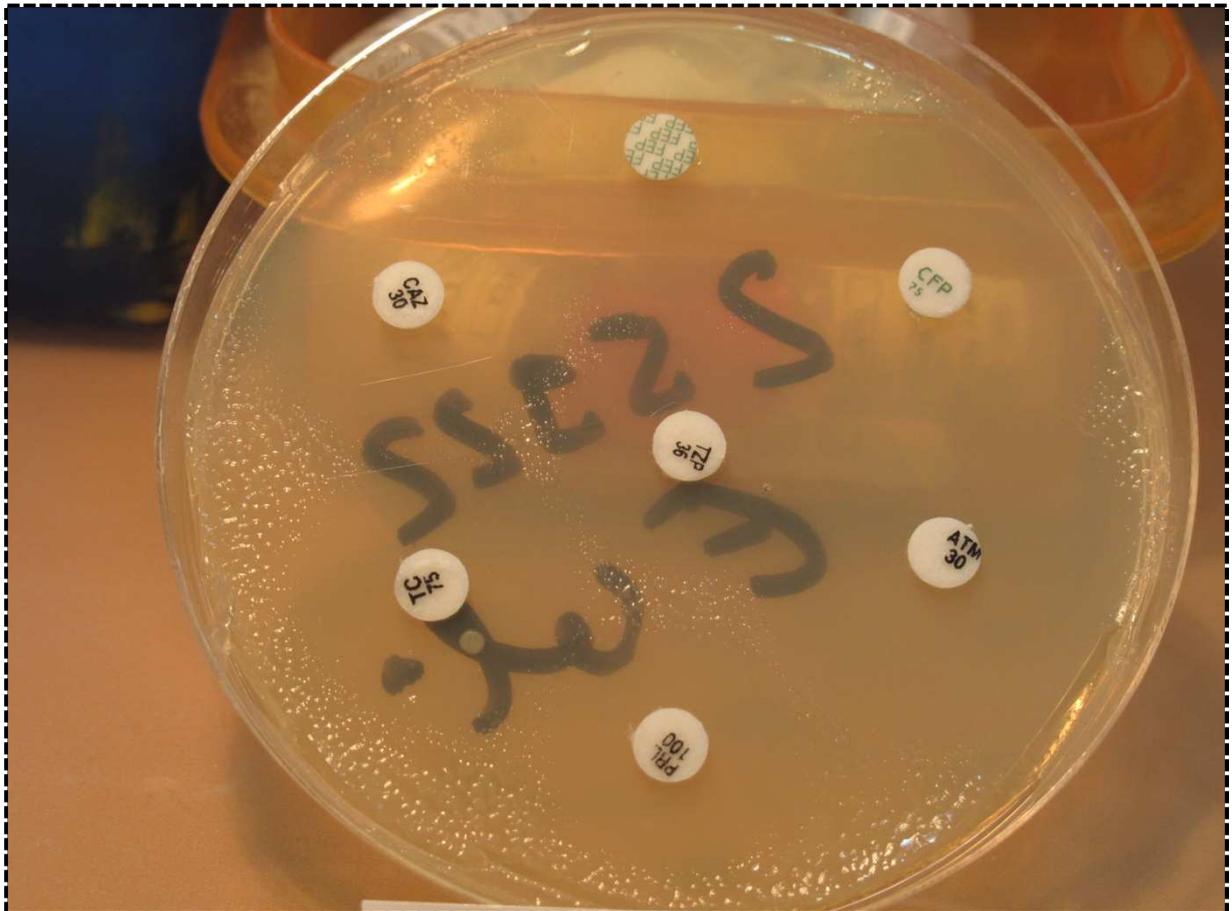


Figure 04 Souche de contrôle ATCC 25922

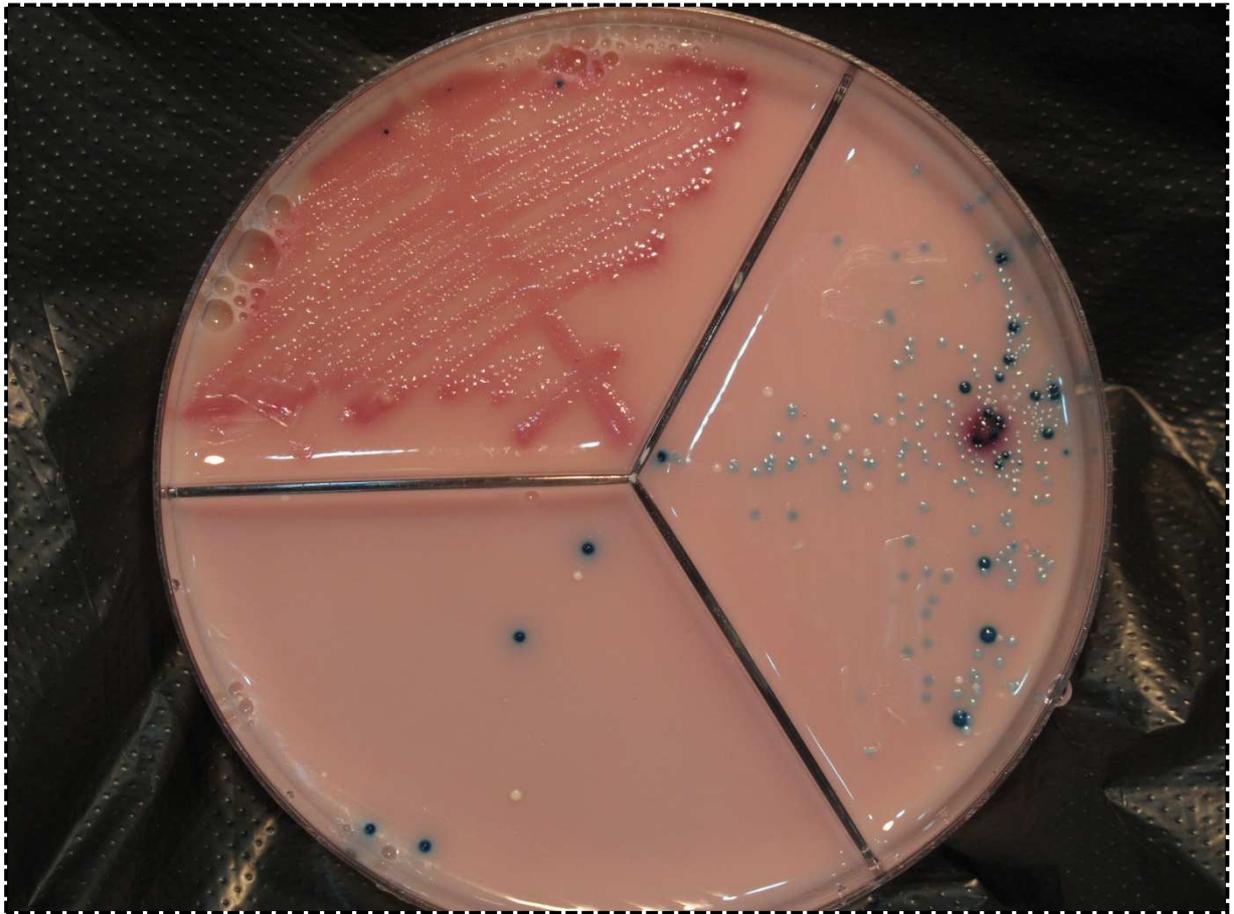


Figure 03 :Milieu chromogène

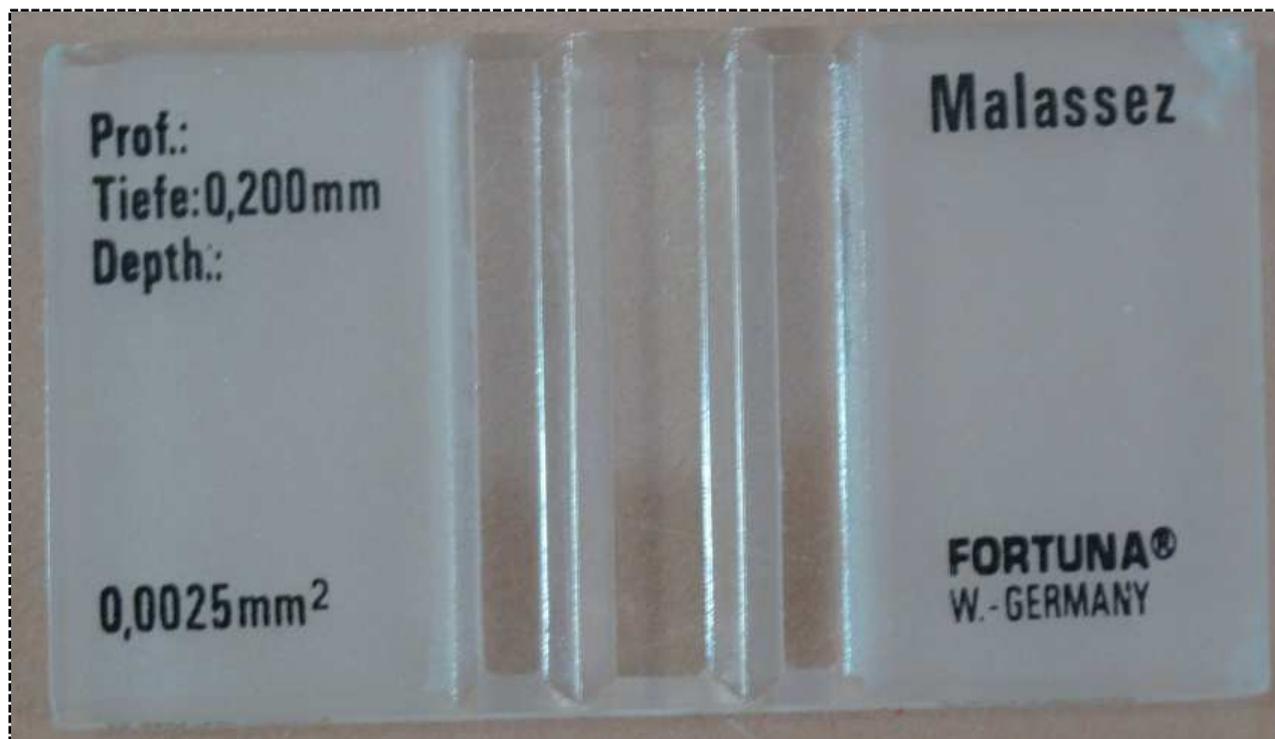


Figure 02 Photo du Malassez

Discussion

Le laboratoire où le travail a été réalisé est un établissement privé qui accueille un nombre appréciable de patients avec une activité diversifiée. Il s'agit du laboratoire d'analyse médical du Dr Ould Rouis qui reçoit quotidiennement des demandes d'analyse de diverse nature. L'ECBU se situe en 11^{ème} position des examens les plus demandés : (7820 ECBU pratiqués durant l'année 2012 contre par exemple 36800 NFS et 30900 glycémies).

L'étude que nous avons réalisée au sein de ce laboratoire d'analyses biologiques, nous a permis:

- D'apprécier l'importance de l'infection urinaire en médecine et biologie de ville.
- D'identifier les germes responsables car le diagnostic bactériologique est essentiel dans la lecture de l'antibiogramme.
- De nous initier à lecture interprétative
- D'approcher les mécanismes de résistance à travers l'étude phénotypique de la résistance aux bêta-lactamines.

La population étudiée comprend 60% de personnes de sexe féminin, tout âge confondu et 40 % de sexe masculin. Les moins de 20 ans représentant le tiers des consultants.

Sur les 2710 prélèvements (20% ont été réalisés au laboratoire) d'urines des patients 436 cas, soit 16,09% se sont révélés positifs aux *Enterobacteries*. Ce taux est relativement proche de ceux (**Y. Sekhsokh et al, 2008**) avec 12%, **de (Tiouit, 2011) et (K.larabi et A.massmoudi, 2002)** qui ont enregistré 15% d'ECBU positifs.

