

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

UNIVERSITE SAAD DAHLAB - BLIDA 1.

FACULTE DE MEDECINE.

DEPARTEMENT DE PHARMACIE.



Pr R. BELOUNI
- Service de
Laboratoire Central
C.H.U de Blida

BACTERIES HAUTEMENT RESISTANTES EMERGENTES ISOLEES AU CHU BLIDA

Thèse d'exercice de fin d'étude
Présentée en vue de l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie
Session : Juin 2017

Présentée par:

- LABRI Nour El Houda
- ZERIZER Fatma

Devant le jury:

- | | |
|----------------------------------|---|
| - Président: Pr. BELOUNI. R | Professeur en Microbiologie USDB Blida -1- |
| - Examinatrice: Dr. BENAMARA. M | M. Assistante en Microbiologie USDB Blida -1- |
| - Examinatrice: Dr. NAIT KACI .A | Assistante en Microbiologie EHS Psychiatrie Blida |
| - Promotrice: Dr. BEROUAKEN. S | M. Assistante en Microbiologie USDB Blida -1- |

EXCLU DU PRET

Remerciement

*Dieu soit loué pour nous avoir illuminé le chemin et prêté la force afin d'accomplir
notre modeste travail.*

Nous tenon à remercier :

*Notre promotrice, Docteur S. BEROUAKEN, pour avoir accepté d'encadrer ce
travail,*

*Pour ses précieux conseils, sa disponibilité et surtout pour son soutien tout le long
de ce travail, ainsi que l'aide et le temps qu'elle nous a consacré pour réaliser ce
travail.*

Les membres du jury pour avoir accepté d'examiner ce travail.

*Toute l'équipe du laboratoire de microbiologie du CHU de BLIDA, unité Frantz
Fanon, et spécialement madame H. TAJAT, pour nous avoir accueilli et pour
leur conseils.*

*Nous tenon aussi à remercier tous nos enseignants et tous ceux qui ont contribué
dans notre formation, et tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la
réalisation de ce travail.*

Merci

Dédicace

Je tiens d'abord à remercier mon dieu le tout puissant, de m'avoir donné le courage et la volonté d'élaborer ce travail.

Je dédie ce modeste travail qui est le fruit de toutes mes années d'études A :

Mes très chers parents, que Dieu me les garde, que je ne saurai jamais les remercier pour tout ce qu'ils m'ont apporté, pour tous les sacrifices qu'ils ont consentis pour faire de moi ce que je suis aujourd'hui, ils m'ont soutenu tout le long de mes études dont la bonté reste sans égale.

Mes très chères sœurs Khadidja et Meriem, mon chère frère Mohamed Abd el Mounaim.

Mes neveux Mohamed et Abd El Moez à qui je leurs souhaite de réaliser le même parcours.

Mes tantes : Souhila, Lila, Soria et Safia.

Mon chère binôme Fatima et à toute sa famille.

Mes amies : Hadjer, Khadidja, Mouna, Soumia, Warda, Ryma, Amina et Samia.

Tous ceux qui auront l'occasion de lire ce travail.

En fin à toutes les personnes qui j'espère m'excuseront de ne pas les avoir cité mais que je les aime quand même.

Nour EL Houda

Dédicace

C'est avec profonde gratitude, énorme plaisir et sincères mots, que je dédie ce mémoire à :

Ma chère grand-mère, Rabea,

Que dieu me la garde, source de tendresse, de noblesse et de sacrifices, les mots sont insuffisants pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous.

Mon cher père, Hakim,

J'ai eu l'occasion aujourd'hui par ce modeste travail de te témoigner toute ma reconnaissance et mon affection filiale. Tu t'es beaucoup investi pour moi et tu mérites le plus bel hommage. Puisse Dieu le Tout Puissant te donner une très longue Vie, une très belle santé afin que je puisse bénéficier pour très longtemps encore de ta présence rassurante.

Mon grand-père AËK et ma mère Nadia, qui ont sacrifié leurs vie pour ma réussite et qui ont éclairé mon chemin par leurs conseils judicieux.

Ma grande sœur Khadidja, son époux et ses enfants, Rihem, Farouk et Aya.

Mes frères, Aboubakeur, Mohamed et Ahmed.

Mes petites sœurs, Halima et Nesrine.

Toute la famille de ma mère.

Mon binôme Houda et toute sa famille.

Mes meilleures amies, Hadjer, Khadidja, Imène, Ryma et Mouna.

Tous qui me sont chers.

Fatima

TABLE DES MATIERES**INTRODUCTION****PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

CHAPITRE I : GENERALITES.....	1
I.1. DEFINITION DES BHRé	1
I.2. LES ENTEROBACTERIES	1
I.2.1. Définition	1
I.2.2. Classification	1
I.2.3. Habitat	1
I.2.4. Caractères bactériologiques	2
I.2.4.1. Caractères morphologiques	2
I.2.4.2. Caractères cultureux	2
I.2.4.3. Caractères biochimiques	2
I.2.4.4. Caractères antigéniques	3
I.2.4.5. Facteurs de virulence	3
I.2.5. Pouvoir pathogène	3
I.3. LES ENTEROCOQUES	4
I.3.1. Définition	4
I.3.2. Classification	4
I.3.3. Habitat	4
I.3.4. Caractères bactériologiques	4
I.3.4.1. Caractères morphologiques	4
I.3.4.2. Caractères cultureux	4
I.3.4.3. Caractères biochimiques	5
I.3.4.4. Caractères antigéniques	5
I.3.4.5. Facteurs de virulence	5
I.3.5. Pouvoir pathogène	6
I.4. LES ANTIBIOTIQUES	6
I.4.1. Définition	6
I.4.2. Classification	6
I.4.2.1. Les bêtalactamines.....	6

I.4.2.2. Les aminosides.....	6
I.4.2.3. Les macrolides.....	7
I.4.2.4. Les glycopeptides.....	7
I.4.2.5. Autres antibiotiques.....	7
I.4.3. Mécanisme d'action des antibiotiques.....	7
I.4.3.1. Antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane.....	7
I.4.3.2. Antibiotiques inhibant la synthèse protéique.....	7
I.4.3.3. Antibiotiques inhibant la synthèse ou le fonctionnement de l'acide nucléique.....	7
I.4.3.4. Antibiotiques agissant sur la membrane cytoplasmique.....	8
I.4.4. La résistance bactérienne.....	8
I.4.4.1. Définition.....	8
I.4.4.2. Types de résistance.....	8
I.4.4.3. Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	8
CHAPITRE II : ENTEROBACTERIES RESISTANTES AUX CARBAPENEMES.....	9
II.1. LES CARBAPENEMES.....	9
II.2. MECANISME D'ACTION DES CARBAPENEMES.....	10
II.3. MECANISMES DE RESISTANCE DES ENTEROBACTERIES AUX CARBAPENEMES.....	10
II.3.1. Association d'une hyperproduction de céphalosporinase ou de BLSE et d'imperméabilité.....	10
II.3.2. Production de carbapénémases.....	10
II.4. CARBAPENEMASES.....	10
II.4.1. Définition.....	10
II.4.2. Classification.....	11
II.4.3. Méthodes de détection.....	13
II.4.3.1. Méthodes phénotypiques.....	13
II.4.3.2. Méthodes génotypiques (techniques de biologie moléculaire).....	19
II.5. EPIDEMIOLOGIE.....	19
II.5.1. Portage.....	19
II.5.2. Mode de transmission.....	20
II.5.3. Données épidémiologiques.....	21
II.6. TRAITEMENT.....	24
II.6.1. Traitement des infections à Entérobactéries sensibles aux carbapénèmes.....	25
II.6.2. Traitement des infections à Entérobactéries résistantes aux carbapénèmes.....	25
II.6.3. Perspectives thérapeutiques.....	26

CHAPITRE III : ENTEROCOQUES RESISTANTS AUX GLYCOPEPTIDES	28
III.1. LES GLYCOPEPTIDES	28
III.2. MECANISME D'ACTION DES GLYCOPEPTIDES	29
III.3. RESISTANCE DES ENTEROCOQUES AUX GLYCOPEPTIDES	29
III.3.1. Mécanisme de résistance	29
III.3.2. Support génétique de la résistance	30
III.3.3. Phénotypes de résistance.....	33
III.4. METHODES DE DETECTION	35
III.4.1. Méthodes phénotypiques	35
III.4.2. Méthodes génotypiques (techniques de biologie moléculaire)	36
III.5. EPIDEMIOLOGIE	36
III.5.1. Portage	36
III.5.2. Mode de transmission	37
III.5.3. Données épidémiologiques	37
III.6. TRAITEMENT	39
III.6.1. Traitement des infections à Entérocoques sensibles aux glycopeptides	39
III.6.2. Traitement des infections à Entérocoques résistants aux glycopeptides	40
III.6.3. Perspective thérapeutiques	41
CHAPITRE IV : PREVENTION	43
IV.1. LES MESURES PREVENTIVES	43
IV.1.1. Le dépistage	43
IV.1.2. Le regroupement et le cohorting des patients	44
IV.1.3. La décontamination: Décolonisation	44
IV.1.4. Le renforcement des mesures d'hygiène	45
IV.1.5. La restriction de l'utilisation des antibiotiques	45
IV.1.6. La surveillance épidémiologique	46
IV.2. CONDUITE A TENIR DEVANT UN PATIENT «CAS »	46
IV.3. CONDUITE A TENIR DEVANT UNE EPIDEMIE	46
IV.4. ENJEUX DE LA MAITRISE DE LA DISSEMINATION.....	47

PARTIE PRATIQUE

CHAPITRE V : MATERIELS ET METHODES	48
V.1. PROTOCOLE ET DUREE DU TRAVAIL	48
V.2. MATERIELS	48
V.2.1. Appareillage	48
V.2.2. Matériel non biologique	48
V.2.3. Matériel biologique	48
V.3. METHODES	49
V.3.1. Prélèvement à visée diagnostique	49
V.3.1.1. Recherche des Entérobactéries productrices de carbapénèmases	49
V.3.1.1.1. Isolement et identification des Entérobactéries	49
V.3.1.1.2. Recherche de la production des carbapénèmases chez les Entérobactéries	53
V.3.1.1.3. Recherche des résistances associées	56
V.3.1.2. Recherche des Entérocoques résistants aux glycopeptides	56
V.3.1.2.1. Isolement et identification des Entérocoques	56
V.3.1.2.2. Recherche de la résistance des Entérocoques aux glycopeptides	62
V.3.1.2.3. Recherche des résistances associées	63
V.3.1.2.4. Etude moléculaire	63
V.3.2. Prélèvement à visée de dépistage	64
V.3.2.1. Recherche du portage digestif des BHRé	64
V.3.2.2. Recherche du portage nasal du SARM chez les patients porteurs de l'ERG	65
V.3.3. Etude du prélèvement de l'environnement	65
V.3.4. Conservation des souches	66
CHAPITRE VI: RESULTATS	67
VI.1. TAUX DE BHRé ISOLEES AU CHU BLIDA	67
VI.2. RESULTATS DE LA RECHERCHE DES EPC	67
VI.2.1. Taux des EPC	67
VI.2.2. Résultats de l'étude des prélèvements à visée diagnostique	68
VI.2.2.1. Aspect épidémiologique	68
VI.2.2.2. Résultats de la détermination du type de carbapénémase	69
VI.2.2.3. Résultats de la recherche de la BLSE	69
VI.2.3. Résultats de l'étude des prélèvements à visée de dépistage	69
VI.3. RESULTATS DE LA RECHERCHE DES ERG	70

VI.3.1. Taux des ERG	70
VI.3.2. Résultats de l'étude des prélèvements à visée diagnostique	70
VI.3.2.1. Aspect épidémiologique	70
VI.3.2.2. Entérocoques résistants aux glycopeptides et résistances associées.....	72
VI.3.3. Résultats de l'étude des prélèvements à visée de dépistage	72
VI.3.4. Résultats de l'étude moléculaire	73
VI.4. RESULTATS DE L'ENQUETE DE L'ENVIRONNEMENT	73
CHAPITRE VII: DISCUSSION.....	75
CONCLUSION	
BIBLIOGRAPHIE	
ANNEXES	

LISTE DES ABREVIATIONS

- AAC6'** : 6'-aminoglycoside-acétyl-transférase
AARN: Algerian Anti-bacterial Resistance Network
ADH : Arginine déshydrogénase
ADN : Acide désoxyribonucléique
AMC: Amoxicilline
AMP : Ampicilline
APHP : Assistance Publique Hôpitaux de Paris
ARN : Acide ribonucléique
ARN 16s : Acide ribonucléique 16s
ARNt : Acide ribonucléique de transfert
ATB : Antibiotique
ATCC: American Type Culture Collection
BCP: pourpre de bromocrésol (bromocresol purple)
BEA : Bile Esculine Azide
BHI : Brain Heart Infusion
BHIB : Brain Heart Infusion Broth
BHRe : Bactéries Hautement Résistantes émergentes
BLSE : Bêta-lactamase à spectre étendu
BMR : Bactéries multirésistantes
BOR: Acide Boronique
C : Celsius
C_x : Carbone numéro X
C3G : Céphalosporines de troisième génération
CAC: Centre Anti-Cancer
CDC: Centers for Disease Control and Prevention
CDT : combined disc test (Test de disque combiné)
CHL : Chloramphénicol
CHU : Centre Hospitalo-Universitaire
CIP: Ciprofloxacine

CLOX: Cloxacilline
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institut
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
CO2 : Dioxyde de carbone
CTX-M-15 : Céfotaximase-Munich
D-ala : D-alanine
ddl : D-Alanine-D-Alanine ligase
DDSTs : synergy double disc test (Test de double disque de synergie)
D-lac : D-lactate
DO : Densité optique
D-ser : D-sérine
DSP : Dissaccharide pentapeptides
DPA: Acide dipicolinique
EARSS : European Antimicrobial Resistance Surveillance System
EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique
ENPC : Entérobactéries non productrices de carbapénèmases
ERG : Entérocoque résistant aux glycopeptides
ERT: Ertapénème
ERY : Erythromycine
ERV : Entérocoque résistant à la vancomycine
EPC : Entérobactéries productrices de carbapénèmases
ESG : Entérocoque sensible aux glycopeptides
FOS : Fosfomycine
GES: Guiana Extended Spectrum
GHN : Gentamycine haut niveau
GN: Gélose nutritive
GSC : Gélose au sang cuit
GSF : Gélose au sang frais
h : heure
HCSP : Haut Conseil de la Santé Publique
I : Intermédiaire
IAS : Infections Associées aux Soins
IM+ED: Imipénème + EDTA

- IMI:** Imipenem-hydrolyzing β -lactamase
IMP : Imipénème
IMPA: Active on imipenem
IN : Infection nosocomiale
InVS : Institut de Veille Sanitaire
IPA : Institut Pasteur d'Algérie
kb : kilo base
KPC : *Klebsiella pneumoniae* carbapénémase
L : Litre
LAP : Leucine amino-peptidase
LDC : Lysine décarboxylase
LGG : *Lactobacillus rhamnosus* GG
LVX : Lévofloxacine
MBL: métallo- β -lactamases
McF : Mac Farland
MEM : Méropénème
MH : Mueller Hinton
MHI : Mueller Hinton Imipénème
MHV : Mueller Hinton Vancomycine
mg : Milligramme
ml : Millilitre
mm : millimètre
NaCl : Chlorure de sodium
NDM: New Delhi metallo- β -lactamase
NMC-A: non-métallo carbapénémase A
ODC: Ornithine décarboxylase
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ONPG : Ortho-nitrophényl-pyrano galactoside
OXA: Oxacillinase
PCR : Polymerase Chain Reaction
PH : Potentiel d'Hydrogène
PLP : Protéine Liant la Pénicilline
PSCIN : Programme Canadien de Surveillance des Infections Nosocomiales

- PYRA : Pyrrolidonyl-Aryl-Amidase
QDF : Quinupristine-Dalfopristine
R : Résistant
RIF : Rifampicine
S : Sensible
SARM : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline
SCN: Staphylocoque à coagulase négative
SHEA: Society for Healthcare Epidemiology of America
SHN : Streptomycine haut niveau
SME: *Serratia marcescens* enzyme
T(+): Témoin positif
T(-) : Témoin négatif
TCY : Tétracycline
TEC : Teicoplanine
Tn : Transposon
VAN : Vancomycine
VIM : Veronain tegron-encoded metallo β -lactamase
VRSA : Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus*
VP : Voges Proskauer
 μ g : Microgramme
 μ l : Microlitre
° : Degré
% : Pour cent
+ : Positif
- : Négatif
 β : Béta
< : Inférieur
> : Supérieur

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : (a)Structure générale des carbapénèmes(b)Structures chimiques des carbapénèmes	9
Figure 2 : Représentation schématique des environnements génétiques des gènes codant pour les carbapénèmases de classe A les plus fréquentes (<i>bla</i> _{KPC})	12
Figure 3: Représentation scématique des environnements génétiques des gènes codant pour les carbapénèmases de classe B les plus fréquentes (<i>bla</i> _{VIM} , <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{GIM} , <i>bla</i> _{NDM})	12
Figure 4 : Représentation schématique des environnements génétiques des gènes codant pour les carbapénèmases de classe D les plus fréquentes (<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{OXA-181})	13
Figure 5 : Schéma proposé par Rosco pour la détection des carbapénèmases type KPC, Métallo-β-lactamases et Oxacillinases.	16
Figure 6 : Test de Hodge modifié.....	17
Figure 7 : Zones d'endémie pour les Entérobactéries productrices de carbapénèmases en fonction du type d'enzyme.	21
Figure 8: Structure chimique des glycopeptides	28
Figure 9 : Résistance aux glycopeptides type vanA.....	30
Figure 10 : Résistance aux glycopeptides type vanB.....	31
Figure 11 : Résistance aux glycopeptides type vanD.....	32
Figure 12 : Résistance aux glycopeptides type vanC.....	33
Figure 13 : Les étapes de l'étude bactériologique des Entérobactéries.....	49
Figure 14: Examen microscopique à l'état frais	50
Figure 15: Aspect des Entérobactéries après coloration de Gram	50
Figure 16: Lecture de l'oxydase	50
Figure 17: Aspect des colonies des Entérobactéries sur GN.....	51