La répartition des prélèvements selon l'âge révèle un taux de positivité élevé dans la tranche d'âge des moins de 9ans (20%), suivie des 20-29 ans avec un taux de 14%.

L'infection urinaire chez les enfants est extrêmement importante à diagnostiquer et à traiter. La plupart du temps il s'agit d'anomalies malformatives du tractus urinaire nécessitant une exploration puis un traitement chirurgical. Si le problème est négligé, une complication redoutable attend l'enfant à long terme : l'insuffisance rénale particulièrement lorsque, en plus, une antibiothérapie aveugle et anarchique est instaurée. Les souches productrices de carbapénémase que nous avons isolées ont été malheureusement retrouvées chez des nourrissons.

Ces constatations sont relativement semblables à celles faites par **(Idriss Iahlou amine,2012)**, qui a retrouvé que la tranche d'âge la plus touchée par l'infection urinaire est celle de 0 mois à 9ans avec un taux de 22 %, ensuite vient la tranche d'âge de 20-29 ans avec un taux de 19,03% et celle de 60 à 69 ans (12%).

L'infection urinaire domine chez les femmes avec une positivité de 75,23% en raison de la brièveté de longueur du l'urètre féminin **(Kamoun 1994)** .

Les résultats de l'identification des germes isolés, révèlent la prédominance des Entérobactéries qui présentent un nombre de 436 germes en cause des infections du tractus urinaire.

L'identification bactérienne a démontré que l'espèce *E. coli* domine largement et est responsable de 69,50% des infections du tractus urinaire. Cela est en rapport avec la physiopathologie de l'infection urinaire qui est généralement due à une forte colonisation du périnée par les Entérobactéries d'origine digestive et en particulier *E.coli*. A cela s'ajoutent des facteurs spécifiques d'uropathogénicité; ainsi *E. coli* possède des adhésines capables de lier la bactérie à l'épithélium urinaire et empêcher ainsi son élimination par les vidanges vésicales **(Larabi et al, 2003)**.

Nos résultats sont proches de ceux de Tiouit **(Tiouit, 2011, laboratoire de microbiologie HCA-A N P, Pr Naim)** , qui a isolé *E. coli* à hauteur de 62,37%.

Il en va de même avec *Klebsiella pneumoniae* (16,74%), et *Proteus mirabilis* (4,82%), taux d'isolement relativement identiques à ceux de Tiouit, **(Tiouit,2011)** qui a trouvé un pourcentage de 11,7 % pour *Klebsiella pneumoniae* et 7,63% pour *Proteus mirabilis*.

Concernant les profils de résistance :

Pour les bactéries du groupe 1, il est à noter que le taux de résistance acquise aux bêta-lactamines chez *Escherichia coli* a surtout été observé pour l'ampicilline amoxicilline (88.45%) et l'association amoxicilline - acide clavulanique (51.16%).

Pour les Cephalosporines : *E.coli* présente un taux de résistance élevé aux céphalosporines de 1ere génération (40.26% à la céfazoline). Les céphalosporines de deuxième génération ne présentent pas d'intérêt dans notre étude car elles se comportent comme celles de première génération.

Les résultats obtenus pour *E.coli* sont comparables à ceux obtenus en 2010 par le réseau de surveillance de la résistance en Algérie (**Rahal, 2010**) qui observe des taux de résistance d'*E.coli* de 71.3% pour l'amoxicilline et de 42.3% pour l'association amoxicilline – acide clavulanique.

Le taux de résistance acquise chez *Proteus mirabilis* est moins élevé par rapport *E.coli* et ceci quelque soit l'antibiotique testé.

Les espèces de ce groupe sont naturellement sensibles aux β -lactamines (phénotype sauvage), mais durant notre étude nous avons remarqué l'apparition d'autres phénotypes de résistance acquise.

S'agissant des Entérobactéries du groupe (01), *E.coli* présente 36,64% de souches à résistance acquise ; les phénotypes de résistance de cette espèce sont dominés par la résistance pénicillinase haut niveau (37,5%), suivi par pénicillinase bas niveau (20,84%).

On note aussi la présence, à différentes proportions, des phénotype extrêmement dangereux : BLSE (10,94%), céphalosporinase haut niveau (4,17%) et BLSE + céphalosporinase hyperproduite +carbapénèmase.(0,52%).

Les espèces de groupe 02 sont naturellement résistantes aux aminopénicillines-carboxypénicillines et uréidopénicillines. Cependant, nous avons remarqué que le taux de résistance est très élevé aux céphalosporines (C1G, C2G, C3G) et qu'il est diminué aux C4G, puisque ce sont des molécules des plus stables.

Deux souches de *klebsiella pneumoniae* présentent un taux de résistance à bêta- lactamine la plus active l'Imipénème :(2,74% de résistances)

En ce qui concerne les phénotypes de résistance acquise, arrive en tête le « pénicillinase haut niveau » (27,66%) pour *Klebsiella pneumoniae* et *Citrobacter koseri* (100%), suivi par le phénotype BLSE chez *klebsiella pneumoniae* et *oxytoca*..

Comme chez *E.coli* , *Klebsiella pneumoniae* possède le phénotype BLSE+céphalosporinase haut niveau +carbapénèmase (4,26%).

Groupe 03 :

Les espèces de ce groupe se caractérisent par une résistance naturelle aux aminopénicillines, à l'association Amoxicilline-Acide clavulanique et aux céphalosporines de 1^{ère} génération (Céfazoline) par la production de céphalosporinases de bas niveau, ce qui explique le taux de résistance très élevé.

La seule souche de *Citrobacter freundii isolée* présentait un taux de résistance de 100% à toutes les céphalosporines.

Nous n'avons pas eu la chance d'isoler les espèces du groupe 04, car elles se rencontrent plus rarement.

Groupe 05 :

Les espèces de ce groupe sont naturellement résistantes aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines et aux céphalosporines de 1^{ère} génération (Céfazoline).