Figure 18 : Aspect des colonies des Entérobactéries sur BCP	51
Figure 19 : Galerie classique des Entérobactéries après incubation	52
Figure 20: Galerie API 20 E après incubation	52
Figure 21: Fiche de résultats de la galerie API 20 E.....	52
Figure 22: Recherche de la production des carbapénèmes chez les Entérobactéries	53
Figure 23: Antibiogramme standard des Entérobactéries (IMP)	53
Figure 24: Préparation des dilutions	54
Figure 25: Préparation des milieux de culture	54
Figure 26 : Lecture des CMI technique de dilution en gélose	54
Figure 27: CMI bandelette de l'IMP	55
Figure 28: Test de Hodge modifié.....	55
Figure 29 : Test de disque combiné à l'EDTA	56
Figure 30 : Entérobactérie productrice de BLSE	56
Figure 31 : Les étapes de l'étude bactériologique des Entérocoques.....	57
Figure 32 : Examen microscopique à l'état frais.....	58
Figure 33: Aspect des Entérocoques après coloration de Gram	58
Figure 34: Aspect de la catalase négative des Entérocoques	58
Figure 35: Aspect des colonies des Entérocoques sur GN.....	59
Figure 36: Aspect des colonies des Entérocoques sur gélose à base de sang	59
Figure 37: Aspect des Entérocoques sur GSC additionné de 6.5% de NaCl	60
Figure 38: Aspect de la suspension bactérienne chauffée avant et après incubation.....	60
Figure 39: Aspect des colonies des Entérocoques sur GSC après chauffage.....	60

Figure 40: Aspect des colonies des Entérocoques sur milieu tellurite de potassium	61
Figure 41: Aspect des colonies des Entérocoques sur milieu MH additionné d'imipénème	61
Figure 42: Galerie API 20 Strep après incubation	61
Figure 43: Fiche de résultats de la galerie API 20 Strep	62
Figure 44: Recherche de la résistance des Entérocoques aux glycopeptides	62
Figure 45: Antibiogramme standard des Entérocoques (VAN et TEC)	62
Figure 46: CMI vancomycine technique de dilution en gélose	63
Figure 47 : CMI bandelette de VAN et TEC	63
Figure 48: Aspect des colonies des Entérocoques sur milieux MH additionnés d'antibiotique	64
Figure 49 : Les différents prélèvements réalisés au niveau de la chambre	65
Figure 50 : Répartition des BHRe isolées au CHU Blida	67
Figure 51: Taux des Entérobacteries productrices de carbapénèmes	67
Figure 52 : Taux des Entérocoques résistants aux glycopeptides	70
Figure 53: Résistance aux antibiotiques des ERG	72

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Caractéristiques majeures des principaux genres d'Entérobactérie	2
Tableau II : Caractères biochimiques de quelques espèces du genre <i>Enterococcus</i>	5
Tableau III : Les différentes classes d'Amber des carbapénèmes	11
Tableau IV : Les caractéristiques des principaux types de résistance aux glycopeptides chez les Entérocoques	34
Tableau V : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et leurs interprétations chez les Entérocoques (VAN, TEC)	35
Tableau VI : Valeurs critiques des concentrations minimales inhibitrices et leurs interprétations chez les Entérocoques (VAN, TEC)	36
Tableau VII : Souches de référence ATCC utilisées	48
Tableau VIII: Répartition des EPC selon le service et le type de prélèvement	68
Tableau IX: Répartition des ERG selon le service et le type de prélèvement	71
Tableau X: Résultats de l'enquête de l'environnement des BHRe	74

RESUME

Les bactéries hautement résistantes émergentes (BHRe) : les Entérobactéries productrices de carbapénèmases (EPC) et les Entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG) ont émergé rapidement dans le monde dès leur première apparition aux Etats-Unis, en effet, ces dix dernières années, nous avons constaté une prévalence croissante des BHRe en Algérie où les récentes données de résistance aux antibiotiques indiquent une situation inquiétante.

Dans le but de déterminer la situation des BHRe au niveau du CHU Blida, nous avons effectué une étude portant sur l'ensemble des BHRe isolées des différents types de prélèvements.

Ce travail a été réalisé au niveau de l'unité de microbiologie du laboratoire central du CHU de Blida, unité Frantz Fanon et s'est réparti en deux volets, une étude rétrospective étalée sur une période de six ans, allant de janvier 2011 à décembre 2016 et une étude prospective ayant duré 04 mois, de janvier 2017 à avril 2017.

La recherche et l'identification des BHRe ont été effectuées par les examens cytbactériologiques des différents types de prélèvements. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée selon les recommandations de CLSI.

65 souches de BHRe ont été isolées des prélèvements des patients hospitalisés ou externes.

Les BHRe ont été majoritairement isolées chez des patients hospitalisés dans les services du Centre Anti-Cancer avec une prédominance des espèces *Klebsiella pneumoniae* pour les EPC et *Enterococcus faecium* pour les ERG.

Un taux de BHRe important au CHU Blida, cela impose une surveillance plus étroite des infections nosocomiales et des moyens de détection plus élaborés au laboratoire pour limiter la diffusion de ces bactéries.

Mots clé : BHRe, EPC, ERG, Carbapénèmes, Glycopeptides, Prévention.

ABSTRACT

Emerging Highly Resistant Bacteria (BHRe) Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) and Glycopeptide-resistant Enterococci (GRE) have emerged rapidly in the world from their first appearance in the United States. Indeed, over the past decade, we have found a growing prevalence of BHRe in Algeria where recent data on resistance to antibiotics indicate a worrying situation.

In order to determine the situation of the BHRe at the Blida hospital, we carried out a study of all the BHRe isolated from the different types of samples.

This work was carried out in the microbiology unit of the central laboratory of Blida University Hospital, unit Frantz Fanon and divided into two parts, a retrospective study spread over a period of six years, from January 2011 to December 2016 and a prospective study lasted 04 months, from January 2017 to April 2017.

Research and identification of BHRe were performed by cytobacteriological examinations of the different types of specimens. The study of antibiotic susceptibility was performed according to CLSI recommendations.

65 strains of BHRe were isolated from inpatient or outpatient samples.

The BHRe were predominantly isolated from patients hospitalized in the services of the Anti-Cancer Center with a predominance of the species *Klebsiella pneumoniae* for the CPE and *Enterococcus faecium* for the GRE.

A high rate BHRe at the Blida University Hospital requires closer surveillance of nosocomial infections and more laboratory detection means to limit the spread of these bacteria.

Key words: BHRe, CPE, GRE, Carbapenems, Glycopeptides, Prevention.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Après les bêta-lactamases à spectre élargi des bacilles à Gram négatif et la méticillino-résistance du *Staphylococcus aureus*, d'autres bactéries et d'autres résistances nous menacent, ce sont les bactéries hautement résistantes émergentes (BHRe) : les Entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC) et les Entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG).

Les BHRe sont des bactéries commensales qui résident principalement au niveau du tube digestif humain avec un fort potentiel de diffusion, elles sont peu virulentes mais, en cas de rupture de l'équilibre hôte bactérie, peuvent être à l'origine de pathologies invasives comme les septicémies, les endocardites et les méningites.

Les carbapénèmes (l'imipénème, l'ertapénème, le méropénème et le doripénème) et les glycopeptides (la vancomycine et la teicoplanine) sont deux familles d'antibiotique dont l'usage est exclusivement hospitalier, elles sont principalement utilisées dans le traitement des infections nosocomiales à bactéries multi-résistantes comme un traitement de dernier recours, la résistance développée contre ces deux familles d'antibiotiques constitue un réel problème de santé publique dans le cadre des échecs thérapeutiques.

Depuis leur première apparition en 1986, les BHRe ont émergé comme d'importants pathogènes responsables des infections nosocomiales et devant les perspectives très réduites de mise à disposition de nouveaux antibiotiques dans les prochaines années, la lutte contre la diffusion de ces BHRe dans les établissements de santé apparaît comme un enjeu majeur de la santé publique vu leurs résistances dans l'environnement, leur manutention accompagnée de la mauvaise pratique des mesures d'hygiène et leur portage de gènes de résistances transmissibles entre bactéries notamment celui de l'ERG au *Staphylococcus aureus*.

Ceci a stimulé une intense recherche pour élucider à la fois l'épidémiologie, les mécanismes de résistance et les facteurs de risque responsables de l'apparition et de la dissémination de ces BHRe dans le but d'améliorer la prise en charge thérapeutique des infections dues à ces bactéries et de limiter la transmission croisée et maîtriser leur dissémination.

Afin de répondre à cet objectif, nous avons réalisé ce travail au niveau du laboratoire central du CHU Blida, hôpital de Frantz Fanon et qui consiste en une :

- Evaluation du taux d'isolement des BHRe au CHU Blida.
- Détermination des caractéristiques épidémiologiques des BHRe isolées.
- Elucidation des méthodes de détection de ces BHRe.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I
GENERALITES

CHAPITRE I : GENERALITES

I.1. DEFINITION DES BHRé :

Les bactéries hautement résistantes émergentes sont des bactéries commensales du tube digestif résistantes à de nombreux antibiotiques, avec des mécanismes de résistance aux antibiotiques transférables entre bactéries et émergentes selon l'épidémiologie connue.

Ainsi, on considèrera comme BHRé :

- Parmi les bacilles à Gram négatif: les **Entérobactéries productrices de carbapénèmases (EPC)** ;
- Parmi les cocci à Gram positif : l'**Enterococcus faecium résistant aux glycopeptides (ERG)** (C. Bouvier-Slekovec 2013).

I.2. LES ENTEROBACTERIES :

I.2.1. Définition :

Les Entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif, aéro-anaérobies facultatifs, utilisant le glucose par voie fermentaire, oxydase négative et réduisant les nitrates en nitrites (nitrate réductase positif) (L. Le Minor et M. Veron 1989 ; J. Freney et al 2000).

Elles sont nommées ainsi parce que la plupart des espèces qui composent la famille des Entérobactéries sont des hôtes, soit normaux, soit pathogènes, du tube digestif de l'homme et des animaux (J-L. Fauchère et J-L. Avril 2002).

I.2.2. Classification :

Selon la classification d'Ewing et al en 1980, les Entérobactéries sont classées comme suit :

Règne : Bacteria

Embranchement : Proteobacteria

Classe : Gamma Proteobacteria.

Ordre : Enterobacteriales

Famille : Enterobacteriaceae

La famille des Enterobacteriaceae regroupe près de 40 genres et 200 espèces, mais seuls une vingtaine d'espèces sont plus communément isolées en bactériologie clinique et appartiennent aux genres Citrobacter, Enterobacter, Escherichia, Hafnia, Klebsiella, Morganella, Proteus, Providencia, Salmonella, Serratia, Shigella, Yersinia.

D'autres genres sont rarement ou exceptionnellement isolés chez l'homme : Cedecea, Ewingella, Erwinia, Kluyvera, Leminorella, Pantoea, Rahnella (J-L. Fauchère et J-L. Avril 2002 ; F. Denis et al 2016).

I.2.3. Habitat :

Parmi les nombreuses espèces d'Enterobacteriaceae certaines sont des commensales de tube digestif de l'homme et des animaux (*Escherichia coli*), d'autres sont des saprophytes retrouvées dans l'environnement et chez les végétaux (Serratia, Klebsiella), alors que d'autres sont des pathogènes spécifiques (Shigella, Salmonella) (J-L. Avril et al 1992 ; J. Grosjean et al 2011).

I.2.4. Caractères bactériologiques :**I.2.4.1. Caractères morphologiques :**

Les Enterobacteriaceae sont des bacilles à Gram négatif avec des extrémités arrondies, de 0.5-1.5µm d'épaisseur et de 2-4 µm de longueur, mobiles à 37°C (à l'exception de *Klebsiella*, *Shigella*), non sporulés et certains sont capsulés (J. Grosjean et al 2011; F-H. Kayser et al 2008).

I.2.4.2. Caractères cultureux :

Les Entérobactéries sont des bactéries aéro-anaérobies facultatifs, non exigeantes, se cultivent facilement sur les milieux ordinaires (gélose nutritive et bouillon nutritive), après 18 à 24 h à 37°C.

Les Entérobactéries se présentent sous deux aspects :

- **Les formes S** (smooth) sont l'aspect habituel au sortie de l'organisme. Les colonies sont lisses, bombées, brillantes et humides, elles ont 2 à 4 mm de diamètre.

Le bouillon est trouble de façon homogène.

- **Les formes R** (rough) s'observent surtout avec des souches ayant subi plusieurs repiquages. Les colonies sont rugueuses, sèches, à contours irréguliers et de teinte mate.

En bouillon, les formes R donnent un aspect grumeleux.

- La gélose lactosée au pourpre de bromocrésol (BCP) et le milieu hektoen sont les milieux sélectifs les plus utilisés pour l'isolement et la différenciation des Entérobactéries à partir des prélèvements biologiques (J-L. Avril et al 1992 ; J. Grosjean et al 2011).

I.2.4.3. Caractères biochimiques :

Les bactéries appartenant à la famille des Enterobacteriaceae partagent les caractères biochimiques suivants : oxydase (-), nitrate réductase (+) et dégrade le glucose par voie fermentaire (L. Le Minor et M. Veron 1989).

D'autres caractères biochimiques permettent la différenciation des genres et des espèces. Ces caractères sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau I : Caractéristiques majeures des principaux genres d'Entérobactérie

	mobilité	H ₂ S	indole	VP	ONPG	Lactose	LDC	ADH
<i>Escherichia coli</i>	+ ¹	- ²	+	-	+ ¹	+ ¹	d	-
<i>Shigella</i>	-	-	d	-	d	-	-	-
<i>Salmonella</i>	+ ³	+ ⁴	-	-	D	-	+ ⁴	d
<i>Citrobacter</i>	+	d	d	-	+	+	-	+
<i>Enterobacter</i>	+	-	-	+	+	+	+	d
<i>Klebsiella</i>	-	-	d	+	+	+	d	-
<i>Serratia</i>	+	-	d	+	+	+	d	-
<i>Proteus</i>	+	d	d	-	-	-	-	-

VP : Voges Proskauer, ONPG : Ortho-nitrophényl-pyrano galactoside, LDC : Lysine décarboxylase, ODC : Ornithine décarboxylase
d : différent selon les souches. D : différent selon les sous-genres de *Salmonella*.

¹ Sauf *E. coli* biovar *alkalescens dispar.* ² Sauf plasmide métabolique.

³ Sauf *S. Gallinarum pullorum.* ⁴ Quelques souches négatives.

(F. Denis et al 2016 ; J-L. Avril et al 1992).

I.2.4.4. Caractères antigéniques :

L'étude des différents antigènes, permet de classer en sérotypes les souches appartenant à une même espèce. La détermination des sérotypes a un grand intérêt épidémiologique pour certaines Entérobactéries (*Salmonelle*, *Shigelle*, *Escherichia coli*), on distingue:

- a. **Antigène O ou somatique** : cet antigène est localisé au niveau de la paroi bactérienne. de nature lipopolysaccharidique, il est en fait l'**endotoxine** bactérienne.
- b. **Antigène H ou flagellaire** : de nature protéique, il n'existe que chez les souches mobiles.
- c. **Antigène K ou capsulaire (antigène Vi)** : polymères linéaires, constitués de polysaccharide acide, quand il est présent, il entoure le corps bactérien. Il empêche les anticorps d'accéder à l'antigène O, ce qui rend les bactéries O inagglutinables.
- d. **Antigènes F** : antigène des protéines des fimbriae d'adhésion (**J-L. Fauchère et J-L. Avril 2002 ; F-H. Kayser et al 2008**).

I.2.4.5. Facteurs de virulence :

La virulence des Entérobactéries est due à la production d'un certain nombre de facteur de pathogénicité, à citer :

- **La capsule** : Elle est de nature polysaccharidique, elle rend la phagocytose plus difficile et inhibe l'action du complément (*Escherichia coli*).
- **Les adhésines** : Elles sont de nature protéique, associée à la biosynthèse des structures filamenteuses (appelées *pili* ou *fimbriae*), qui entourent les corps bactériens à la manière d'une fourrure. Elles permettent aux bactéries d'adhérer spécifiquement aux bordures en brosse des entérocytes de la partie haute de l'intestin grêle et aux hématies (*Escherichia coli* entéropathogène, *Salmonella*).
- **Les toxines** : certains genres peuvent produire une toxine de nature protéique, c'est le cas de :
 - Entérotoxine : soit thermolabile LT (inactivée par un chauffage à 60°C) ou thermostable ST (*Escherichia coli* entérotoxinogène).
 - Shiga toxine : produit de façon constitutive par *Shigella dysenteriae* (**L. Le Minor et M. Veron 1989 ; C. Nauciel 2000**).

I.2.5. Pouvoir pathogène :

Parmi les espèces qui peuvent être isolées chez l'homme, certaines sont constamment pathogènes. D'autres espèces se comportent comme des bactéries pathogènes opportunistes responsables d'infections chez des malades fragilisés.

Les espèces le plus souvent rencontrées en pathologie :

- ***Escherichia coli*** : est la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les infections urinaires, elle peut aussi provoquer des diarrhées par des mécanismes très divers, ainsi que diverses infections communautaires ou nosocomiales.
- ***Salmonella enterica*** : est une espèce qui comprend de très nombreux sérovars pouvant avoir des spécificités d'hôte différente. Les sérovars Typhi et Paratyphi sont spécifiques de l'homme et provoquent une infection systémique, la fièvre typhoïde. Ils se comportent comme des pathogènes intracellulaires.
- ***Shigella*** : capable d'envahir les cellules de la muqueuse intestinale et de provoquer une diarrhée plus ou moins sévère. L'espèce *S. dysenteriae* est la plus pathogène. Elle peut provoquer une dysenterie se propageant sur un monde épidémique.

- **Yersinia** : parmi les trois espèces de *Yersinia* pathogènes pour l'homme, on trouve *Y. pestis*, agent de la peste. *Y. enterocolitica* est surtout responsable de diarrhées. *Y. pseudo-tuberculosis* peut provoquer des adénites mésentériques réalisant des tableaux pseudo-appendiculaires (C. Nauciel 2000 ; J-L. Avril et al 1992).

I.3. LES ENTEROCOQUES :

I.3.1. Définition :

Les Entérocoques sont des bactéries à Gram positif, anaérobies aéro-tolérantes qui se présentent sous forme de coques en courtes chaînes. La famille des Entérococeae comprend une vingtaine d'espèces qui se trouvent dans différents habitats et chez différents hôtes dont les deux espèces les plus fréquemment isolées chez l'homme sont *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* (F-H. Kayser et al 2008 ; C. Nauciel 2000).

I.3.2. Classification :

La classification générale des Streptocoques fécaux a été modifiée dans les années 1980 par la création d'un nouveau genre « *Enterococcus* », plusieurs espèces appartenant antérieurement au genre « *Streptococcus* » ont été transférées vers le genre « *Enterococcus* », ce dernier correspondant aux Streptocoques du groupe sérologique D de la classification de Lancefield (M-V. Assous et al 1999).

Selon la classification de Klipper-Baiz 1984 :

Règne : Bacteria

Division : Firmicutes

Classe : Bacilli

Ordre : Lactobacilliales

Famille : Enterococcaceae

Genre : *Enterococcus*

I.3.3. Habitat :

Les Entérocoques sont ubiquitaires, ils font partie de la flore normale du tractus intestinal de l'homme, ils peuvent aussi coloniser la peau, la région périnéale et le vagin, ils sont également présents dans la flore digestive des animaux et dans l'environnement : eau, sol et aliments (M-V. Assous et al 1999; J. Grosjean et al 2011).

I.3.4. Caractères bactériologiques :

I.3.4.1. Caractères morphologiques :

Les Entérocoques sont des cocci à Gram positif, sphériques ou ovoïdes en courtes chaînes, la taille de chaque élément est inférieur à 2 µm, ils sont souvent rapprochés en diplocoques au sein de la chaîne, ils ne sporulent pas, rarement capsulés et immobiles (à l'exception de quelques espèces : *Enterococcus casseliflavus* et *Enterococcus gallinarum*)

(J-L. Avril et al 1992 ; J. Grosjean et al 2011).

I.3.4.2. Caractères culturaux :

Les Entérocoques sont des bactéries anaérobies aéro-tolérantes, leur culture est favorisée par le CO₂ ou anaérobiose, la température optimale de croissance est 35C°, mais ils poussent aussi à 10C° et à 60C°. Ce sont des bactéries non exigeantes, elles poussent sur gélose nutritive et sur gélose au sang. Les Entérocoques poussent aussi en présence de 6.5% de NaCl et à PH 9.6.

Le métabolisme est fermentatif avec formation d'acide L-lactique comme produit final de la fermentation du glucose. Ils hydrolysent l'esculine en présence de 40% de bile.

Des milieux sélectifs à base d'antibiotiques (l'acide nalidixique et la colistine) permettent d'isoler les Entérocoques d'un échantillon polymicrobien (L. Le Minor et M. Veron 1989 ; J. Fauchère et J-L. Avril 2002).

I.3.4.3. Caractères biochimiques :

L'identification de différentes espèces est réalisée par les caractères biochimiques.

Certains paramètres sont en commun avec le genre *Streptococcus*, comme la production de Leucine aminopeptide (LAP).

Les caractères communs de la famille des Enterococcaceae sont :

Oxydase (-) Catalase(-) Pyrolydonyl-aryl-amidase PyrA(+) Esculine(+) Lactose(+) Sorbitol(-) Mannitol(+) Gélatinase(-) Arginine(+) Gaz(-) ADH(+) (J. Grosjean 2011).

Les caractères permettant la différenciation entre les différentes espèces du genre *Enterococcus* sont cités dans le tableau suivant :

Tableau II : Caractères biochimiques de quelques espèces du genre *Enterococcus*

	hémolyse	Esc	Tel	Pyr	Ara	Sac	Lac	Arg
<i>E. faecalis</i>	β	+	+	+	-	+	+	+
<i>E. faecium</i>	α	+	-	-	+	D	+	+
<i>E. durans</i>	α, β	+	-	-	-	-	+	+
<i>E. hirae</i>	α	+	-	-	-	+	+	+
<i>E. avium</i>	α	+	-	-	+	+	+	-
<i>E. gallinarum</i>	β	+	D	-	+	+	+	+
<i>E. casseliflavus</i>	α	+	+	-	+	+	+	+
<i>E. viridans</i>	α	+	-	-	-	+	+	-

Esc : esculine, Tel : tellurite, Pyr : pyruvate, Ara : arabinose, Sac : saccharose, Lac : lactose, Arg : arginine, + : positive, - : négative, D : divers.

(L. Le Minor et M. Véron 1989)

I.3.4.4. Caractères antigéniques :

L'antigène du groupe des Entérocoques est l'antigène D de Lancefield, formé par l'acide teicoïque et fixé sur la paroi, associé ou non aux lipides. L'antigène polyosidique de la paroi cellulaire est spécifique de type chez certains Entérocoques (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus avium*)

(J. Freney et al 2000 ; L. Le Minor et M. Veron 1989).

I.3.4.5. Facteurs de virulence :

L'hémolysine-bactériocine et le facteur d'agrégation, codés tous les deux par des gènes plasmidiques, semblent être les deux facteurs de virulences de ce genre.

Certaines souches d'*E. faecalis* sous espèce *zymogène*, élaborent une hémolysine dont le déterminisme génétique est plasmidique. Cette hémolysine est une toxine oligomérique, formée par l'association de deux protéines distinctes mais inséparables : une hémolysine β -bifactorielle et une bactériocine.

Quant au facteur d'agrégation, c'est une adhésine de nature protéique qui vient tapisser la surface cellulaire de la cellule donatrice sous l'influence d'une phéromone produite par les cellules réceptrices et permet ainsi la formation d'agrégat cellulaire améliorant le transfert plasmidique qui se fait à une haute fréquence par conjugaison.

D'autres substances sont élaborées par *E. faecalis* notamment une protéase et une hyaluronidase (L. Le Minor et M. Veron 1989 ; F-H. Kayser et al 2008).

I.3.5. Pouvoir pathogène :

Dans les infections humaines, *E. faecalis* et *E. faecium* représentent 90% des isolats.

La majorité des infections à Entérocoques sont acquises à partir de la flore du malade. Ces bactéries sont peu virulentes. Les infections se développent souvent chez des malades ayant une pathologie sous-jacente, néoplasie ou immunodépression.

Les Entérocoques sont responsables d' :

- **Infections urinaires:** le plus souvent secondaires à une exploration urologique.
- **Endocardites :** évoluant sur un mode subaiguë, sur valve native ou sur prothèse, et survenant après exploration digestive ou urologique.
- **Infections intra-abdominales (biliaires):** péritonites, infections du tractus biliaire, souvent polymicrobien.
- **Infections néonatales :** possible (J. Grosjean et al 2011 ; J-L. Fauchère et J-L. Avril 2002).

I.4. LES ANTIBIOTIQUES :

I.4.1. Définition :

Les antibiotiques sont des molécules à activité antibactérienne. D'origine biologique, semi synthétique ou synthétique, et qui sont soit bactériostatiques soit bactéricides à doses faibles.

Ils agissent spécifiquement sur des cibles moléculaires perturbant une étape essentielle du métabolisme des bactéries (A. Benslimani et al 2010 ; J. Fauchère et J-L. Avril 2002).

I.4.2. Classification :

La classification des antibiotiques (ATB) repose sur leurs structures chimiques et leurs mécanismes d'action, lesquels conditionnent leurs spectres d'activités (L. Le Minor et M. Véron 1989).

I.4.2.1. Les bêtalactamines : la famille des bêtalactamines représente à elle seule environ 50% d'antibiotiques disponibles, ils sont bactéricides et peu toxiques. Les bêtalactamines sont eux-mêmes classés selon leurs structures chimiques et leurs spectres d'activités en :

- **Les pénames (les pénicillines) :** Pénicilline G, V, M, A, Carboxypénicillines, Amidinopénicillines, Uriédopénicillines.
- **Les céphèmes :** Céphalosporines, Oxa-1-céphèmes, Céfamycines.
- **Les monobactames :** Azétidinones.
- **Les inhibiteurs des bêtalactamases (seuls ou en association) :** Acide clavulanique, Sulbactam, Tazobactam.
- **Les pénèmes :** Les carbapénèmes (Imipénème) (Y. Mouton et al 1997).

I.4.2.2. Les aminosides: ce sont des hétérosides naturels à large spectre d'action, fortement et rapidement bactéricides, ils doivent être réservés aux infections sévères à bacilles à Gram négatif et à staphylocoques (F-H. Kayser et al 2008).

I.4.2.3. Les macrolides : les macrolides utilisés en thérapeutiques ont un macrocycle lactone à 14, 15, ou 16 atomes de carbone (14 atomes : érythromycine, 15 atomes : azytromycine, 16 atomes : josamycine, spiramycine), ils sont actifs sur les cocci à Gram positif et à Gram négatif, les Chlamydiae et les Mycoplasmes (C. Nauciel 2000).

I.4.2.4. Les glycopeptides : antibiotiques à structure complexe hétérocyclique associant une partie peptidique, une partie osidique et des chaînes d'acides gras. Leur spectre d'action est étroit, ils agissent sur les bactéries à Gram positif (A. Benslimani et al 2010).

Ce groupe comprend la vancomycine et la teicoplanine qui sont utilisées en milieu hospitalier dans le traitement des infections sévères à cocci à Gram positif.

I.4.2.5. Autres antibiotiques : les cyclines, la fosfomycine, l'acide fucidique, les sulfamides, les imidazolés, les nitrofuranes, les phénicolés, les polypeptides, les quinolones (Y. Mouton et al 1997 ; A. Bryskier 1999).

I.4.3. Mécanisme d'action des antibiotiques :

Les antibiotiques agissent par différents mécanismes sur l'une des étapes du métabolisme bactérien.

I.4.3.1. Antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane :

Le peptidoglycane est un polymère réticulé fait des chaînes polysaccharidiques reliées par des peptides. Cette molécule n'existe que chez les bactéries et assurent la rigidité de la paroi. Lorsque les bactéries sont en phase de croissance, il existe simultanément des phénomènes de synthèse et de destruction du peptidoglycane. L'équilibre entre ces deux phénomènes est rompu par les antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane. Il en résulte une altération de la paroi ayant un effet létal pour la bactérie. Les antibiotiques agissant sur la synthèse du peptidoglycane comprennent les bêta-lactamines, les glycopeptides et la fosfomycine (C. Nauciel et J-L. Vilde 2007).

I.4.3.2. Antibiotiques inhibant la synthèse protéique :

Plusieurs familles d'antibiotiques peuvent inhiber, par plusieurs mécanismes, l'élongation de la chaîne polypeptidique chez les bactéries (C. Nauciel 2000).

a. Antibiotiques inhibiteurs de la sous-unité 30S des ribosomes :

En se fixant sur la sous-unité 30S, les antibiotiques perturbent l'une des étapes de la synthèse protéique. Certains ATB perturbent la lecture des ARN messagers, d'où la production bactérienne des protéines anormales non fonctionnelles (aminosides), d'autres ATB bloquent la phase d'élongation de la synthèse protéique (les tétracyclines, l'acide fusidique) (A. Benslimani et al 2010).

b. Antibiotiques inhibiteurs de la sous-unité 50S des ribosomes :

En se fixant sur la sous-unité 50S, les macrolides et apparentés peuvent empêcher la fixation de l'ARNt au site peptidyle et donc la formation de la liaison peptidique (J-P. Regnault 1990).

I.4.3.3. Antibiotiques inhibant la synthèse ou le fonctionnement de l'acide nucléique :

a. La synthèse de l'acide nucléique :

Les antibiotiques inhibant le métabolisme intermédiaire comprennent les sulfonamides et le triméthoprime en agissant sur la synthèse de l'acide tétrahydrofolique (F-H. Kayser et al 2008).

b. Le fonctionnement de l'acide nucléique :

Les agents antimicrobiens inhibiteurs de fonctionnement des acides nucléiques agissent en inhibant l'ADN polymérase ou l'ARN polymérase, en bloquant de ce fait respectivement la répllication ou la

transcription. Les antibiotiques agissant sur les acides nucléiques comprennent les quinolones, les nitro-imidazoles et la rifamycine (L-M. Prescott et al 2010 ; C. Nauciel et J-L. Vilde 2007).

I.4.3.4. Antibiotiques agissant sur la membrane cytoplasmique :

La polymyxine B et la colistine sont les antibiotiques agissant sur la membrane cytoplasmique, ils sont bactéricides en se fixant sur certains constituants des membranes interne et externe des bactéries, et modifient la perméabilité de ces structures (A. Benslimani et al 2010).

I.4.4. La résistance bactérienne :

I.4.4.1. Définition :

Une bactérie est dite résistante lorsqu'elle supporte une concentration d'antibiotique nettement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres bactéries de la même espèce, cette résistance peut être due à plusieurs mécanismes (C. Nauciel et J-L. Vilde 2007 ; A. Benslimani et al 2010).

I.4.4.2. Types de résistance :

Il existe deux types de résistance :

- **Résistance naturelle** : c'est une caractéristique propre à une espèce bactérienne, qui est partagée par toutes les souches de cette espèce. Elle est liée à son patrimoine génétique (C. Gaudy et J. Buxeraud 2005 ; L. Le Minor et M. Veron 1989).

- **Résistance acquise** : résulte d'une modification du patrimoine génétique. Il peut s'agir d'une mutation portant sur le chromosome qui peut entraîner, par exemple, une modification de la cible de l'antibiotique ou bien diminuer sa pénétration ou le plus souvent il s'agit de l'acquisition d'ADN étranger pouvant provenir de la même espèce ou d'espèces bactériennes différentes (C. Nauciel et J-L. Vilde 2007).

I.4.4.3. Mécanismes de résistance aux antibiotiques :

On peut classer les mécanismes de résistance en :

a. Résistance par inactivation enzymatique d'antibiotique :

C'est l'un des mécanismes le plus souvent en cause, les bactéries produisent des enzymes qui inactivent l'antibiotique soit par modification de sa structure chimique ou par hydrolyse.

Exemple : les bêta-lactamases (enzymes inactivent les bêta-lactamines), le chloramphénicol acétyltransférase (enzyme inactive le chloramphénicol) (J-P. Lavigne 2007 ; C. Nauciel et J-L. Vilde 2007).

b. Résistance par défaut de pénétration de l'antibiotique dans la bactérie :

Le défaut de pénétration peut être dû à deux mécanismes, diminution de la perméabilité de l'antibiotique et le phénomène d'exclusion.

***Diminution de la perméabilité** : transport diminué des antibiotiques de l'extérieur vers l'intérieur, à travers les membranes.

* **Phénomène d'exclusion** : transport actif des antibiotiques de l'intérieur vers l'extérieur par les pompes d'efflux de la membrane cytoplasmique (F-H. Kayser et al 2008).

c. Résistance par modification de la cible :

Après la pénétration cellulaire de l'antibiotique, il existe une étape de reconnaissance de la cible. C'est à ce niveau qu'intervient ce type de résistance.

- Modification des protéines liants la pénicilline (PLP) : par la production d'une nouvelle PLP ayant une très faible affinité pour les bêta-lactamines.

- Modifications de l'ARN-polymérase (C. Nauciel 2000 ; C. Gaudy et J. Buxeraud 2005).

CHAPITRE II
ENTEROBACTERIES
PRODUCTRICES DE
CARBAPENEMASES

CHAPITRE II : ENTEROBACTERIES RESISTANTES AUX CARBAPENEMES

II.1. LES CARBAPENEMES :

Les carbapénèmes sont une classe d'antibiotiques appartenant à la famille des bêta-lactamines, ayant le spectre d'activité antimicrobienne le plus large, leur excellente activité antibactérienne est liée en particulier à la rapidité de leur pénétration à travers la paroi externe des bacilles à Gram négatif et à leurs stabilité vis-à-vis de la plupart des bêta-lactamases. Les carbapénèmes ont un usage exclusivement hospitalier et sont principalement utilisés dans le traitement des infections nosocomiales à bactéries multi résistantes (A. Boutet-dubois et al 2012 ; L. Dortet et al 2013).

Les molécules de cette famille actuellement commercialisées sont l'imipénème, l'ertapénème, le méropénème et le doripénème (L. Poirel et al 2013).

Les carbapénèmes sont des β -lactamines qui, à la différence des pénicillines, possèdent un atôme de carbone au lieu d'un soufre en position 1, et une liaison insaturée en C2-C3. Leur stabilité aux β -lactamases est due à la transorientation des atomes d'hydrogène en C5 et C6, et à la présence d'une chaîne hydroxyéthyle en C6, en place de la chaîne acylamino des pénicillines et des céphalosporines (Figure 1). Des modifications de substituant en position 2 sont responsables d'un gain d'activité in vitro du méropénème et du doripénème sur les bacilles à Gram négatif (J-R. Zahar et al 2011).

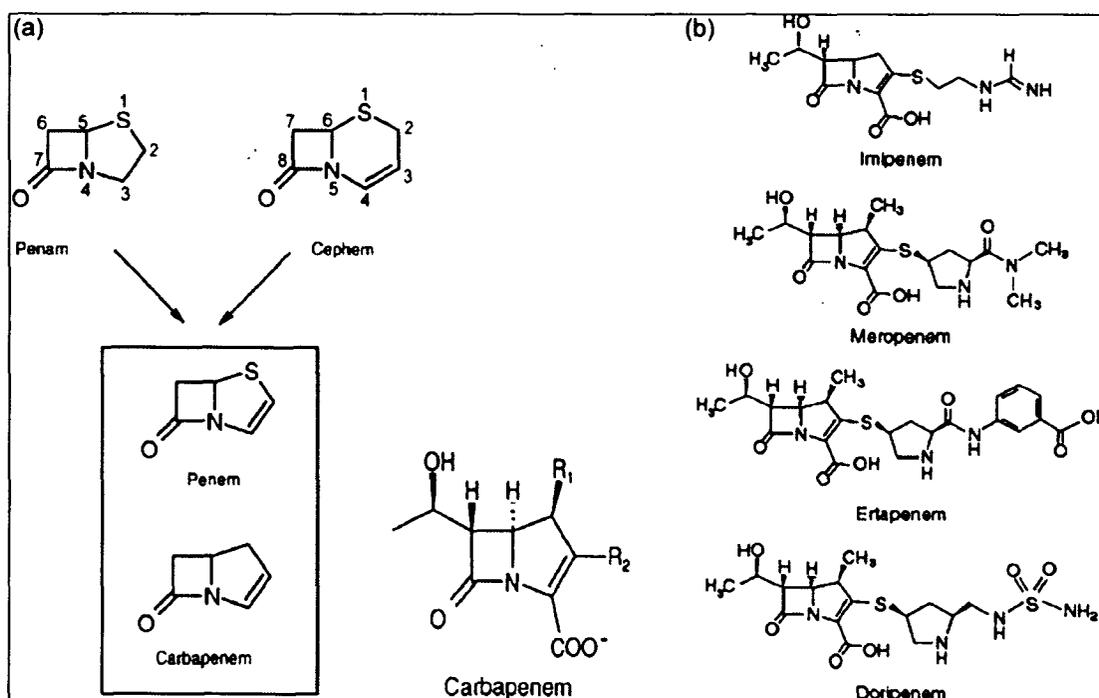


Figure 1 : (a) Structure générale des carbapénèmes

(b) Structures chimiques des carbapénèmes

(M. Wolff et al 2008).