En ce qui concerne la résistance acquise aux céphalosporines (autres que celles de première génération), *proteus vulgaris* présente un taux de résistance élevé (50% des souches isolées).

D'une manière générale, la résistance acquise ou « phénotype résistant » occupe une place importante (279 cas : 64%),

Nos résultats se rapprochent de ceux de (**Idriss Iahlou Amine, 2012**) qui trouvé un taux de 70% du phénotype résistance acquise.

Durant notre étude, nous nous sommes particulièrement intéressé à certains phénotypes de résistance acquise comme BLSE, céphalosporinase hyperproduite, carbapénèmase, ou l'association des trois, d'où la gravité pour le malade lui-même surtout chez l'enfant et leurs effets sur l'écosystème.

Pour cela, nous avons réalisé des tests complémentaires permettant la différenciation entre ces phénotypes « dangereux » : tests de synergie simple, test de synergie par « double disque », test à la cloxacilline.

Une étude des concentrations minima inhibitrices, particulièrement par la méthode de référence s'imposait mais cette dernière, trop fastidieuse à réaliser, nous lui avons préféré le E test qui est la technique la plus utilisée dans le monde en raison de sa facilité d'utilisation.

Il s'agit d'une bandelette de papier buvard contenant un gradient de l'antibiotique à tester. Ce test ne se retrouve que dans le commerce et présente l'inconvénient d'un coût trop élevé, nous n'avons pas encore trouvé de référence parlant de E test confectionné au laboratoire.

Nous avons pu réaliser des E test au laboratoire pour les antibiotiques suivants : gentamicine, cefotaxime, imipénème et amoxicilline-acide clavulanique en utilisant des antibiotiques commercialisés en pharmacie.

Pour un même antibiotique le test a été réalisé avec les souches à tester et en même temps en utilisant une souche témoin d'*E.coli* ATCC 25922 dont la CMI est connue (Eucast).

Des résultats intéressants et prometteurs ont été obtenus avec les différents antibiotiques sauf l'association amoxicilline-clavulanate. De plus, le coût du test est dérisoire (moins de 2 DA) contrairement au E test commercial dont le coût avoisine les 2000 DA pour un seul test. Il nous est apparu donc plus intéressant de réaliser plusieurs tests (3 à 4) en même temps que le contrôle qualité interne (souche témoin) afin de limiter au maximum les erreurs de lecture et s'assurer de la reproductibilité de la technique.

Cette technique « maison » mériterait d'être développée voire expertisée par un travail ultérieur portant sur un nombre important de souches en comparaison avec la technique de référence. L'apport de ce test « maison » pourrait être extrêmement intéressant dans la prise en charge thérapeutique des patients atteints d'infections graves pour lesquels la connaissance de la CMI est d'un apport thérapeutique considérable avec en plus un coût dérisoire.

Il nous apparaît également utile de signaler l'instabilité de certains antibiotiques en disques tels que céfazoline, Imipénème, Amoxicilline-Acide clavulanique surtout lorsqu'ils sont commercialisés par des marques peu prestigieuses. Une solution à ce problème et même à celui de la difficulté d'approvisionnement est la confection de disques au niveau du laboratoire à partir de solution injectables du commerce après dilution convenable pour obtenir des disques contenant la même charge que celle préconisée par le CA SFM , l'EUCAST ou le CLSI. Cette technique fonctionne très bien et l'on atteint les diamètres préconisés avec la souche témoin.

Conclusion

L'étude réalisée nous a permis une approche de l'étude des résistances des entérobactéries isolées en médecine de ville, aux bêta-lactamines. Cette approche a consisté en une lecture interprétative puis en la réalisation de tests complémentaires nécessaires dans la démarche diagnostique pour identifier le ou les phénotypes de résistance incriminés.

Les résultats obtenus sont inquiétants car il ne s'agit pas de souches hospitalières.

Il apparaît clairement qu'une grande rigueur et vigilance doivent être observées au laboratoire pour obtenir un antibiogramme de qualité, une interprétation de qualité qui ne doit plus consister en une simple mesure de diamètres d'inhibition.

La lecture interprétative est indispensable à la qualité du rendu de résultats, elle prend en considération le **diagnostic bactériologique** (l'antibiogramme d'un *E.coli* n'est pas interprétable de la même manière que celui d'une *Klebsiella*), la **molécule testée** en fonction de son groupe et de sa génération, le **foyer infectieux**, la **voie d'administration de l'antibiotique** etc..

Les examens complémentaires réalisés au laboratoire ont été choisis pour leur simplicité d'exécution et sont à portée des laboratoires de routine.

Outre la crainte que peut susciter le pourcentage de Cephalosporinases hyperproduites retrouvées, celui des Carbapénémases l'est encore plus. Le faible pourcentage retrouvé ne doit en aucune façon rassurer mais au contraire inquiéter car annonciateur « d'impasses thérapeutiques » à BMR (bactéries multi résistantes) si aucune mesure préventive n'est initiée car, à ce jour, certains services de médecine continuent d'utiliser l'Ipiménème en première intention.

Matériel non biologique

❖ Verreries

Tubes à vis stériles

Tubes à essai

Lames et lamelles : Utilisées pour l'observation microscopique

Pipettes pasteur : Pour l'inoculation et l'ensemencement

Loupe

Cellules (Nageotte, Malassez)

❖ Appareillage

Microscope optique : Permet l'observation (état frais, coloration de Gram).

Réfrigérateur : Conservation des souches et des réactifs

Etuve : Pour la culture des bactéries

Auto clave : Stérilisation à la vapeur

Séchoir : Sécher les boîtes après les avoir coulées

Bain marie : Pour la transfusion des milieux de culture

Spectrophotomètre : Pour les prises du D.O.

❖ Réactifs et solutions

Eau physiologique à 9 ‰ stériles

Eau distillé stérile

Violet de gentiane

LUGOL

Alcool 90%

Bétadine (désinfectant)

FUSHINE

Bleu de méthylène

Huile de vaseline

Huile à immersion

Eau oxygénée a 10 volumes

Réactif de KOVACS

Réactif de VOGES PROSKAUER 1 et 2 (VP1 , VP2)

Réactif de tryptophane désaminase (TDA)

Réactif de GRIESS (NITRATE REDUCTASE 1 et 2)

Rouge de méthyle (RM)

Staph-aurex latex

❖ **Disques imprégnés**

- Disques d'oxydase
- Disques d'ONPG
- Disques d'antibiotiques

❖ **Autre matériel**

- Bec Bunsen : pour assurer une stérilisation instantanée
- Boîtes de pétri : pour les cultures bactériennes
- Agitateur
- Poire : Pour aspirer les solutions
- Papier hygiénique
- Compresse stériles
- Ecouvillons
- Coton tige
- Anse de platine : utilisée en ensemencement
- Pince métallique
- Pied à coulisse
- Portoirs
- Porte lames

❖ **Milieux de cultures**

- Milieu Cled (Cystine-Lactose-Electrolyte-Diffuse)
- Milieu Muller –Hinton (MH)
- Milieu lactosé Hektoen
- Gélose au sang frais
- Gélose au sang cuit

❖ **Composition des Milieux de cultures**▮ **Milieu CLED (C)**

Le milieu CLED (Cystine Lactose Electrolyte Déficient) est un milieu non sélectif, très utilisé dans l'étude des bactéries contenues dans l'urine. Etant un milieu non sélectif de nombreuses bactéries, tant Gram positif que Gram négatif, pourront s'y développer. L'absence d'électrolytes (pas de NaCl) limite le phénomène d'envahissement par les *proteus*

Composition

Peptones.....	4g
Extrait de viande	3g
Hydrolysât trypsique de caséine.....	4g
L-cystine (la L-cystine est un acide aminé soufré).....	0,128g

Lactose.....	10g
Bleu de Bromothymol (indicateur de pH).....	0,002g
Agar.....	15g
Eau distillée (qsp).....	1L

■ Milieu Mueller Hinton(MH)

La gélose Mueller-Hinton est une gélose riche pour la réalisation de l'antibiogramme standard

Composition

Infusion de viande de bœuf.....	300 ml
Peptone de caséine.....	17,5 g
Amidon de maïs.....	1,5 g
Agar.....	17,0 g
pH = 7,4	

■ Milieu lactosé Hektoen(H)

Milieu utilisé pour l'isolement des *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*.

Composition

Protéase peptone.....	12g
Extrait de levure.....	3g
Lactose.....	12g
Saccharose.....	12g
Salicine.....	2g
Citrate de fer ammoniacal	1,5g
Sels biliaires.....	9g
Fuchsine acide.....	0,1g
Bleu de bromothymol.....	0,065g
Chlorure de sodium.....	5g
Thiosulfate de sodium.....	5g
Agar.....	13-14g

pH=7,5

■ Milieu Chapman(CH)

Le milieu de Chapman est un milieu sélectif, surtout utilisé en microbiologie médicale, permettant la croissance des germes halophiles. Parmi ces germes figurent au premier rang les bactéries du genre *Staphylococcus*, mais aussi les *Micrococcus*, les *Enterococcus*, les *Bacillus*, et de rares bactéries à Gram négatif.

Composition

Composition pour la préparation d'un litre de milieu.

Peptone :.....	10g
Extrait de viande de bœuf :.....	1g
Chlorure de sodium :.....	75g
Mannitol :.....	10g
Rouge de phénol :.....	0,025g
Agar-Agar :.....	15g
Eau distillée :.....	1 Litre

■ Gélose au sang frais(GSF)

C'est un milieu d'isolement enrichi sur lequel les Streptocoques se développent bien. Il permet, la lecture du caractère hémolytique. C'est un milieu riche d'autant plus par la présence de sang.

Préparation

Dans une boîte de pétri mélanger du sang de mouton (ou humain en cas de nécessité) centrifugé en prenant que le culot avec de la gélose Mueller Hinton en faisant des mouvements en 8 en douceur.

Remarque La gélose au sang frais est préparé directement dans la boîte de pétri le jour même de son utilisation.

■ Gélose au sang cuit(GSC)

C'est un milieu d'isolement enrichi préconisé pour l'étude des *Neisseria* notamment le méningocoque. Il est aussi utilisé pour la culture de *Haemophilus influenza*.

Préparation

Se prépare de la même manière que la GSF sauf qu'il faut la stériliser à l'autoclave avant de la couler en boîtes de pétri.

Se prépare de la même manière que la GSF sauf qu'il faut la stériliser à l'autoclave avant de la couler en boîtes de pétri.

❖ Compositions des réactifs et solutions

➤ Solution de lugol

Composition

Iodure de potassium	17 g
Iode métalloïde I ₂	5 g
Eau distillée.....	1 000 L

➤ Violet de gentiane

Composition

Violet de gentiane	1g
Alcool à 90°	10ml
Acide phénique cristallisée	20mg
Eau distillée.....	100ml

➤ Réactifs de TDA

Composition

Perchlorure de fer	3,4 g
Eau distillée	100ml

➤ Réactifs de Kovacs

Composition

Alcool amylique ou isomyline.....	150ml
P.diméthylamino-benzaldéhyde.....	10g
Acide chlorhydrique concentré.....	50ml

➤ Eau physiologique

Composition

Chlorure de sodium.....	8,5g
Eau distillée.....	1L

Tableau 1* : Résumé des mécanismes de résistance par familles d'ATB

Antibiotiques	Mécanisme de résistance	Germes	Support génétique
B-lactamines	B-lactamase	Staphylocoques, Entérocoques Bacilles Gram (-)	Plasmidique ou chromosomique
	Modification de PLP	Staphylocoques et Entérocoques	chromosomique
Quinolones	Modification (gyrase)	Bacilles Gram (-) et Staphylocoques	chromosomique
	Imperméabilité		chromosomique
Aminosides	Enzyme : APH, ANT, AAC	Cocci Gram (+) et bacilles Gram (-)	Plasmidique ou chromosomique
Rifamycines	Transcriptase modifiée	Staphylocoques	chromosomique
Acide fusidique	Modification de la cible (facteur d'élongation G)	Staphylocoques	chromosomique
Glycopeptides		Entérocoques	plasmidique
Sulfamides	-Imperméabilité	Bacilles Gram (-) et Staphylocoques	chromosomique
Triméthoprime	-Modification de la cible -Hyper production de la cible		