II.2. MECANISME D'ACTION DES CARBAPENEMES :

Les carbapénèmes inhibent la biosynthèse du **peptidoglycane**, principal constituant de la paroi des bactéries (L. Le Minor et M. Veron 1989).

Ils exercent leur activité bactéricide en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne par fixation aux protéines de liaison à la pénicilline (PLP), ces protéines sont des enzymes impliquées dans la phase finale de la synthèse de peptidoglycane, inhibant ainsi l'étape de transpeptidation nécessaire à sa synthèse (N. Grall et al 2011).

Leur affinité pour les différentes PLP varie selon les molécules, ce qui explique en partie leur différence d'activité. Ainsi, l'imipénème se lie préférentiellement à la PLP2, puis à la PLP1a et 1b, et possède une faible affinité pour la PLP3. Le méropénème et l'ertapénème se lient fortement à la PLP2 puis à la PLP3, et ont une forte affinité pour la PLP1a et 1b. L'affinité du doripénème pour les différentes PLP dépend de l'espèce bactérienne (J-R. Zahar et al 2011).

II.3. MECANISMES DE RESISTANCE DES ENTEROBACTERIES AUX CARBAPENEMES :

La résistance des Entérobactéries aux carbapénèmes peut résulter de deux mécanismes différents. L'un combine la production d'une céphalosporinase hyperproduite ou d'une β -lactamase à spectre étendu (BLSE) à celle de la perte d'une porine, l'autre consiste en la production d'une carbapénémase (M. Abbas et al 2012).

II.3.1. Association d'une hyperproduction de céphalosporinase ou de BLSE et d'imperméabilité:

Ce mécanisme associe une hyperproduction des céphalosporinases (chromosomiques ou plasmidiques) ou de production de β -lactamase à spectre étendu (BLSE) à une imperméabilité dû à une altération quantitative ou qualitative des protéines transmembranaires, les porines, permettant l'accès des carbapénèmes à l'espace périplasmique.

Ce mécanisme a été décrit il y a plus de vingt ans tout d'abord chez *Enterobacter sp* puis chez d'autres espèces d'Entérobactéries qui produisent naturellement une céphalosporinase (*Serratia sp*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*...).

Ce mécanisme est peu transmissible, donc peu inquiétant du point de vue épidémiologique, ces bactéries ne sont pas considérées comme des BHRé, bien qu'elles puissent être à l'origine de petites épidémies (C. Droit 2015 ; P. Nordmann et A. Carrer 2010).

II.3.2. Production de carbapénémases :

Ce mécanisme est lié à une production de carbapénémase, une enzyme hydrolysant les carbapénèmes.

II.4. CARBAPENEMASES:

II.4.1. Définition:

Les carbapénémases sont des β -lactamases ayant une activité hydrolytique vis à vis des pénicillines, dans la plupart des cas des céphalosporines et, à des degrés divers, des carbapénèmes et des monobactames, ces enzymes peuvent être présentes naturellement chez certaines bactéries (*Bacillus*, *Aeromonas*...), ou acquises à travers des éléments génétiques mobiles (intégrons ou transposons) (P. Nordmann et al 2009; C-G. Giske et al 2012).

Ce mécanisme est plus important d'un point de vue clinique car il compromet le plus souvent l'efficacité de presque toutes les bêtalactamines. Il est stable et survient dans des souches qui

sont très souvent résistantes à d'autres familles d'antibiotiques (aminosides, fluoroquinolones).

Le gène codant pour les carbapénémases est le gène **bla**, de localisation plasmidique ou sur les intégrons (A. Boutet-dubois et al 2012 ; G. Levy Hara et al 2013).

II.4.2. Classification :

Selon la classification d'Ambler, il existe trois classes de carbapénémases :

Tableau III : Les différentes classes d'Ambler des carbapénémases

Classification d'Ambler	Type Enzyme	Spectre d'activité	Germe(s)
A type serine	KPC	Toutes les β -lactamines	Entérobactéries (rare <i>P. aeruginosa</i>)
A type serine	SME	Carbapénèmes et aztréonam mais pas C3G	<i>S. marcescens</i>
A type serine	NMC-A, IMI	Carbapénèmes et aztréonam mais pas C3G	<i>Enterobacter spp.</i>
A type serine	GES	Imipénème et C3G	<i>Ps. aeruginosa</i> Entérobactéries
B métaallo- β -lactamases	IMP, VIM, NDM	Toutes les β -lactamines sauf aztréonam	Entérobactéries <i>Pseudomonas spp</i> <i>Acinetobacter spp</i>
D type serine	OXA	Carbapénèmes (faible activité)	<i>Acinetobacter spp</i> (Entérobactéries)

KPC : *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*, SME : *Serratia marcescens enzyme*, NMC-A : *non-metallo carbapenemase A*, IMI : *Imipenem-hydrolyzing β -lactamase*, GES : *Guiana Extended Spectrum*, IMP : *Active on imipenem*, VIM : *Verona integron-encoded metallo β -lactamase*, NDM : *New Delhi metallo- β -lactamase*, OXA : *Oxacillinase*

(J-B. Patel et al 2009 ; M-H. Nicolaos Chanoine et J. Robert 2012)

- **La classe A** : correspond principalement aux enzymes de type KPC, IMI, SME, NMC et GES. Elles ont tout d'abord été rapportées dans des espèces d'Entérobactéries nosocomiales comme *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* et *Klebsiella sp*, de façon sporadique ou lors de petites épidémies. Ces enzymes ont la particularité de voir leurs activités in vitro, totalement ou partiellement inhibées par l'acide boronique et l'acide clavulanique. Elles hydrolysent toutes les β -lactamines (N. Grall et al 2011; G. Cuzon et al 2010). Le support génétique diffère selon le type d'enzyme, chromosomique pour les types SME, NMC et IMI et plasmidique pour les types KPC et GES (N. Grall et al 2011).

Les carbapénémases de classe A les plus fréquentes et les plus menaçantes, sont les carbapénémases de type KPC, plusieurs variantes ont été décrites (KPC-1 à KPC-11) (P. Nordmann et A. Carrer 2010).

Les gènes **bla_{KPC}** (Figure 2) ont été retrouvés sur une grande variété de plasmides, mais toujours associés à un transposon de type Tn3, Tn4401. Les plasmides décrits varient dans

leurs natures, leurs tailles et sont le plus souvent transférables. Ils portent fréquemment d'autres gènes de résistance, notamment aux aminosides et/ou aux fluoroquinolones (gènes *qnr*), parfois même à d'autres β -lactamases comme CTX-M-15 (Céfotaximase-Munich) (M. Abbas et al 2012).

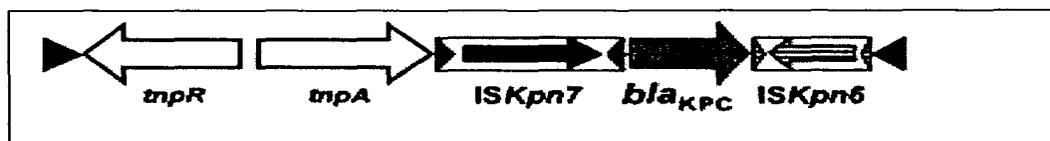


Figure 2 : Représentation schématique des environnements génétiques des gènes codant pour les carbapénémases de classe A les plus fréquentes (*bla_{KPC}*) (L. Dortet et al 2013).

- **La classe B** : correspond aux métallo- β -lactamases de type VIM, IMP et NDM, elles avaient été identifiées dans des espèces d'Entérobactéries typiquement hospitalières (*Serratia*, *Citrobacter* et *Enterobacter*). 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 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 (P. Nordmann et A. Carrer 2010).

Les gènes des métallo- β -lactamases (MBL) de type VIM (*bla_{VIM}*) ou IMP (*bla_{IMP}*) peuvent présenter des localisations plasmidiques ou chromosomiques (Figure 3). Ils sont habituellement décrits sous forme de gènes cassettes au sein d'intégrons, l'association de ces intégrons à des structures mobiles de type plasmide ou transposon permet la mobilité de ces gènes de résistance. La présence d'autres gènes cassettes associés au sein de l'intégron, comme des gènes de résistances aux aminosides ou à d'autres bêtalactamines (OXA-30), confèrent à ces souches un important degré de multi résistance.

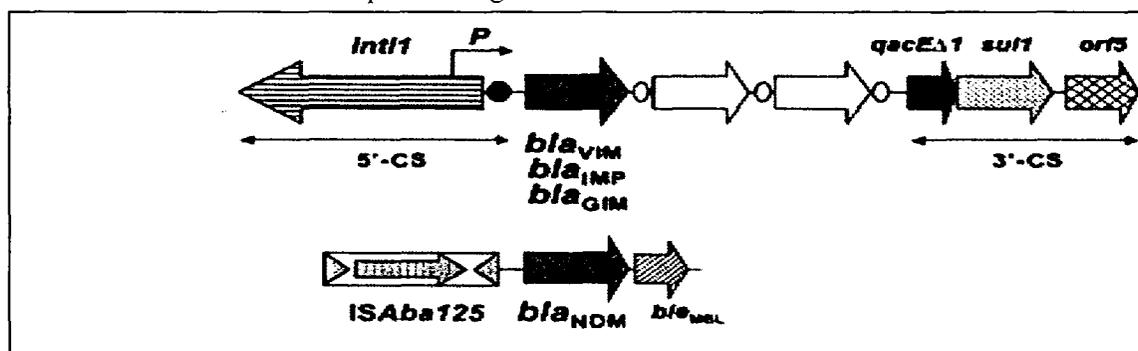


Figure 3: Représentation schématique des environnements génétiques des gènes codant pour les carbapénémases de classe B les plus fréquentes (*bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{GIM}*, *bla_{NDM}*) (L. Dortet et al 2013).

Une nouvelle MBL transférable, NDM-1, a été décrite chez les Entérobactéries, principalement *E. coli* et *K. Pneumoniae* (Figure 3). Le gène *bla_{NDM1}* a été retrouvé sur une grande variété de plasmides mais également inséré sur le chromosome bactérien dans quelques cas (N. Grall et al 2011 ; D-M. Livermore 2012).

- **La classe D** : il existe plusieurs sous-groupes de carbapénémases de cette classe, basés sur l'homologie des séquences protéiques, correspondant essentiellement aux enzymes de type oxacillinasés (**OXA-23, OXA-51, OXA-24, OXA-58, OXA-48, OXA-55, OXA-50, OXA-62, OXA-60, OXA-181, OXA-204...**), elles sont principalement observées chez *K. pneumoniae*, *E. coli* et *Enterobacter sp* (F. Robin et al 2012 ; N. Grall et al 2011).

Le gène codant pour les oxacillinasés est le gène **bla_{OXA}**, localisé au sein d'un transposon plasmidique comportant deux séquences d'insertion identiques assurant la mobilité et l'expression (P. Nordmann et A. Carrer 2010).

Ces enzymes hydrolysent fortement les carbapénèmes mais pas ou peu les céphalosporines de 3^{ème} génération (céfotaxime, ceftazidime) et elles sont résistantes aux inhibiteurs suicides de β -lactamases (acide clavulanique et tazobactam) (L. Poirel et al 2013).

À l'inverse des autres carbapénémases de type OXA, principalement retrouvées chez *Acinetobacter sp* (OXA-23, OXA-40, OXA-58, OXA-51-like...), le groupe OXA-48 n'a été décrit que chez les Entérobactéries. Le gène **bla_{OXA-48}** (Figure 4) a été identifié dans de nombreux pays, le plus souvent dans des souches de *K. pneumoniae*. L'OXA-48 possède peu d'homologie en acides aminés avec les autres β -lactamases de la class D d'Ambler, sa dissémination rapide est alarmante car elle concerne non seulement le milieu hospitalier, mais aussi le milieu communautaire (L. Dortet et al 2013).

Toutefois, leur présence est souvent couplée à la présence d'une β -lactamase à spectre étendu (BLSE), ce qui conduit à une multirésistance des souches sécrétrices (N. Grall et al 2011; G. Cuzon et al 2010).

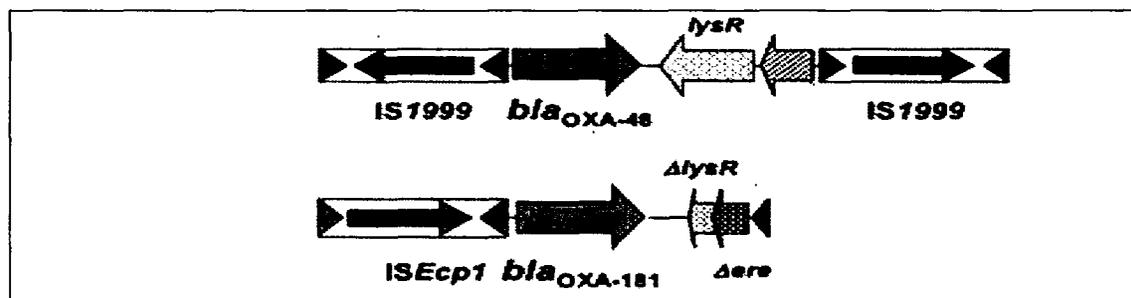


Figure 4 : Représentation schématique des environnements génétiques des gènes codant pour les carbapénémases de classe D les plus fréquentes (**bla_{OXA-48}**, **bla_{OXA-181}**)

(L. Dortet et al 2013).

II.4.3. Méthodes de détection :

La détection des souches productrices des carbapénémases est essentielle, tant pour la prise en charge thérapeutique que pour la prévention et le contrôle de l'infection.

Il existe plusieurs techniques phénotypiques et génotypiques pour détecter les carbapénémases chez les Entérobactéries (M. Abbas et al 2012 ; M. Altamimi et al 2017).

II.4.3.1. Méthodes phénotypiques :

Sont des techniques non moléculaires qui ont été proposées pour la détection d'une activité carbapénémase. Parmi ces techniques, on trouve les tests d'inhibition (test de disque combiné, test de double disque de synergie, bandes de diffusion en gradient, test de Rosco) et les tests

d'hydrolyse (test de Hodge modifié et les tests biochimiques) (A. Aguirre-Quinonero et L. Martínez-Martínez 2017).

a. Les tests d'inhibition :

***Test de disque combiné (CDT) :**

Le principe:

Ce test repose sur les différences entre le diamètre de zone d'inhibition d'un disque de carbapénème (dans la plupart des cas méropénème ou imipénème) par rapport à celui produit par un disque contenant une combinaison d'un carbapénème et d'un inhibiteur (EDTA pour MBL, acide boronique pour KPC) (A. Aguirre-Quinonero et L. Martínez-Martínez 2017).

La technique :

Après étalement d'une suspension de 0,5 Mc Farland (McF) de la souche à tester par écouvillonnage sur gélose Mueller Hinton (MH), deux disques de 10 µg d'imipénème dont l'un contient en plus 10µg d'une solution d'EDTA sont déposés sur la gélose. Le milieu est ensuite incubé à 37° C pendant 18-24 heures (K. Balan et al 2012).

La lecture :

La souche est considérée comme productrice de MBL si on observe une augmentation du diamètre d'inhibition du disque avec inhibiteur par rapport à l'autre contenant le carbapénème seul. La différence des diamètres d'inhibition est variable selon les auteurs, selon Balan, une différence \geq à 7mm est interprétée comme positive, alors que Mariagou a considéré le test comme positif lorsqu'il existe une augmentation de la zone d'inhibition de 5 mm ou plus (V. Miriagouet al 2010 ; K. Balan et al 2012).

Les avantages :

- Une grande sensibilité et spécificité chez les Enterobacteriaceae.
- Peu coûteux.
- Disponibles dans les laboratoires non spécialisés (M. Abbas et al 2012).

Les inconvénients :

- Un faux positif dû à l'activité antibactérienne de l'EDTA, l'ajout d'un disque d'EDTA sur le milieu de culture comme témoin permet la validation du test.
- Un délai important dans le rendu du résultat au clinicien.

*** Test du double disque de synergie (DDSTs):**

Le principe:

La production de carbapénémase de classe B peut être suspectée si une image de synergie est observée entre un disque d'EDTA et un disque d'imipénème (A. Aguirre-Quinonero et L. Martínez-Martínez 2017).

La technique :

Après écouvillonnage d'une suspension de 0.5 McF de la souche à tester sur gélose Muller Hinton, deux disques de 10µg de carbapénèmes (méropénème ou imipénème) sont placés à une distance de 10 mm du bord à bord sur les deux côtés d'un disque d'EDTA préalablement placé au centre. Le milieu est ensuite incubé à 37° C pendant 18-24 heures (K. Balan et al 2012).

La lecture :

La présence d'une zone élargie d'inhibition (zone d'inhibition synergique) est interprétée comme positive (K. Balan et al 2012).

Les avantages :

- Une grande spécificité et sensibilité.
- Faible coût (A. Aguirre-Quinonero et L. Martínez-Martínez 2017).

Les inconvénients :

- Une interprétation subjective et un manque de quantification.
- Des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer les données (V. Miriagou et al 2010).

*** Bandelettes de l'E-test :****Le principe:**

Ce test d'inhibition repose sur la diminution de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de carbapénème en présence d'inhibiteur spécifique de carbapénémase.

Plusieurs formats de bandes de diffusion en gradient (Les bandes E-test®) pour détecter les carbapénémases, en particulier les MBL, ont été conçus. Ces bandes sont calibrées par un gradient de carbapénème dont la concentration de 15 dilutions est pré-établie pour la détermination de la CMI en µg/ml (P. Nordmann et A. Carrer 2010 ; A. Aguirre-Quinonero et L. Martínez-Martínez 2017).

La technique :

Après écouvillonnage d'une suspension de 0.5 McF de la souche à tester sur gélose Muller Hinton, une bandelette E-test contenant un gradient d'imipénème ou de méropénème à une extrémité, et un gradient d'imipénème ou de méropénème combiné avec l'EDTA à l'autre extrémité est déposé sur la gélose. Le milieu est ensuite incubé à 37° C pendant 18-24 heures (A. Aguirre-Quinonero et L. Martínez-Martínez 2017).

La lecture :

Les CMI sont lues de chaque extrémité de la bande, une réduction de 3 dilutions de la CMI du carbapénème en présence de l'inhibiteur, ou la présence d'une ellipse déformée sur l'extrémité d'imipénème ou de méropénème est interprétée comme positive pour les MBL (A. Aguirre-Quinonero et L. Martínez-Martínez 2017).

Les avantages :

- Un niveau élevé de sensibilités et de spécificités dans la détection des MBL.
- Peu coûteux donc disponibles dans les laboratoires non spécialisés (M. Abbas et al 2012).

Les inconvénients :

- D'autres études sont nécessaires pour confirmer son efficacité.
- Les CMI des carbapénèmes réalisées par ce test sont parfois difficiles à interpréter du fait de la présence de micro colonies dans la zone d'inhibition (P. Nordmann et A. Carrer 2010).

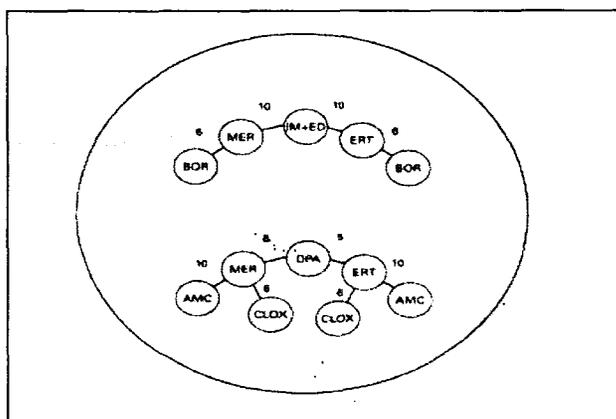
R ! : Les bandes contenant du méropénème se sont révélées plus efficaces que ceux contenant l'imipénème dans la détection des MBLs.

Test de Rosco :*Le principe:**

C'est un test phénotypique pour la mise en évidence des différents mécanismes de résistance aux carbapénèmes (K. Rahal et al 2014).

La technique :

Des disques contiennent respectivement du méropénème, de l'ertapénème, de l'imépénème plus de l'EDTA, de l'acide dipicolinique (DPA, inhibiteur des enzymes de classe B), de l'acide aminophénylboronique (BOR, inhibiteur des enzymes de classe A), de la cloxacilline (inhibiteur des céphalosporinases hyperproduites) et de l'amoxicilline plus de l'acide clavulanique (inhibiteur des BLSE), sont déposés sur une gélose Mueller Hinton sur laquelle a préalablement été ensemencée en culture confluyente une suspension de 0.5 Mc Farland de la souche testée (Figure 5). Le milieu est ensuite incubé à 37° C pendant 18-24 heures (C-G. Giske et al 2011; A. Boutet-dubois et al 2012).



IM+ED : Imipénème+EDTA / MER : Meropénème / ERT : Ertapénème / DPA : Ac.dipicolinique / AMC : Amoxicilline+ Acide clavulanique / CLOX : Cloxacilline / BOR : Ac. Boronique

Figure 5 : Schéma proposé par Rosco pour la détection des carbapénémases type KPC, Metallo-β-lactamases et Oxacillinases (K. Rahal et al 2014).

La lecture :

- **Metallo-β-lactamases (enzymes classe B)**

Action positive des agents chélateurs: présence d'une zone d'inhibition (ou une zone fantôme) entre les disques DPA et les disques méropénème et/ou ertapénème ou entre le disque imipénème-EDTA et les disques méropénème ou ertapénème.

- **KPC (enzymes classe A)**

Pas d'action des agents chélateurs (pas de zone d'inhibition ou fantôme), synergie entre l'ac. boronique et/ou l'amoxicilline/ Ac. clavulanique et les carbapénèmes (une ou plusieurs). Pas de synergie entre la cloxacilline et les carbapénèmes.

- **Oxacillinases (enzymes classe D)**

Pas d'action des agents chélateurs (pas d'inhibition).

Pas de synergie entre amoxicilline/Ac. clavulanique et les carbapénèmes (K. Rahal et al 2014).

Les avantages :

- Possible de détecter et d'identifier le mécanisme à l'origine de la résistance aux carbapénèmes.
- Ces disques combinés permettent notamment de distinguer la production d'une carbapénémase (de type KPC ou MBL) de la présence d'une BLSE ou d'une céphalosporinase (A. Birgyet al 2012).

Les inconvénients :

- Des sensibilités et des spécificités variables.
- Quelques faux positifs : essentiellement *Enterobacter spp* sur exprimant leur céphalosporinase naturelle qui peut être inhibée par l'acide boronique .
- Difficultés d'interprétation pour certaines souches d'EPC possédant de bas niveaux de résistance au méropénème .
- Difficultés d'interprétation pour certaines souches d'EPC produisant des carbapénémases de différent types (ex : NDM + OXA-48-like, KPC + VIM).
- Nécessite un délai additionnel de 24 h à 48 h après obtention de l'antibiogramme incompatible avec l'identification rapide de carbapénémases (L. Dortet et al 2014).

b. Test d'hydrolyse :*** Le test de Hodge modifié :****Le principe:**

Ce test est basé sur la mise en évidence d'une synergie d'activité enzymatique entre souches productrices de carbapénémases (souche à tester) et souches sauvages de référence sensibles (CA-SFM 2012).

La technique :

Un disque d'ertapénème 10 µg (plus indiqué que imipénème) est appliqué au centre d'une boîte de MH préalablement ensemencée par écouvillonnage , d'une suspension de 0,5 McFarland diluée au 1/10 d'une souche de référence d'*Escherichia coli* sauvage ATCC 25922 (sensible aux carbapénèmes), afin d'obtenir une culture confluyente et un diamètre dans la zone de sensibilité autour du disque de l'ertapénème.

Les souches à tester et des souches témoins (témoin positif *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 productrice de carbapénémase KP-2 et témoin négatif *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 non productrice de carbapénémase) sont appliquées sur la gélose sous forme de stries déposées à partir du disque d'ertapénème jusqu'à la périphérie de la boîte sur une longueur d'au moins 20mm. Le milieu est ensuite incubé à 37° C pendant 18-24 heures (A. Boutet-dubois et al 2012 ; L. Dortet et al 2016).



Figure 6 : Test de Hodge modifié (L. Dortet et al 2014).

La lecture :

Le test est interprétable en cas de déformation de la zone d'inhibition de la souche de référence le long de la strie de la souche témoin positif. Si une déformation semblable est observée avec la souche testée suspecte, celle-ci peut-être considérée comme productrice d'une carbapénémase (L. Dortet et al 2016).

Les avantages :

- Test facile à réaliser,
- Peu coûteux.

(L. Dortet et al 2013 ; L. Dortet et al 2014).

Les inconvénients :

- Cette technique manque à la fois de spécificité (nombreux faux positifs avec les souches de *Enterobacter sp* ayant un défaut d'accumulation des carbapénèmes associé à la production de céphalosporinases et/ou de BLSE, l'ajout du cloxacilline dans le milieu de culture permet d'augmenter la spécificité (K. Rahal et al 2014) et la sensibilité (faux négatifs, notamment avec les souches d'Entérobactéries productrices d'une carbapénémase de type NDM), l'ajout du zinc dans le milieu de culture permet d'augmenter la sensibilité (K. Rahal et al 2014).
- Nécessite un délai de 24 h à 48 h après obtention de l'antibiogramme, incompatible avec une identification rapide des carbapénémases (L. Dortet et al 2016).
- Le test ne permet pas de donner une orientation sur la classe à laquelle appartient la carbapénémase :

*** Tests biochimiques de détection de la production d'une carbapénémase :**

Deux techniques, répondant bien aux besoins actuels (technique de diagnostic rapide), ont été mises au point récemment.

- Spectrométrie de-masse:

Cette technique permet de visualiser une activité enzymatique du carbapénémase par la recherche d'une modification du spectre d'absorption d'un carbapénème (généralement l'imipénème) sous l'effet d'une carbapénémase.

Elle est basée sur la détection par spectrométrie de masse, après mise en contact pendant quelques heures (en général 2-3h) de la souche à tester avec une solution de carbapénème, de la disparition du pic correspondant au carbapénème testé et de l'apparition d'un pic correspondant au(x) produit(s) d'hydrolyse de ce même carbapénème (S. Bernabeu et al 2012 ; J. Hrabak et al 2011).

- Carba NP test :

Cette technique est de diagnostic rapide. Le principe de ce test repose sur la mise en évidence d'une acidification du milieu lors de l'hydrolyse de l'imipénème par une carbapénémase en présence d'un indicateur de PH (rouge de phénol).

L'indicateur de PH change de couleur (du rouge au jaune) lorsque le milieu devient acide, traduisant la présence d'une carbapénémase (P. Nordmann et al 2012; K. Rahal et al 2014).

Les avantages :

- Peu coûteux.
- Peut être réalisé sur les souches isolées voir directement à partir des hémocultures positives.

- Facile à mettre en place dans n'importe quel laboratoire (nécessite peu de moyens, matériels et réactifs).
- Rapide (< 2h) sur souches isolées.
- Excellente sensibilité et spécificité de détection de toutes les carbapénémases.

Les inconvénients :

-Elle nécessite une mise au point fine, du personnel particulièrement entraîné et un spectromètre de masse (système ouvert) (L. Dortet et al 2014).

II.4.3.2. Méthodes génotypiques (techniques de biologie moléculaire) :

Les tests moléculaires sont considérés comme étant la référence pour l'identification des gènes codant pour les carbapénémases. Ces techniques sont majoritairement basées sur la PCR (polymérase chaine réaction) et peuvent être suivies d'une étape de séquençage nécessaire à l'identification précise du gène codant pour la carbapénémase (L. Dortet et al 2013).

Des procédés moléculaires tels que les PCR simplex et multiplex, la PCR en temps réel, l'hybridation et le séquençage de l'ADN ont été communément utilisés pour l'identification des gènes de la carbapénémase dans les laboratoires de recherche et les centres de référence. Certaines de ces méthodes, principalement la PCR, sont régulièrement effectuées dans certains laboratoires cliniques afin de contourner les problèmes de la détection phénotypique des EPC, il existe également des Kits basés sur la PCR et l'hybridation (Hyplex MBL ID et HyplexCarbOxa ID pour la détection des gènes bla_{VIM}, des gènes bla_{IMP} et des gènes bla_{OXA}). Cette méthodologie permet la détection des carbapénémases directement à partir des échantillons cliniques (V. Miriagou et al 2010).

La technique de biologie moléculaire est un test obligatoire pour la confirmation, il a une excellente spécificité et sensibilité et il apporte une certitude rapide de la présence ou non du gène d'une carbapénémase et permet de déterminer son type, mais il nécessite un matériel spécial donc coût élevé (C. Cattoen 2012 ; M. Altamimi et al 2017).

Des kits de détection des gènes de carbapénémases basés sur l'utilisation des puces à ADN (ex : Check-MDR CT103 kit, Check-Points) sont également disponibles sur le marché. Ces derniers sont encore plus onéreux, nécessitent un appareil dédié, et demandent une certaine expertise (L. Dortet et al 2016).

II.5. EPIDEMIOLOGIE :**II.5.1. Portage :**

Les Entérobactéries, qu'elles soient sensibles ou résistantes aux antibiotiques et qu'elles soient responsables ou non d'infections, sont portées par chaque individu au niveau du tube digestif. Le tube digestif constitue un réservoir très important de bactéries susceptible de disséminer autour de chaque patient et de contaminer son environnement (InVS 2013 ; CCLIN 2011).

Les Entérobactéries productrices de carbapénémases ont surtout une colonisation digestive asymptomatique (porteur asymptomatique), mais elles peuvent également être responsables d'infection (bactériémies, pneumopathie, infections urinaires...) liées à des facteurs de risque (âge avancé, greffe d'organes, hospitalisation en réanimation, durée d'hospitalisation

prolongée et antibiothérapie préalable, y compris les carbapénèmes) (V. Cattoir 2014 ; S. Boivin et al 2016).

II.5.2. Mode de transmission :

L'émergence et la dissémination d'Entérobactéries productrices des carbapénémases dans différentes régions du monde, représentent une menace importante notamment dans le cadre des infections nosocomiales (G. Cuzon et al 2010).

La colonisation par des EPC (le portage digestif) joue un rôle important dans la transmission, la durée de colonisation varie dans la littérature, le pourcentage des patients toujours porteurs diminue avec le temps (30-35 % de porteurs après 3 à 6 mois). Le risque de transmission demeure tant que l'individu est porteur (CCLIN 2013 ; S. Boivin et al 2016 ; INSPQ 2016).

La transmission des EPC peut être réalisée par un contact direct ou indirect avec le patient ou son environnement contaminé, ou par une contamination hydrique ou alimentaire.

La transmission directe des EPC se fait surtout par manuportage, la propagation de ces bactéries est favorisée par les déplacements des travailleurs de la santé et le manque d'application des mesures de prévention des infections, particulièrement l'hygiène des mains. La transmission indirecte se fait par le biais du matériel de soins et les équipements contaminés (tensiomètre, thermomètre, stéthoscope, lits, cathétères...) (S. Boivin et al 2016 ; N. Floret 2012).

Le risque de la transmission est accru en présence d'une diarrhée, une incontinence fécale, présence de dispositifs invasifs, plaie avec écoulement et les suppurations (CCLIN Ouest 2011; INSPQ 2016).

Il ne faut pas sous-estimer le rôle de l'eau et de la nourriture comme vecteurs de transmission de ces bactéries car une étude réalisée à New Delhi, en Inde, a révélé que l'eau de la ville ainsi que les égouts étaient contaminés par une multitude de bactéries portant le gène de résistance des EPC (S. Boivin et al 2016 ; N. Floret 2012).

Outre la facilité avec laquelle se transmettent les gènes conférant une résistance, une étude révèle que la propagation des EPC est favorisée par plusieurs facteurs « humains », par exemple le tourisme en Asie, notamment en Inde et au Pakistan, d'autres études ont permis d'observer une colonisation par les EPC chez des voyageurs ayant séjourné dans certains pays d'Asie (S. Boivin et al 2016).

II.5.3. Données épidémiologiques :

- Situation mondiale :

Les EPC sont identifiées de plus en plus fréquemment dans le monde, les carbapénémases les plus fréquemment décrites sont les types KPC, NDM₁, IMP/VIM et OXA-48 (Figure 7) (InVS 2013).

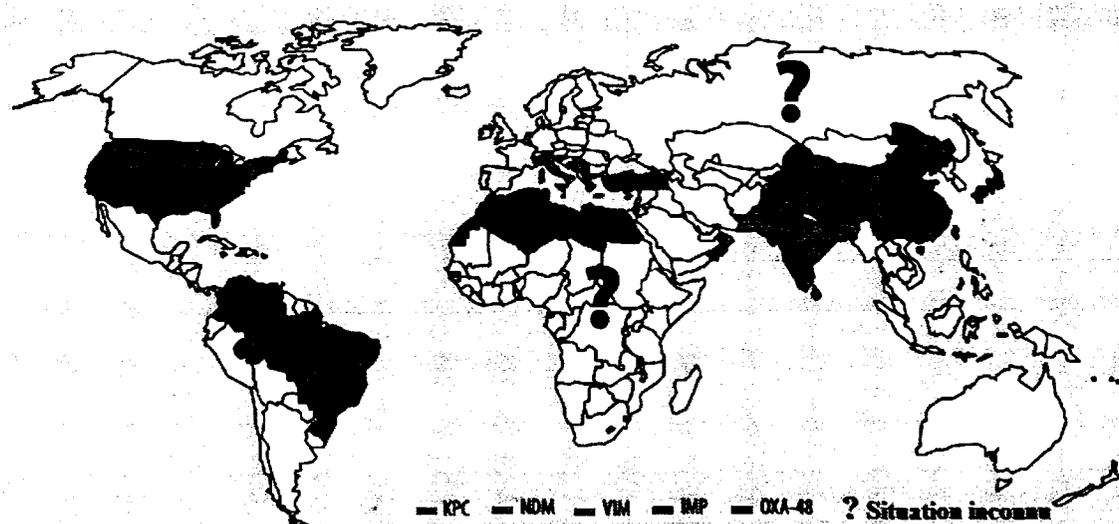


Figure 7 : Zones d'endémie pour les Entérobactéries productrices de carbapénémases en fonction du type d'enzyme (L. Poirel et al 2013).

***Les carbapénémases de classe A :** parmi les carbapénémases de classe A, seules les carbapénémases de type KPC sont très largement rapportées dans le monde.

En Amérique : la première souche productrice de KPC (KPC-1 et KPC-2) a été identifiée en 1996 en Caroline du Nord aux États-Unis dans une souche de *K. pneumoniae*. Cette découverte fut rapidement suivie par la description de 9 autres variants (KPC-3 à KPC-11) (T. Naas et al 2012 ; N. Grall et al 2011).

La première épidémie de KPC s'est produite dans la région de New York en 2000, et depuis lors, une augmentation progressive de l'incidence a été mise en évidence. En 2004, le pourcentage de résistance parmi les isolats de *Klebsiella* rapportés par les hôpitaux de New-York s'élevait à 21 % (CDC 2009). En 2010, KPC a été retrouvée dans vingt états américains, signe d'une propagation rapide (M. Abbas et al 2012).

Face aux 9 000 infections et environ 600 décès enregistrés chaque année aux États-Unis, le Center for Disease Control and Prevention (CDC), la référence américaine en matière de prévention des infections, a décrit en 2014 que les EPC constituaient une menace pour la santé de la population et a incité les instances de santé publique à privilégier les actions visant à prévenir ces infections (CDC 2014).

La première épidémie de KPC en dehors des États-Unis a eu lieu en **Palestine** en 2004, et les souches retrouvées semblent avoir une relation génétique avec les souches des États-Unis, ce qui suggère une importation de souches par des voyageurs (patients, touristes).

Au Canada, les premiers cas de KPC ont été rapportés à Ottawa chez 3 patients d'un même hôpital. Deux d'entre eux étaient reliés épidémiologiquement. Au Québec, depuis décembre 2009, 14 souches productrices de KPC (7 *Escherichia coli*, 3 *Serratia marcescens*, 2 *Klebsiella oxytoca*, 1 *Klebsiella pneumoniae* et 1 *Citrobacter freundii*) ont été identifiées à partir de 11 patients isolés dans 3 centres hospitaliers différents (INSPQ 2010). Depuis 2011, quelques éclosions sporadiques ont été signalées dans différents hôpitaux. Toutes ont été contenues. Plus précisément, durant la période 2014-2015, 14 infections causées par des EPC ont été répertoriées (INSPQ 2015) 5 décès en ont résulté, soit un taux de mortalité de 35,7 % (S. Boivin et al 2016).