(Jehl *et al.*, 2003)

➤ **Céfotaxime:**

- Flacon d'1g du céfotaxime+5ml d'H₂O
- 200mg/1ml
- 200,000µg/1000µl
- 2000µg/10µl
- Dilution à 1/ 3,90 pour obtenir une concentration à 512µg/10µl
- On prend 1ml de céfotaxime +2,90 ml d'H₂O.
- On devise 2000µg/ml sur 512µg/ml C .final (µg/µl)
- 1ml de la solution 512+1ml d'H₂O —————→ 256
- 1ml de la solution 256 ml+1ml d'H₂O —————→ 128
- 1ml de la solution (128) +1ml d'H₂O —————→ 64
- 1ml de la solution (64) +1ml d'H₂O —————→ 32
- 1ml de la solution(32) +1ml d'H₂O —————→ 16
- 1ml de la solution (16) +1ml d'H₂O —————→ 08
- 1ml de la solution (8) +1ml d'H₂O —————→ 04
- 1ml de la solution(4) +1ml d'H₂O —————→ 02
- 1ml de solution (2) +1ml d'H₂O —————→ 01
- 1ml de solution (1) +1ml d'H₂O —————→ 0,5
- 1ml de solution (0,5) +1ml d'H₂O —————→ 0,25
- 1ml de solution(0,25) +1ml d'H₂O —————→ 0,125
- 1ml de solution (0,125) +1ml d'H₂O —————→ 0,062
- 1ml de solution (0,062) +1ml d'H₂O —————→ 0,031

ANNEXE III

1 ml	solution 512µg/ml	+	1 ml d'H2O	256µg/µl
1 ml	256	+	1 ml d'H2O	128µg/µl
1 ml	128	+	1 ml d'H2O	64µg/µl
1 ml	64	+	1 ml d'H2O	32µg/µl
1 ml	32	+	1 ml d'H2O	16µg/µl
1 ml	16	+	1 ml d'H2O	8µg/µl
1 ml	8	+	1 ml d'H2O	4µg/µl
1 ml	4	+	1 ml d'H2O	2µg/µl
1 ml	2	+	1 ml d'H2O	1µg/µl
1 ml	1	+	1 ml d'H2O	0.5µg/µl
1 ml	0.5	+	1 ml d'H2O	0.25µg/µl
1 ml	0.25	+	1 ml d'H2O	0.125µg/µl
1 ml	0.125	+	1 ml d'H2O	0.062µg/µl
1 ml	0.062	+	1 ml d'H2O	0.031µg/µl

Tableau 06 : Lecture de la galerie Api 20 E

TESTS	Composants ACTIFS	REACTION/ENZYMES	RESULTATS	
			NEGATIF	POSITIF
ONPG	2-nitrophényl-BD-galactopyranoside	B-galactosidase (ortho Nitrophényl-BD-Galactopyranosidase)	incolore	Jaune(1)
ADH	L-arginine	Arginine dihydrolase	jaune	Rouge/orangé (2)
^L DC	L-lysine	Lysine Décarboxylase	jaune	Rouge/orangé(2)
ODC	L-Ornithine	Ornithine Décarboxylase	jaune	Rouge/orangé(2)
CIT	Trisodium citrate	Utilisation du citrate	vert pale/jaune	Bleu-vert/bleu(3)
H ₂ S	Trisodium thiosulfate	Production d'H ₂ s	incolore/grisâtre	Dépôt noir/fin liseré
URE	urée	URE ase	Jaune	Rouge/orangé(2)
TDA	L-tryptophane	Tryptophane désaminase	<u>TDA</u> /Jaune	<u>immédiat</u> marron/rougeâtre
IND	L-tryptophane	Production d'indole	incolore Vert pale/jaune	Rose
VP	Sodium pyruvate	Production d'acétoïne (Voges Proskauer)	<u>Vp1+</u> Incolore/rose pale	<u>VP2/10min</u> Rose/rouge
GEL	Gélatine (origine bovine)	Gélatinase (Gélatine)	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	Fermentation/oxydation (Glucose)	Bleu/bleu-vert	Jaune/jaune gris
MAN	D-mannitol	Fermentation/oxydation (Mannitol)	Bleu/bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxydation (Inositol)	Bleu/bleu -vert	Jaune
SOR	D-sorbitol	Fermentation/oxydation (Sorbitol)	Bleu/bleu-vert	Jaune
RHA	L-rhamnose	fermentation/oxydation (Rhamnose)	Bleu/bleu-vert	Jaune
SAC	D-saccharose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MEL	D-melibiose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
AMY	amygdaline	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
ARA	L-arabinose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune

➤ **IMIPENEME :**

Flacon d'Imipénème injectable contenant 500 mg de lyophilisat.

Reprendre le lyophilisat avec 8 ml d'H₂O stérile :

500.000 µg pour 8000 µl

cela correspond à une solution de 625 µg / 10 µl

Dilution à 1/1.22 pour obtenir une concentration de 512µg/10µl

C. finale

1ml d'IMP à 625 µg/10µL + 0.22 ml d'H₂O -----> 512 µg/10µl

1 ml 512	+	1 ml H ₂ O	256
1 ml 256	+	1 ml H ₂ O	128
1ml 128	+	1 ml H ₂ O	64
1 ml 64	+	1 ml H ₂ O	32
1 ml 32	+	1 ml H ₂ O	16
1ml 16	+	1 ml H ₂ O	8
1 ml 8	+	1 ml H ₂ O	4
1 ml 4	+	1 ml H ₂ O	2
1 ml 2	+	1 ml H ₂ O	1
1 ml 1	+	1 ml H ₂ O	0.5
1 ml 0.5	+	1 ml H ₂ O	0.25
1ml 0.25	+	1 ml H ₂ O	0.125
1 ml 0.125	+	1 ml H ₂ O	0.062
1 ml 0.062	+	1 ml H ₂ O	0.031
1 ml 0.031	+	1 ml H ₂ O	0.015
1 ml 0.015	+	1 ml H ₂ O	0.007
1 ml 0.007	+	1 ml H ₂ O	0.003

➤ **TEST à l'EDTA :**

- disques chargés à 750 μg
- Préparation de l'EDTA
- Peser 7.5 g d'EDTA tripotassique
- Diluer dans 100 ml d'eau distillée,
- Cela représente une solution de 7500 mg/100 ml

ou encore 7 500 000 μg / 100 000 μl c'est à dire 750 μg / 10 μl

Solution prête à l'emploi sans dilution.