L'Amérique du Sud connaît également une importante dissémination de KPC. Les premières souches de *K. pneumoniae* KPC-2 ont été décrites en 2005, en Colombie. D'autres pays (Brésil, Argentine) ont également rapporté la présence des souches de *K. pneumoniae* dans leurs hôpitaux (R. Da Silva et al 2012).

En Chine, les souches productrices de KPC sont de plus en plus souvent rapportées notamment dans des espèces qui n'étaient pas encore concernées comme *Citrobacter freundii* ou *Serratia marcescens* (G. Cuzon et al 2010).

En Vietnam, un seul épisode a été signalé en 2012 de même en Inde en 2011 (InVS 2013).

En Europe, à partir de 2007, KPC a été retrouvée en Grèce et selon certaines données, la situation y est endémique, avec environ 40% des souches de *K. pneumoniae* produisant une KPC (et jusqu'à 65% dans certains hôpitaux à Athènes), et plusieurs autres pays européens, tels que la Belgique, l'Ecosse, l'Angleterre, l'Italie (14 épisodes en 2010) et le Danemark (M. Abbas et al 2012).

En France, les EPC sont encore sporadiques même si quelques épidémies hospitalières ont été décrites, la majorité des patients chez lesquels une EPC est identifiée (55 % selon le bilan publié en septembre 2013 par l'Institut de veille sanitaire) ont un lien avec l'étranger (hospitalisation à l'étranger dans l'année précédente le plus souvent), la résistance de type KPC est la plus faiblement rapportée avec une proportion de 6% (S. Fournier 2014 ; InVS 2015). Jusqu'au 2009, sept souches ont été décrites, une première *K. pneumoniae* KPC-2 isolée en 2005 chez un patient ayant séjourné dans un hôpital new-yorkais, trois souches de *Enterobacter cloacae* porteuses de KPC-3 également isolées chez un patient hospitalisé précédemment en unité de soins intensifs d'un hôpital de New-York (G. Cuzon et al 2010).

En Afrique, des cas sporadiques ont été rapportés, en 2011, 2 épisodes ont été signalés au Maroc et un seul en Egypte, alors qu'un seul épisode a été trouvé et en Tunisie en 2012 (InVS 2015).

*Les carbapénémases de classe B : parmi les MBLs, les enzymes de type VIM et IMP sont les plus fréquemment identifiées, le premier métallo β -lactamase de type IMP a été décrit au Japon en 1991, les enzymes de type VIM, initialement décrites au sein de souches de *Pseudomonas sp* ont été transférées aux Entérobactéries et ont surtout été rapportées au pourtour du bassin méditerranéen (Italie 3 cas en 2008 et Grèce 5 cas en 2004) où elles sont fréquemment rencontrées chez des patients hospitalisés aux soins intensifs. Des cas isolés ont par la suite été rapportés en France, en Irlande, en Scandinavie, en Corée du Sud, à Taiwan, au Mexique et en Colombie. Un premier cas fut par ailleurs rapporté aux États-Unis en 2010, mais aucune transmission soutenue n'a été publiée en Amérique du Nord jusqu'à présent.

La VIM-1 a été décrite pour la première fois en Italie en 1997, puis le variant VIM-2 a été identifié en France, les enzymes de type VIM représentent un groupe homogène de 37 variants, le variant VIM-2 est la MBL la plus répandue dans le monde (L. Dortet et al 2013 ; A. Boutet-Dubois et al 2012 ; INSPQ 2015).

La carbapénémase NDM-1 a été découverte en 2008 dans une souche de *K. pneumoniae* isolée chez un patient suédois rapatrié d'Inde. La majorité des cas décrits rapportent un lien avec le continent indien. Dès lors, des études épidémiologiques de prévalence menées sur les Entérobactéries résistantes aux carbapénèmes en Inde, au Pakistan et au Royaume-Uni ont démontré une forte prévalence de ce nouveau mécanisme de résistance dans ces deux premiers pays avec importation de cas dans le dernier. Néanmoins, des souches bactériennes recueillies montrent la présence de NDM-1 dans des souches isolées chez des patients hospitalisés en Inde dès 2006.

D'autres études épidémiologiques ont permis d'établir que des EPC se retrouvaient dans les eaux de ruissellement ainsi que dans l'eau potable dans certains quartiers de New Delhi, en plus d'établir la présence du gène NDM-1 dans plusieurs genres et espèces d'Entérobactéries et de diverses autres espèces bactériennes. À ce jour, des cas sporadiques de patients colonisés ou infectés ont été rapportés entre autres dans différents pays d'Europe (Royaume-Uni, France, Autriche, Belgique, Grèce, Danemark, Finlande, Italie, Suisse, Norvège, Suède, Allemagne, Pays-Bas) en Amérique (Canada, États-Unis, Brésil), en Asie (Chine, Corée du Sud, Japon, Taiwan, Singapour), en Afrique (Maroc, Afrique du Sud, Égypte, Kenya) et en Océanie (Australie) (L. Poirel 2013 ; INSPQ 2015).

***Les carbapénémases de classe D :** à l'inverse des autres carbapénémases de type OXA, le groupe OXA-48 n'a été décrit que chez les Entérobactéries.

Cette enzyme de la classe D d'Ambler a été identifiée pour la première fois dans *K. pneumoniae* en 2003, en Turquie puis chez *E. coli*, elle a été identifiée comme étant à l'origine de multiples foyers épidémiques d'infections nosocomiales dans les hôpitaux d'Istanbul et d'Ankara. Depuis, des épidémies nosocomiales de bactéries productrices d'OXA-48 ont été rapportées, la distribution mondiale d'OXA-48 concerne principalement l'Europe et l'Afrique (nord et ouest) (S. Fournier 2014 ; D. Lepelletier et al 2015).

Pendant plusieurs années, la grande majorité des souches d'Entérobactéries productrices de carbapénémase OXA-48 ont été isolées chez des patients hospitalisés en Turquie ou ayant un lien avec la Turquie. Actuellement, la Turquie, le Moyen-Orient et les pays du Maghreb sont considérés comme étant les principaux réservoirs de souches productrices d'OXA-48. Des souches de *S. marcescens* productrices d'OXA-48 ont été retrouvées dans l'environnement au Maroc. La dissémination rapide d'OXA-48 est alarmante car elle concerne non seulement le milieu hospitalier, mais aussi le milieu communautaire. Cette diffusion hospitalière et communautaire des souches productrices de OXA-48 concerne l'Afrique du Nord et peut-être également au moins la France, l'Allemagne et la Belgique qui entretiennent des relations économiques privilégiées avec les pays du Maghreb et/ou la Turquie. En France, 75 % des déclarations d'EPC correspondent à des souches productrices d'OXA-48 (L. Lopez-Cerero et B. Almirante 2014)

- Situation en Algérie :

L'isolement de souches d'Entérobactéries productrices de carbapénémases reste rare en Algérie, ainsi l'émergence de souche des Entérobactéries résistantes aux carbapénèmes dans les hôpitaux algériens est une cause de grande appréhension (**Z. Baba Ahmed-KaziTani et G. Arlet 2014 ; N. Aggoune et al 2014**).

Entre janvier et mai 2008, cinq souches d'Entérobactéries résistantes à l'imipénème (une souche *Providencia stuartii*, deux souches d'*Escherichia coli* et deux souches de *Klebsiella pneumoniae*) ont été isolées chez deux patients hospitalisés à l'unité de soins intensifs de l'hôpital central de l'armée d'Alger, les résultats de biologie moléculaire ont confirmé la présence d'un gène bla_{VIM} dans les cinq souches. Ces gènes bla_{VIM} codé une métalloβ-lactamase VIM-19, qui est la première carbapénémase identifiée à partir d'un isolat en Algérie (**F. Robin et al 2010**).

La KPC n'a été signalée qu'une seule fois en 2010 (**InVS 2014**).

En octobre 2011, une souche de *Klebsiella pneumoniae* résistante au carbapénème a été isolée à partir de 02 hémocultures appartenant à un patient de sexe masculin âgé de 18 mois hospitalisé dans l'unité pédiatrique de l'hôpital central de l'armée d'Alger, cette souche a été confirmée pour la production de carbapénémase OXA-48. Il s'agit du premier isolement d'OXA-48- chez *K. pneumoniae* en Algérie. En raison de l'isolement du patient et les précautions de barrière qui ont été respectées, aucun autre isolat avec la même résistance n'a été détecté à l'hôpital pendant la même période (**N. Aggoune et al 2014**).

Entre septembre 2011 et avril 2014, 17 souches d'Entérobactéries (14 *K.pneumoniae* et 3 *E. coli*) de sensibilité diminuée aux carbapénèmes provenant de 6 hôpitaux algériens ont été collectés, la quasi-totalité des souches produisait OXA-48 et 2 *K.pneumoniae* associaient à la fois une BLSE et une carbapénémase de type NDM, dans cette étude, l'NDM a été signalé pour la première fois en Algérie (**N. Aggoune et al 2014**).

Durant la période allant du 1^{er} janvier 2014 au 30 juin 2015, 415 patients hospitalisés au niveau de l'hôpital central de l'armée d'Alger ont été dépistés pour le portage des bactéries multirésistantes, 7 des 415 patients dépistés (1,68%) étaient colonisés par des Entérobactéries de sensibilité diminuée aux carbapénèmes, 5 souches (3 *K.pneumoniae* et 2 *E.coli*) ont été confirmées comme étant productrices de carbapénémase du type OXA-48, parmi elles 2 *K.pneumoniae* co-associaient OXA-48 et NDM (**A. Zerouki et al 2015**).

II.6. TRAITEMENT :

La plupart des Entérobactéries ont un phénotype de multirésistance aux antibiotiques qui limite très fortement les possibilités thérapeutiques. Au cours des dix dernières années, l'augmentation de la multi-résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif, et notamment la dissémination de la résistance aux carbapénèmes chez les Entérobactéries, a engendré l'utilisation d'antibiotiques autres que ces derniers (**L. Dortet et al 2016**).

II.6.1. Traitement des infections à Entérobactéries sensibles aux carbapénèmes :

Le traitement des infections à Entérobactéries diffère selon l'espèce en cause :

E. Coli était initialement sensible à beaucoup d'antibiotiques, mais l'acquisition de résistances (souches productrices de pénicillinase) est fréquente, surtout en milieu hospitalier, le traitement de la première intention est soit le cotrimoxazole ou le fluoroquinolone.

Les salmonelles n'ont pas de résistance naturelle aux antibiotiques, mais les résistances acquises sont devenues fréquentes, d'où la nécessité d'un antibiogramme. Pour le traitement de la fièvre typhoïde, le chloramphénicol ou le cotrimoxazole sont généralement actifs et utilisés dans les pays en voie de développement (en raison de leur faible coût). Dans les pays industrialisés il est préférable d'utiliser soit les fluoroquinolones, soit des céphalosporines de 3^{ème} génération (C. Nauciel 2000).

Les shigelles n'ont pas de résistance naturelle vis-à-vis des antibiotiques actifs sur les bactéries à Gram négatif, mais les résistances acquises ne sont pas rares, d'où la nécessité d'un antibiogramme. En première intention, le cotrimoxazole, le fluoroquinolone ou la pénicilline A peuvent être utilisés (C. Nauciel et J-L. Vilde 2007).

II.6.2. Traitement des infections à Entérobactéries résistantes aux carbapénèmes :

L'usage des antibiotiques de la famille des carbapénèmes s'est répandu au cours des dernières années, notamment pour le traitement d'infections causées par des Entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération.

Tout comme d'autres bactéries, les Entérobactéries ont graduellement développé une résistance aux antibiotiques utilisés pour le traitement des infections qu'elles causent, elles ont développé une résistance aux carbapénèmes conférée par la production d'une carbapénémase (INSPQ 2010).

Le traitement des infections causées par ces EPC nécessite d'être adapté à chaque situation, et une collaboration clinicomicrobiologique est nécessaire pour déterminer l'antibiothérapie optimale, nécessité d'identifier précisément le type de carbapénémase, les mécanismes de résistance éventuellement associés et de déterminer des CMI des différentes molécules utilisables (C. Doit 2015).

Les carbapénémases sont le plus souvent associées à des résistances à d'autres familles d'antibiotiques contribuant à la multirésistance aux antibiotiques de ces souches, cette multirésistance est, en partie, due à l'association fréquente de BLSE. En pratique les possibilités thérapeutiques se limitent souvent au mieux à certains aminosides, à la tigécycline, à la colistine, à la fosfomycine (Y. Carmeli et al 2010 ; P. Nordmann et A. Carrer 2010).

La colistine (la polymyxine B) est un antibiotique bactéricide, sa cible est le lipopolysaccharide bactérien, composant de la membrane externe des bacilles à Gram négatif. Il a été abandonné dans les années 80 en raison de sa toxicité rénale et neurologique, ainsi que de la découverte de nouvelles céphalosporines. Il a été utilisé surtout sous forme d'aérosols inhalés. Depuis les épidémies de carbapénémases, cet antibiotique s'est refait une place dans les pharmacies hospitalières. Les bactéries productrices de carbapénémases peuvent y être sensibles. Une étude a montré qu'il était efficace même en cas d'infections sévères et que le profil d'effets indésirables était modéré (surtout néphrotoxicité) (M. Akova et al 2012).

En outre, l'augmentation de l'utilisation de ces molécules s'est accompagnée d'une augmentation des infections causées par des germes naturellement résistants à cette famille d'antibiotiques, tels que *Serratia*, *Morganella*, *Proteus* et *Providencia*. De plus, un nombre croissant d'études a montré l'émergence de la résistance acquise aux polymyxines chez les bacilles à Gram négatifs naturellement sensibles (notamment *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*), notamment dans les pays où l'utilisation de cette classe d'antibiotique est devenue routinière du fait de l'endémicité des EPC. Cet antibiotique est peu efficace en monothérapie et à posologie faible, il est le plus classiquement associé à d'autres molécules, cette association est souvent faite avec les carbapénèmes, du fait d'une synergie in vitro (G. Poulakou 2015 ; L. Dortet et al 2016).

La fosfomycine est un antibiotique bactéricide à large spectre, agit par inhibition de la synthèse des précurseurs du peptidoglycane, il est administré sous forme parentérale, son utilisation est également possible par voie orale (sous forme de fosfomycine-trométhamol). Cet antibiotique a un bon profil de tolérance avec peu d'effets indésirables et les bactéries productrices de carbapénémases y sont souvent sensibles. Toutefois, des études supplémentaires sur l'efficacité thérapeutique et le mécanisme de développement des résistances sont nécessaires (M. Abbas et al 2012).

Cette molécule devant toujours être associée du fait du risque important de sélection de mutants résistants, cette association est le plus souvent réalisée in vitro avec les carbapénèmes ou la tigécycline (V. Cattoir 2014).

La tigécycline est une glycylicycline, groupe apparenté aux tétracyclines. Un nouvel antibiotique bactériostatique à très large spectre, il inhibe la synthèse protéique des bactéries en se fixant sur la sous-unité ribosomale 30S. Des cas d'échec thérapeutique clinique ont été rapportés dans la littérature. De plus, *Proteus sp* présente une résistance naturelle à cet antibiotique (G. Poulakou 2015).

La tigécycline a été associée à un sur-risque de mortalité et d'échecs cliniques et n'est pas recommandée en monothérapie dans les infections sévères, elle doit être utilisée en association (méro-pénème ou fosfomycine) dans le traitement des infections à EPC (I. Oren et al 2013).

Les aminosides, la gentamicine reste le représentant le plus souvent actif, à un degré moindre, l'amikacine. Plusieurs études cliniques ont montré l'intérêt des aminosides en monothérapie dans le traitement des infections urinaires à EPC.

Une bithérapie, aminoside-carbapénème, est la combinaison la plus efficace dans le traitement des infections à EPC (G. Poulakou 2015).

II.6.3. Perspectives thérapeutiques:

Les perspectives de nouvelles molécules thérapeutiques dans le traitement des infections à EPC sont assez limitées.

L'avibactam (ou NXL-104) est un nouvel inhibiteur des β -lactamases, il se lie de façon covalente à ces derniers, associé à une céphalosporine (ceftazidime) ou à un carbapénème, aurait une bonne efficacité dans le traitement d'infections à Entérobactéries productrices de KPC ou d'OXA-48. L'avibactam est développé en association avec la ceftazidime, dans le but d'élargir le spectre de ces céphalosporines en inhibant les β -lactamases (G-G. Zhanel et al 2013).

L'**aztréonam**, une des particularités de cette molécule est qu'elle n'est pas hydrolysée par les métallo- β -lactamases, ni par l'enzyme OXA-48. Ainsi, son efficacité a été démontrée dans un modèle d'abcès intra-abdominal à *Escherichia coli* NDM-1 chez le lapin avec 100 % de survie. Cependant, l'efficacité de ce monobactame (à la posologie de 2 g toutes les 6 h en perfusion de 1 h) n'a pas été confirmée dans un autre modèle d'infection chez la souris (**G. Levy Hara et al 2013**).

Les Entérobactéries qui produisent uniquement OXA-48 restent sensibles in vitro aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G). Ainsi, un traitement par une C3G pourrait être envisageable en l'absence de co-production de BLSE/ céphalosporinase (environ 10 à 20 % des souches OXA-48). Dans un modèle murin de péritonite à *K.pneumoniae* OXA-48, il a été démontré que la ceftazidime était l'antibiotique le plus actif. Une autre étude a également confirmé la bonne efficacité de la ceftazidime (à la posologie de 1 g toutes les 8 h en perfusion de 2 h) dans un autre modèle d'infection chez la souris. Cependant, aucune étude clinique n'a confirmé ces résultats (**E. Martin et al 2013**).