Tableau 07 : Valeurs limites des diamètres des zones d'inhibition et la concentration minimale inhibitrice pour les souches de référence utilisées pour le contrôle de qualité : (*E.coli* ATCC 25922) (OMS,2010)

Antibiotiques testés	Charge des disques (µg)	Concentrations critiques (mm)		Diamètre critiques (mg/l)	
		S	R	S	R
Ampicilline(AMP)	10	≤2	>8	≥21	<16
Ampicilline/Sulbactam	10/10	≤2/8	>8/8	≥21	<16
Amoxicilline(AMX)	25	≤2	>8	≥23	<16
Amoxicilline/Acide clavulanique(AMC)	20/10	≤2/2	>8/2	≥23	<16
Ticarcilline(TIC)	75	≤8	>16	≥24	<22
Ticarcilline/Acide calvulanique(TTC)	75/10	≤8/2	>16/2	≥24	<22
Pipéracilline(PIP)	75	≤4	>16	≥22	<18
Pipéracilline/Tazobactam (TAZ)	75/10	≤4	>16	≥22	<18
Imipénème (IMP)	10	≤2	>8	≥24	<17
Ertapénème(ERT)	10	≤0,5	>1	≥28	<26
Méropénème(MER)	10	≤2	>8	≥22	<15
Doripénème(DOR)	10	≤1	>4	≥24	<19
Aztréonam(AZT)	30	≤4	>8	≥8	<23
Céfazoline(CZO)	30	≤1	>2	≥18	<12
Céfalotine(CEF)	30	≤8	>32	≥18	<12
Céfamandole	30	≤8	>32	≥22	<15
Céfuroxime(CXM)	30	≤4	>32	≥25	<22
Céfoxitine(FOX)	30	≤8	>32	≥22	<15
Céfotiam(CEF)	30	≤4	>32	≥22	<15
Céfopérazone (CFP)	75	≤4	>32	≥21	<14
Céfotaxime(CTX)	30	≤1	>2	≥26	<23
Ceftazidime(CAZ)	30	≤4	>8	≥21	<19
Céfépime (CEP)	30	≤4	>8	≥21	<19
Céfpirome(CEP)	30	≤4	>8	≥21	<19

Tableau 08 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition

Antibiotiques testés	Charge du disque	Valeurs critiques des diamètres d'inhibition (mm)			CMI critiques ($\mu\text{g/ml}$)		
		Résistant	Intermédiaire	sensible	Résistant	Intermédiaire	Sensible
Amoxicilline +acide clavulanique (AUG)	30 μg	≤ 13	14-17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Amoxicilline(AML)	10 μg	≤ 13	14-16	≥ 17	$\geq 32/16$	4	≤ 2
Céfazoline(CZN)	30 μg	≤ 19	20-22	≥ 23	≥ 8	4	≤ 2
Céphalothine(KF)	30 μg	≤ 14	15-17	≥ 18	\geq		\leq
Céfoxitine(FOX)	30 μg	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Céfotaxime(CTX)	30 μg	≤ 22	23-25	≥ 26	≥ 4	2	≤ 1
Céfixime(CFM)	5 μg	≤ 15	16-18	≥ 19	≥ 4	2	≤ 1
Céftazidime(CAZ)	30 μg	≤ 17	18 -20	≥ 21	> 8	–	≤ 1
Céfopérazone(CFP)	75 μg	≤ 15	16-20	≥ 19	≥ 8	–	≤ 1
Céfprome(CPO)	30 μg	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 8	–	≤ 1
Céfépime(CPF)	30 μg	≤ 14	15-17	≥ 18	> 8	–	≤ 1
Ticarcilline(TIC)	75 μg	≤ 14	15-19	≥ 20	≥ 128	–	≤ 64
Pipéracilline(PIP)	100 μg	≤ 17	18-20	≥ 21	≥ 128	–	≤ 64
Ticarcilline+acide clavulanique(TTC)	85 μg	≤ 22	–	≥ 23	$\geq 128/2$	–	$\leq 64/2$
Aztréonam(ATM)	30 μg	≤ 17	18-20	≥ 21	≥ 32	16	≤ 8
Imipénème(IMP)/Méropénème(MER)	10 μg	≤ 19	20-22	≥ 23	≥ 4	2	≤ 1
Ertapénème(ERT)	10 μg	≤ 19	20-22	≥ 23	≥ 1	0,5	$\leq 0,25$

(OMS,2011)

Références bibliographiques

Adam F., drouillard I., 2003. Sulfamides et association(France),:9p.

Alvarez C., Panon H., Allouche P-Y. et Ghinaissai J-C. 1992 : Infection urinaire principaux aspects épidémiologiques, bactériologiques et clinique feuillet de biologie édition Flammarion : 15-25 p.

Arakawa,Y., Shibata,K., Shibayama,H. Kurokawa t., Yagi,h. Fujiwara and Goto.2000.Convenient test for screening metal-β-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds.j. Clin.microbiol . 38: 40-43p

Auckenthaler R. 1995. Activité antibactériennes : mode d'action, cibles bactériennes(Paris) , :17 -32p.

Avril (J-P), Dabernat H., Denis H., Montiel H., 1992. Bactériologie clinique, 2ème édition : Ellipses, paris, p, 149-151.

Beraud J., 2001. Le technicien d'analyses biologiques, ed : Tec & Doc, Paris, chapitre 8, p, 870-999.

Berche P., Gaillard (J-L), Simonet M., 1988.Bactériologie : Bactéries des infections humaines, ed : Flammarion, Paris, p, 575-580.

Bernard Lobel et Claude-James Sossy ; 2007: Les infections urinaires ; édition Springer-verlage france, paris : p 1

Cavillo (J-D), Fabre R., Jehl F., Rapp C., GarrabeE., 2004. Les béta-lactamines. Emc/ maladies infectieuses (8-004-c-10).

Chabine, 2010 . Les infections urinaires.6^{ème} édition .service d'urologie chu Mustapha Bacha (Alger)

Chanal,C.,R., Bonnet,C. De champs,D.Sirot,r. Labia ,and J. Sirot. 2000: Prevalence of β-lactamases among 1,072 clinical strains of *proteus mirabilis* :a 2-years survey in a french hospital.antimicrob,agent chemother.44:1930-1935.

Cochat P., 1993 :Infection urinaire de l'enfant(adulte non traité).édition du concours médicale (lyon), 3-5

Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.communiqué 2006.

Darbas.H., Marchandine H., Bourgeois.N. 2006:néphrologie.2^{ème} édition, :10p.

Debre B., Saighi D., Peyrennaure M. 2004 Urologie. Edition Masson (paris) , :80-116 p.

Dehecq., Duhmel 2004. Antibiotiques.

Domart A.,Bourneuf J. 1994 Petit Larousse de la médecine .édition Larousse,

Eberlin T., 1997. Les infections microbiennes : physiopathologie, tome 2, éd : Nathan, Paris, p, 45-60.

Fauchere (J-L), Avril (J-L), 2002. Bactériologie générale et médicale, ed : Ellipses, Paris, p, 141-258.

Fauchere J-L. 1997. Bactériologie, techniques en bactériologie chimique. Paris : chez Ellipses, édition Marketing s.a.: p : 65-66

Francois jehl, Monique chomart, Michèle weber, Alain Gérard. 2004:De l'antibiogramme à la prescription ,deuxième édition mars 8-9p .

Grinfled. 1999 Néphrologie urologie. Edition : Sip bannes les dunnes (paris), :135-141p.

Guy I ,1998. Bactériologie médicale. étude cyto bactériologique des produits pathologiques (paris):229p.

Hecq., Duhmel., 2004.Antibiotiques,

Idriss lahlou Amine, 2012 :Laboratoire de recherche et biosécurité, HMIMV « **Rabat** »,4^{ème} journée de Nationales de Biologie Praticienne « **Robinson Club,Agadir :30-31 Mars ,2012** »

Jehl f., Chomart M., Weber.M., Gerard A. 2003. De l'antibiogramme à la prescription, 2^{ème} édition biomérieux,

Joly B., Reynaud A., 2003. Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic, ed : Lavoisier, Paris, p 03-25.

Kamina P., 2005 : Précis d'anatomie clinique. édition malouine (Paris),.Tome IV

Kamoun A., 1994 : **Infections** urinaires dans les uropathies malformative graves de l'enfant.Revue Maghrébine de pédiatrie. Volume IV N=5.

Larpent (J-P) ,2000.introduction à la nouvelle classification bactérienne, ed : Tec & Doc, paris.

Le minor., M veron ,1989: bactériologie médicale. Edition Flammarion,

Marieb E-N., 2000 : Bactériologie humaine, anatomie et physiologie ; édition du Renouveau pédagogique Inc., 454-468p.

Martin et Gounf. I ., 2000 infections et antibiothérapie en réanimation aux urgences et chirurgie. édition arnette,.

Moulin M., coquerel A., 2002. Pharmacologie, 2ème éd : Masson, paris, p, 164-166.

National committee for clinical laboratory standars .2004.performance standard for antimicrobial susceptibility testing.approved standard m 100-s14.

Nauciel C. et vidle (J-L), 2005. Bactériologie médicale : 2ème éd Maissir, Paris, p257.

Nauciel C., 2000 Bactériologie médicale, p:275.

Neuman M., 1990.Vade-mecum des antibiotiques, 5ème éd : Maloine, Paris, p 13-37/219-243.

Neuwirth,C., Siebor E.,duez J.M, pechinot A.and kazmierczak A.1995:Imipenem resistance in clinical isolates of proteus mirabilis associated with alterations in penicillin-binding proteins:335-342p.

Nordman,P., and poirel L. 2002.Emerging carbapenemases in gram negative aerobes.clin.microbiol.infect. 8:321-331p

Philippon A., 2008. La résistance bactérienne : définitions, mécanismes, évolution/EMC : maladies infectieuses, 8-006-n-10

Phillipon,A., Arelt, G. and .Jacoby G.A. 2002.Plasmid-determined ampc-type β -lactamases antimicrob,agents chemother .46:1-11p.

Pilly E., 1997 : Maladies infectieuses. Montnnoency : Appit : 606p

Rahal K., Belouni R., Tali Maamar H, Boudane H, Missoum (M.F.K), Benslimani A., 2005 : 7^{ème} rapport d'évaluation de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. Projet de l'organisation mondiale de la santé : 186p

Regnault (J-P) ,2002.éléments de microbiologie et d'immunologie, Ed : Décane editeur inc, chapitre 30, p, 486-501.

Rouveix B., 1990.Médicaments en pathologie infectieuse Masson. Paris, p42-43.

Schaechler M, Medoff G., 1999: Eisenstein (B-I). Microbiologie et pathologie infectieuse:
Paris Boeck et Larcier: 973p

Singleton P., 1999 : Bactériologie ; édition Paris Dumod ; 332p

Sekhsokh Y., 2008 : Fréquence et sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées
dans les urines, édition Médecine du Maghreb : 13-16 p.

Taxer O., 2004 Urologie. édition du concours médicale (Paris), :15-40 p.

Tiout D., 2001: Traitement antibiotique des infections urinaires, édition Médecine du
Maghreb: 4-71 p.