CHAPITRE III
ENTEROCOQUES RESISTANTS
AUX GLYCOPEPTIDES

III. ENTEROCOQUES RESISTANTS AUX GLYCOPEPTIDES :

III.1. LES GLYCOPEPTIDES :

Les glycopeptides représentent une famille d'antibiotiques bactéricides, à usage exclusivement hospitalier, à spectre d'action étroit, dirigé contre les bactéries à Gram positif. Les représentants majeurs en médecine humaine de cette famille sont la vancomycine et la teicoplanine, elles constituent une option thérapeutique de choix pour le traitement des infections sévères dues au Staphylocoque résistant à la méticilline, à l'Entérocoque et au Streptocoque résistant aux pénicillines ou chez les sujets allergiques aux β -lactamines (N. Bourdon 2011 ; E. Binda et al 2014 ; R. Leclercq et V. Cattoir 2012).

Les glycopeptides sont de volumineuses molécules de haut poids moléculaire (1450 daltons pour la vancomycine et 1890 daltons pour la teicoplanine). Ils comportent un noyau central peptidique de sept acides aminés (Figure 8).

Cette structure tridimensionnelle en forme de poche leur confère une rigidité, dont le rôle est primordial lors de la liaison de l'antibiotique à sa cible sur la paroi cellulaire. Les différences entre les glycopeptides se situent au niveau des acides aminés 1 et 3 et des substrats attachés aux groupes aromatiques des acides aminés.

La formule empirique de la vancomycine est $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$ (Figure 8-a) et ses acides aminés 1 et 3 sont respectivement la leucine et une asparagine, alors qu'il s'agit de deux hydroxyphényl-glycines pour la teicoplanine (Figure 8-b).

La vancomycine est hydrosoluble si le pH est inférieur à 4 et la teicoplanine est hydrosoluble et liposoluble, ce qui permet une meilleure pénétration tissulaire (N. Bourgeois-Nicolaos et al 2005 ; M. Léone et al 2000).

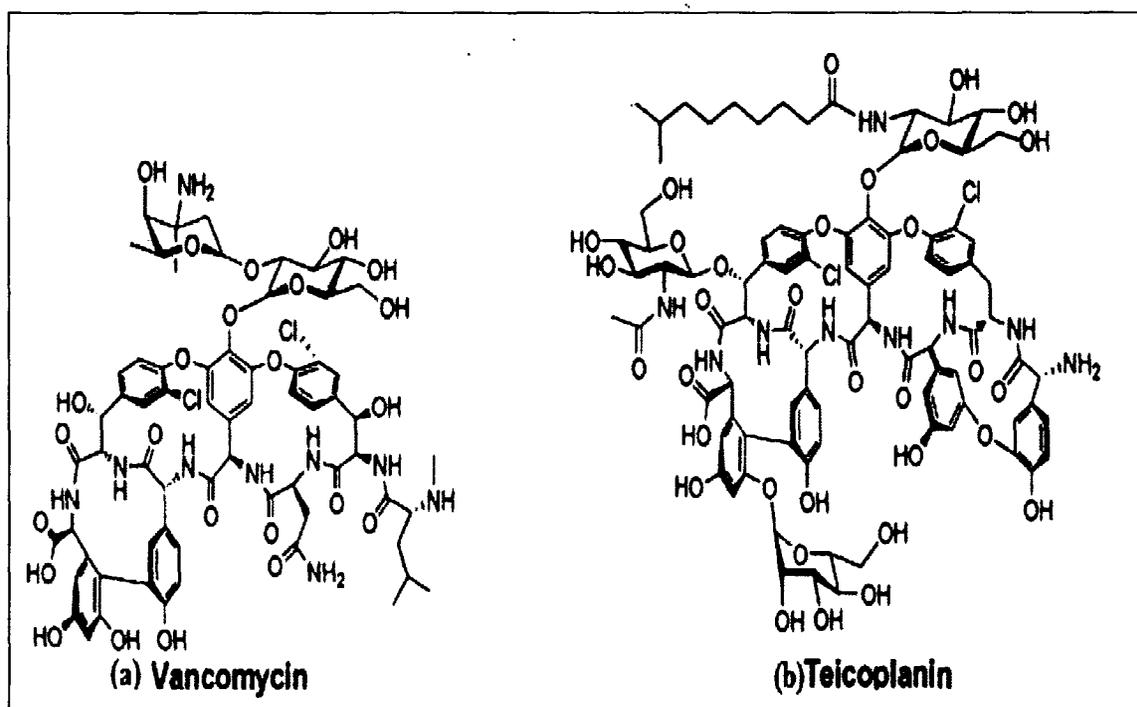


Figure 8: Structure chimique des glycopeptides (E. Binda et al 2014).

III.2. MECANISME D'ACTION DES GLYCOPEPTIDES :

-Les glycopeptides possèdent une activité bactéricide temps dépendante due à l'inhibition des réactions de transglycosylation, maximale sur les bactéries en phase de multiplication active (R. Gauzit et al 2002). Ils possèdent trois mécanismes d'action différents. Cette pluralité des mécanismes d'action peut expliquer en partie les faibles niveaux de résistance acquise après quarante années d'utilisation de ces antibiotiques (M. Léone et al 2000 ; J-L. Mainardi 2011).

Le mécanisme d'action principal est une inhibition de la synthèse du peptidoglycane avec pour conséquence la lyse bactérienne. Le peptidoglycane, constituant principal de la paroi des bactéries à Gram positif, dont la structure réticulée résulte de la polymérisation de sous-unités composées de diosides. Leurs précurseurs, les disaccharidepentapeptides (DSP), sont synthétisés dans le cytoplasme, puis transférés à la surface externe de la membrane cytoplasmique et incorporés dans le peptidoglycane préexistant. Plusieurs enzymes interviennent dans cette étape dont la transglycosylase qui permet la liaison du DSP au peptidoglycane préexistant, et la transpeptidase qui assure la liaison entre les chaînes polysaccharidiques. Ces deux enzymes clivent la liaison D-alanyl-D-alanine (D-ala-D-ala), puis relient la D-alanine avec l'acide aminé porté par un pentapeptide d'une autre chaîne polysaccharidique (V. Cattoir et R. Leclercq 2010).

Une troisième enzyme, la DD-carboxypeptidase régule la croissance du peptidoglycane par transformation du pentapeptide en tétrapeptide par excision d'un D-ala. Les glycopeptides, en se liant aux DSP, forment au niveau du D-ala-D-ala terminal une poche rigide, qui gêne le positionnement des transglycosylases et masque le site d'action des transpeptidases. Cette double action entraîne l'inhibition de la croissance puis la mort bactérienne.

-Pour la vancomycine, une inhibition de la synthèse d'ARN et une altération de la perméabilité membranaire sont deux mécanismes d'action supplémentaires décrits (Y. Gholizadeh et P. Courvalin 2000 ; M. Léone et al 2000).

Les glycopeptides sont des molécules fortement polaires, de taille importante, ils ne peuvent pas pénétrer à l'intérieur de la membrane lipidique des bactéries à Gram négatif donc ils sont inactifs contre ces dernières (N. Bourgeois-Nicolaos et al 2005 ; R. Gauzit et al 2002).

III.3. RESISTANCE DES ENTEROCOQUES AUX GLYCOPEPTIDES :

III.3.1. Mécanisme de résistance :

La résistance aux glycopeptides se manifeste en grande partie chez les Entérocoques par l'expression de gènes codant pour des protéines (nommés Van) qui reprogramment la biosynthèse des parois cellulaires et, par conséquent, se soustraient à l'action de ces antibiotiques (E. Binda et al 2014).

Neuf types de résistance aux glycopeptides ont été décrits, sur des critères phénotypiques et génotypiques, correspondant à une résistance naturelle ou acquise (V. Cattoir et R. Leclercq 2012).

- **Résistance naturelle** : observée chez *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus* et *Enterococcus flavescens*. Le support de cette résistance est le gène vanC qui est chromosomique et non transférable et qui confère une résistance de bas niveau à la

vancomycine tandis que la téicoplanine reste active (P. Courvalin 2006 ; J-C. Quincampoix et J-L. Mainardi 2001).

- **Résistance acquise** : observée surtout chez *E. faecium*, moins souvent chez *E. faecalis* et plus rarement chez d'autres espèces d'Entérocoques. Huit types de gènes (*vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* et *vanN*) correspondent à ce mécanisme de résistance. Le type VanA est le phénotype le plus fréquemment retrouvé chez les Entérocoques et qui présente un haut niveau de résistance aux glycopeptides, les autres types ont des niveaux de résistance variables (P. Courvalin 2005 ; P. Courvalin 2006).

La résistance des Entérocoques aux glycopeptides est due à la production de précurseurs de la paroi modifiés, par substitution d'une chaîne métabolique alternative à une chaîne enzymatique habituelle, permettant la synthèse de précurseurs modifiés ayant une faible affinité pour les glycopeptides. Ces précurseurs modifiés se terminent par un dipeptide D-alanyl-D-lactate (D-ala-D-lac) ou D-alanyl-D-sérine (D-ala-D-ser) au lieu de D-alanyl-D-alanine (précurseurs naturels de haute affinité) (V. Cattoir et R. Leclercq 2010 ; N. Bourdon 2011).

Ce sont les souches qui ont une résistance acquise que l'on appelle couramment Entérocoque résistant glycopeptides (ERG), et cela quel que soit le gène en cause (J. Robert 2007).

III.3.2. Support génétique de la résistance :

- Génotype van A :

Le *vanA* est le type de résistance aux glycopeptides le plus courant chez les Entérocoques, le prototype de l'élément génétique *vanA* est le transposon Tn1546 (de 11 kb) porté par des plasmides autotransférables, ce transposon code pour 9 gènes (*vanA*, *vanH*, *vanR*, *vanS*, *vanX*, *vanY*, *vanZ*, ORF1 et ORF2) qui eux même codent pour 9 polypeptides (Figure 9-A) (P. Courvalin 2005 ; J-C. Quincampoix et J-L. Mainardi 2001).

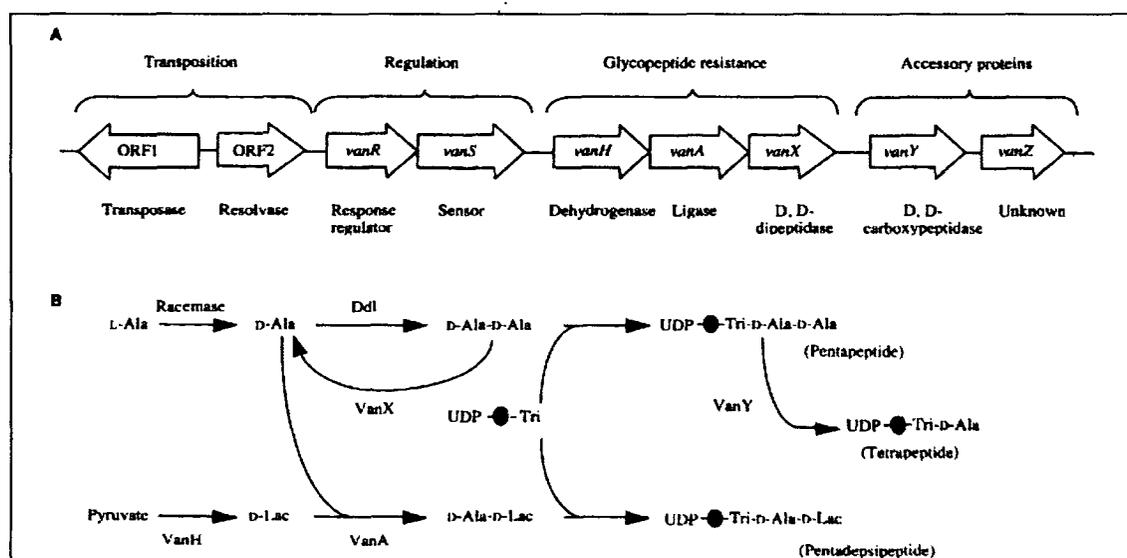


Figure 9 : Résistance aux glycopeptides type *vanA*
(Y. Gholizadeh et P. Courvalin 2000)

Les neuf polypeptides interviennent dans le mécanisme de la résistance. Les polypeptides codés par les gènes *vanR* et *vanS* interviennent dans la régulation de l'expression de la

résistance, l'expression coordonnée de *vanH*, *vanA*, et *vanX* est nécessaire au mécanisme de résistance (N. Bourgeois-Nicolaos et al 2005).

Le gène *vanH* code pour une déshydrogénase qui réduit le pyruvate présent de la bactérie en D-lactate, Le gène *vanA* code pour une ligase qui synthétise un dipeptide terminal anormal (D-alanyl-D-lactate) de faible affinité pour les glycopeptides alors que le gène *vanX* code pour une dipeptidase qui hydrolyse le dipeptide D-ala-D-ala synthétisé par la ligase D-ala-D-ala de la bactérie.

Les gènes *vanY* et *vanZ* sont accessoires alors que ORF1 et ORF2, deux gènes codant pour une transposase et une résolvasse qui sont responsables des mouvements du transposon dans le génome bactérien (Figure 9-B).

Le mécanisme génétique de la résistance fonctionne sur un mode récessif et l'expression des gènes *van* est induite par des concentrations subinhibitrices de glycopeptides (M. Arthur et R. Quintiliani 2001 ; Y. Gholizadeh et P. Courvalin 2000).

- Génotype *vanB* :

Le *vanB* est le deuxième type de résistance aux glycopeptides après le *vanA*, observé chez *E. faecalis* et *E. faecium*, les gènes *vanB* sont associés aux grands transposons (Tn1547, Tn1549, Tn5382 ou Tn916) qui sont souvent chromosomiques, mais qui peuvent être plasmidiques (F. Depardieu et al 2005). Ils sont autotransférables par conjugaison (R. Quintiliani et P. Courvalin 1994).

La résistance acquise du type *vanB* est due à la synthèse de précurseurs de peptidoglycane se terminant par le depsipeptide D-ala-D-lac au lieu du dipeptide D-ala-D-ala. L'organisation et la fonctionnalité du gène *vanB* est semblable à celui du gène *vanA* mais diffère dans sa régulation, car la vancomycine, mais pas la téicoplanine, est un inducteur du groupe *vanB*.

L'opéron *vanB* contient des gènes de résistance (*vanY_B*, *vanW*, *vanH_B*, *vanB*, *vanX_B*) et des gènes régulateurs (*vanR_B* et *vanS_B*) (Figure10).

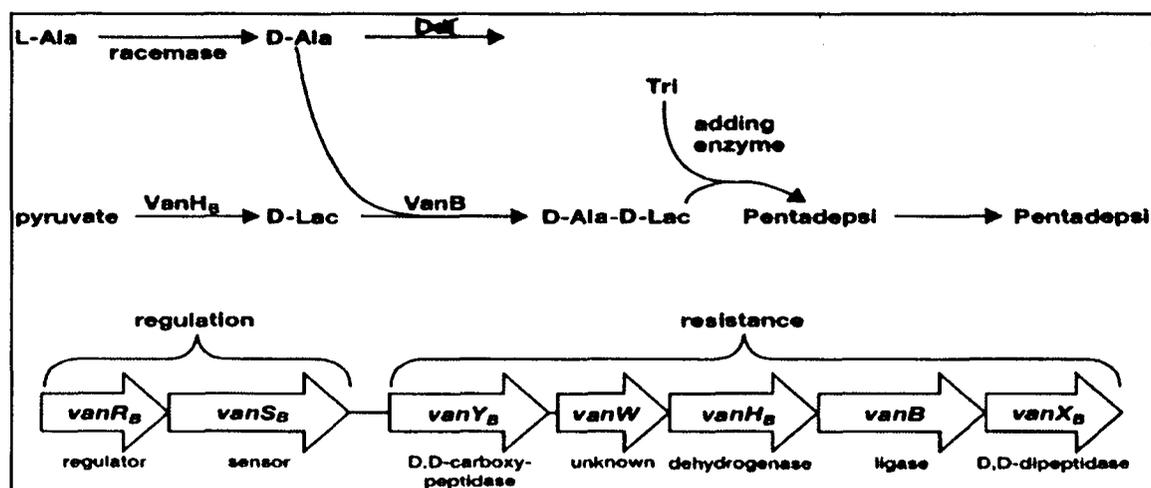


Figure 10 : Résistance aux glycopeptides type *vanB*
(P. Courvalin 2006).

Le gène *vanH_B* code pour une déshydrogénase qui réduit le pyruvate en D-lac, le gène *vanB* code pour une légase qui synthétise le depsipeptide D-ala-D-lac et le gène *vanX_B* code pour une dipeptidase qui hydrolyse le dipeptide D-ala-D-ala synthétisé par D-ala-D-ala ligases (*ddl*) naturelles de la bactérie (F. Depardieu et al 2005).

Ces gènes ont un haut niveau d'identité de séquence (identité 67% -76%) avec les gènes déduits correspondantes de l'opéron *vanA*.

Le gène *vanY_B* code pour DD-carboxy-peptidase. La fonction de la protéine *vanW* supplémentaire trouvée uniquement dans le groupe *vanB* est inconnue (F. Patel et al 1998 ; S. Evers et P. Courvalin 1996).

Les gènes régulateurs *vanR_B* et *vanS_B* sont liés de façon éloignée aux gènes *vanR* et *vanS* de l'opéron *vanA* (34% et 24% d'identité).

Sur la base des différences de séquence, le groupe de gènes *vanB* peut être divisé en 3 sous-types: *vanB1*, *vanB2* et *vanB3*. Il n'y a pas de corrélation entre le sous-type *vanB* et le niveau de résistance à la vancomycine (F. Patel et al 1998 ; P. Courvalin 2006 ; S. Evers et P. Courvalin 1996).

- Génotype van D :

La résistance acquise de type *vanD* est due à la production constitutive de précurseurs de peptidoglycane se terminant par D-ala-D-lac (F. Depardieu et al 2004). L'organisation de l'opéron *vanD*, qui se trouve exclusivement dans le chromosome est similaire à celle du *vanA* et *vanB* (Figure 11). Cependant, aucun gène homologue à *vanZ* ou *vanW* des opérons *vanA* et *vanB*, respectivement, n'est présent (P. Courvalin 2006).

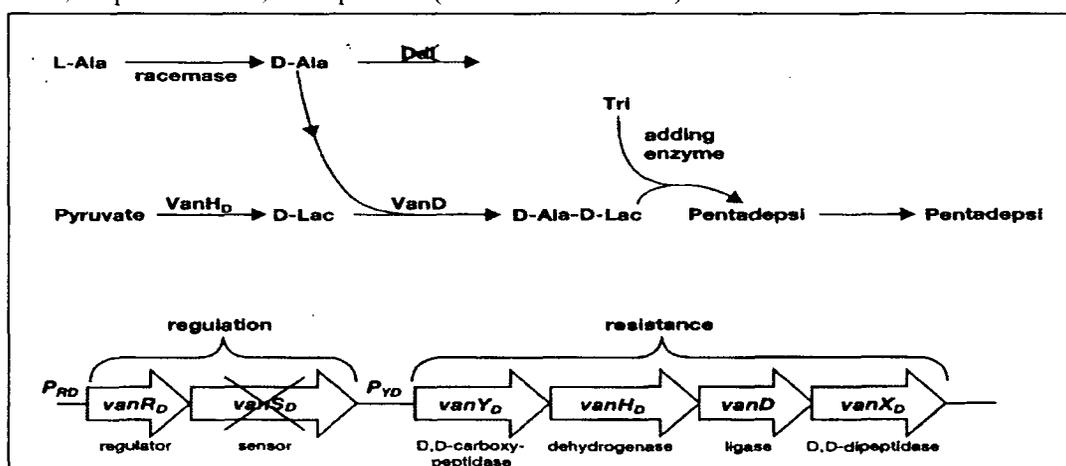


Figure 11 : Résistance aux glycopeptides type *VanD*
(P. Courvalin 2006).

Les souches de type *vanD* partagent d'autres caractéristiques qui les distinguent des entérocoques de type *vanA* et *vanB*. La résistance est constitutive et n'est pas transférable par conjugaison à d'autres entérocoques. Les souches de type *vanD* ont une activité DD-dipeptidase négligeable, ce qui devrait conduire à un phénotype sensible, car ces bactéries sont incapables d'éliminer les précurseurs de peptidoglycane se terminant en D-ala-D-ala, qui est la cible pour les glycopeptides. Cependant, dans les souches de type *vanD*, la voie susceptible ne fonctionne pas, parce que le *ddl* est inactif à la suite de diverses mutations dans

le gène chromosomique *ddl*. Par conséquent, les souches ne devraient croître qu'en présence de vancomycine, car elles reposent sur la voie de résistance inductible pour la synthèse du peptidoglycane. Une caractéristique inhabituelle des souches de type *vanD* est leur seule susceptibilité légèrement diminuée à la teicoplanine (F. Depardieu et al 2005).

- Génotype *van C* :

La résistance naturelle de type *vanC* est due à la production de précurseurs de peptidoglycane se terminant par D-alanine-D-serine. Trois gènes *vanC* de localisation chromosomique (non transférable), exprimés de manière constitutive ou induite, codant pour les ligases D-ala-D-ser ont été décrits, *vanC1* chez *E. gallinarum*, *vanC2* chez *E. casseliflavus* et *vanC3* chez *E. flavescens* (P. Courvalin 2006).

L'organisation de l'opéron *vanC*, est distincte de ceux de *vanA*, *vanB* et *vanD* (Figure12).

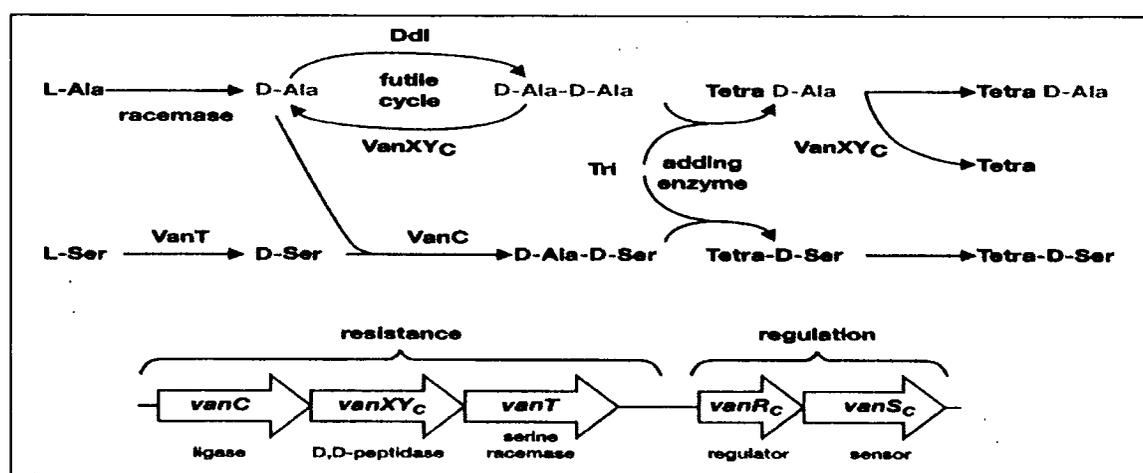


Figure 12 : Résistance aux glycopeptides type *vanC*
(P.Courvalin 2006).

Trois protéines sont nécessaires pour la résistance de type *vanC*, la *vanT*, une serine racémase, qui produit D-ser, la *vanC*, une ligase qui catalyse la synthèse de D-ala-D-ser et la *vanXYC*, qui possède à la fois des activités DD-diéptidase et DD-carboxypeptidase et permet l'hydrolyse de précurseurs se terminant en D-ala (Figure12), dans le groupe *vanC*, les gènes de régulation sont situés en aval du gène de résistance *VanT* (D. Panesso et al 2005).

Les protéines déduites de l'opéron *vanC2* d'*E. casseliflavus* présentent un degré élevé d'identité (71% -91% d'identité) avec celles codées par l'opéron *vanC*, et celles du groupe de gènes *vanC3* d'*E. flavescens* présentent une identité étendue avec *vanC2* (97% -100% d'identité), y compris les régions intergéniques. Il est donc difficile de distinguer l'espèce *E. casseliflavus* de l'*E. flavescens* (P. Courvalin 2006).

III.3.3. Phénotypes de résistance:

Les génotypes de résistance aux glycopeptides *vanA*, *vanB*, *vanD* et *vanC* correspondent respectivement aux phénotypes *VanA*, *VanB*, *VanD* et *VanC*.

- **Phénotype *Van A***: est le phénotype le plus fréquemment retrouvé chez les Entérocoques, décrit chez *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis* ainsi que chez de nombreuses autres espèces d'Entérocoques, présente un haut niveau de résistance inductible à la

vancomycine (CMI > 64 mg /l) et à la teicoplanine (CMI > 16 mg/l) (V. Cattoir et R. Leclercq 2010 ; S. Dutka-malen et P. Courvalin 1994).

- **Phénotype Van B** : ce phénotype de résistance acquise, est constitué de souches d'*E. faecalis* et d'*E. faecium* résistantes de façon inductible à la vancomycine avec des CMI très variables (CMI = 4–1 000 µg/ml) mais qui demeurent sensibles à la teicoplanine (CMI = 0,5–1 µg/ml) (V. Cattoir et R. Leclercq 2010 ; R. Quintiliani et al 1993).

- **Phénotype Van D** : décrit chez *E. faecium* et *E. faecalis*, le phénotype Van D a une résistance constitutive à la vancomycine (CMI = 64µg/ml) et une résistance de bas niveau à la teicoplanine CMI de 4 µg/ml. Il ne présente pas de risque écologique (B. Perichon et al 1997).

- **Phénotype Van C** : les trois phénotypes VanC1, VanC2, VanC3 présentent un bas niveau de résistance à la vancomycine avec des CMI entre 2 et 32 µg/ml et restent sensibles à la teicoplanine CMI égale à 0.5–1 µg/ml (J-C. Quincampoix et J-L. Mainardi 2001).

Les caractéristiques des principaux types de résistance aux glycopeptides chez les Entérocoques sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau IV : Les caractéristiques des principaux types de résistance aux glycopeptides chez les Entérocoques

Caractère \ Résistance	acquise			naturelle
	VanA	VanB	VanD	VanC1 VanC2 VanC3
CMI (µg/ml) vancomycine	64-1000	4-1000 (Souvent 16-64)	64-128	2-32
CMI (µg/ml) teicoplanine	16-512	0.5-1	4-64	0.5-1
Expression des gènes	Inductible	Inductible	Inductible	Constitutive Inductible
Support génétique et localisation	Transposon, plasmide, chromosome	Transposon, plasmide, chromosome	Chromosome	Chromosome
Cible modifiée	D-ala-D-lac	D-ala-D-lac	D-ala-D-lac	D-ala-D-ser
Transférabilité par conjugaison	+	+	-	-
Espèce bactérienne	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. mundtii</i> <i>E. avium</i> <i>E. durans</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. flavescens</i>

(M. Leone et al 2000, M. Fines et al 2007).

III.4. METHODES DE DETECTION:

L'isolement d'une souche d'Entérocoque résistant aux glycopeptides est une alerte, pour les risques d'épidémie qui nécessite une enquête de dépistage, et pour la prévention des infections nosocomiales.

Il existe des techniques phénotypiques et génotypiques pour détecter les ERG (J. Delmas et al 2005 ; K. Rahal et al 2014).

III.4.1. Méthodes phénotypiques :

*Prélèvement à visée diagnostique :

La mise en évidence de la résistance des Entérocoques aux glycopeptides se fait en trois étapes :

a. Critères de présomption ou d'alerte :

Après réalisation d'un antibiogramme avec un disque de vancomycine 30 μ g (VAN) et un disque de teicoplanine 30 μ g (TEC), et mesure des diamètres d'inhibition, selon les critères suivants :

Tableau V : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et leurs interprétations chez les Entérocoques (VAN, TEC)

	Résistant	Intermédiaire	Sensible
Vancomycine	≤ 14	15-16	≥ 17
Teicoplanine	≤ 10	11-13	≥ 14

(K. Rahal et al 2014).

Il y'a présomption d'un ERG si :

- Un diamètre d'inhibition <17mm pour VAN et <14mm pour TEC.
- Une différence de 3mm (au moins) entre les diamètres d'inhibition de VAN et de TEC.
- Présence de colonies dans les zones d'inhibition de VAN et /ou TEC (K. Rahal et al 2014).

R ! L'échec thérapeutique est également un signe d'alerte.

S'il y a présence de l'un de ces critères, un screening test et une CMI sont réalisés.

b. Tests de screening ou de criblage :

Ces tests nécessitent l'utilisation de milieux sélectifs spécifiques contenant de la vancomycine (J. Robert 2007).

Sur milieu solide à base de Brain Heart Infusion (BHI) agar additionné de 6 μ g/ml de vancomycine, ensemencement, par spot, de 1à10 μ l d'une suspension de 0.5McF. Le milieu est ensuite incubé à 35 \pm 2 °C pendant 24heures (K. Rahal et al 2014).

S'il y a une poussée de plus d'une colonie, le test est interprété comme positif, faire une CMI (test de confirmation) (K. Rahal et al 2014).

c. Test de confirmation :

Ce test est obligatoire devant tout test de présomption et/ou de criblage positif. Il est basé sur la détermination des CMI, soit par dilution en milieu gélosé, avec un inoculum de 0.5 McF dilué au 1/10^{cme} puis ensemencer 1à2 μ l par spot, sur MH agar et incubé pendant 24heures. Ou par E-test à partir d'un inoculum de turbidité de 0.5McF ensemencé sur gélose MH et incubé pendant 24 heures à 37 °C (K. Rahal et al 2014 ; C. Surcouf et al 2009).

L'interprétation des CMI se présente comme suit :

Tableau VI : Valeurs critiques des concentrations minimales inhibitrices et leurs interprétations chez les Entérocoques (VAN, TEC)

	Sensible	Intermédiaire	Résistant
Vancomycine (µg/ml)	≤ 4	8-16	≥ 32
Teicoplanine (µg/ml)	≤ 8	16	≥ 32

(K. Rahal et al 2014).

***Prélèvement de dépistage:**

Le dépistage du portage fécal de l'ERG n'est pas réalisé en routine par les laboratoires de bactériologie. Ce dépistage se fait sur un prélèvement anal, par écouvillonnage rectal, et nécessite l'utilisation de milieux sélectifs spécifiques contenant de la vancomycine.

Deux protocoles d'isolement et de caractérisation des souches sont menés en parallèle. Le premier est dit protocole «direct», il comprend l'ensemencement de l'écouvillon rectal sur gélose Bile Esculine Agar (BEA) + 6 mg/l de vancomycine, le second est dit protocole «enrichissement», il comprend l'ensemencement de l'écouvillon rectal dans un bouillon d'enrichissement sélectif Todd Hewitt + azide de sodium + 6 mg/l de vancomycine, un repiquage à la 18^{ème} heure sur gélose BEA + 6 mg de vancomycine (C. Surcouf et al 2011).

La recherche du portage des ERG peut être aussi effectuée par ensemencement des écouvillonnages rectaux sur gélose sélective D-coccosel contenant 4 mg/l de vancomycine (S. Godreuil et al 2007).

- Les techniques phénotypiques sont simples et faciles à réaliser, elles permettent de suivre épidémiologiquement la sensibilité des souches (S. Dekayser et al 2011), par contre, l'identification des souches d'ERG sur ces milieux n'est pas aisée et peut prendre plusieurs jours (3 à 4 jours) avant identification complète. De plus, il n'est pas simple de distinguer les souches d'Entérocoque ayant une résistance acquise (vanA, vanB) de celles ayant une résistance naturelle (vanC) à la vancomycine (S. Dekayser et al 2011 ; J. Robert 2007).

III.4.2. Méthodes génotypiques (techniques de biologie moléculaire) :

La biologie moléculaire permet l'identification d'espèce et la détermination du génotype de résistance aux glycopeptides, la technique de référence est la PCR, basée sur l'amplification du gène codant pour l'ARN 16S couplée au séquençage pour la recherche des gènes de résistances aux glycopeptides (vanA, vanB et vanC) et des gènes spécifiques des espèces *E. faecalis*, *E. faecium* et *E. gallinarum* (C. Surcouf et al 2011 ; S. Godreuil et al 2007). L'identification des gènes amplifiés est alors réalisée selon la taille des fragments amplifiés après migration électrophorétique en gel d'agarose (P. Courvalin 2006).

La PCR donne des résultats rapides (moins d'une heure) et permet l'identification de l'ERG directement à partir des échantillons biologiques, par contre, elle est coûteuse et n'est pas réalisable par tous les laboratoires et c'est pourquoi il est demandé d'adresser toutes les souches au laboratoire de référence (S. Dekeyser et al 2011 ; M. Thibault 2011).

III.5. EPIDEMIOLOGIE :

III.5.1. Portage :

Les Entérocoques, résistants ou non aux glycopeptides, colonisent le tube digestif de l'homme, des mammifères, des oiseaux et des reptiles. Ils peuvent également coloniser la bouche, les voies respiratoires supérieures, le vagin et la région périnéale (N. Bourdon et al 2011 ; C. Jehl et al 2011).

Les Entérocoques résistants aux glycopeptides ont surtout une colonisation digestive asymptomatique (porteur asymptomatique), mais ils peuvent également être à l'origine d'infections urinaires et intra-abdominales, de bactériémies et d'endocardites (N. Bourdon 2011). Ils sont souvent responsables d'infections associées aux soins (IAS) (J-M. Thiolet et al 2007).

III.5.2. Mode de transmission :

Les ERG, qui ont la capacité de coloniser le tube digestif (portage commensal), avec parfois des taux considérables (jusqu'à 10^9 /g de selles), favorisent une dissémination occulte dans la population hospitalière et dans la population générale (C. Doit 2015).

Le principal mode de transmission des ERG est le manuportage. Des études ont montré que des ERG pouvaient être retrouvés sur les mains de personnels soignants avec une fréquence variant de 0 à 41 % (L-S. Chavers et al 2003). Les surfaces environnementales inertes (lits, barrières, tablettes) et le matériel médical (glucomètres, thermomètres et tensiomètres, par exemple) peuvent également être colonisés par les ERG et constituent un autre réservoir en milieu hospitalier, favorisant ainsi des transmissions croisées, mais ce mode de transmission est nettement moins important que la contamination par manuportage (C. Jehl et al 2011).

Le risque de la transmission est accru en présence d'une diarrhée, une incontinence fécale, présence de dispositifs invasifs, plaie avec écoulement et les suppurations (CCLIN Ouest 2011).

Les ERG sont capables de persister pendant de longues périodes (plusieurs mois) dans l'environnement, hospitalier par exemple, sur toute surface ayant été en contact avec un élément souillé, ils sont capables de persister de 5 jours à 4 mois, sans différence de survie en fonction du profil de résistance aux antibiotiques (A. Kramer et al 2006).

Différents facteurs de risque d'acquisition d'un ERG ont été identifiés dans la littérature: la durée de séjour, le grand âge, les hospitalisations multiples, l'insuffisance rénale, la présence d'un cathéter central, l'administration d'un traitement anticancéreux ou d'un traitement antibiotique par vancomycine, céphalosporine de 3^{ème} génération ou imipénème (InVs 2007).

III.5.3. Données épidémiologiques :

- Situation mondiale :

L'Entérocoque résistant aux glycopeptides (ERG) est apparu pour la première fois en 1986 en France et en Angleterre, il s'agit d'une souche d'*E. faecium*, puis dans le monde entier, et notamment aux États-Unis (à New York) en 1988 où les ERG sont devenues endémo-épidémiques dans les hôpitaux nord-américains avec une proportion de souches résistantes à la vancomycine qui atteint 28 % en 2003 et une place au 3^{ème} rang des bactéries multirésistantes dans les unités de soins intensifs avec des taux de prévalence chez *E. faecium* de plus de 80 % (V. Cattoir et R. Leclercq 2010 ; C. Rabaud et al 2008).

Parmi 66 000 infections nosocomiales à Entérocoques survenues au États-Unis chaque année, 20 000 infections sont des ERG et environ 1 300 décès attribués à ces infections (CDC 2013). En Corée, en 2002, la proportion d'*E. faecium* résistants à la vancomycine était de 16 % (K. Lee et al 2004), une première épidémie a été décrite au Brésil en 2006 (R. Titze-de-Almeida et al 2006).

Au Mexique, au cours de 2013, 56 isolats (37,1%) étaient résistants à la vancomycine, dont 48 (85,7%) provenaient de Monterrey et 8 (14,3%) provenaient de Guadalajara (**P. Bocanegra- Ibariasa et al 2015**).

En Turquie, entre janvier et juillet 2008, parmi 100 isolats d'Entérocoques principalement isolés à partir d'échantillons d'urine, 18,2% des isolats étaient résistants aux glycopeptides, la majorité était des souches d'*E. faecalis* (67%), suivi par *E. faecium* (33%) (**M. Butcu et al 2011**).

Au Canada, en 2009, plus de 3 000 nouveaux cas d'Entérocoques résistants à la vancomycine ont été détectés, les infections à ERG, ont légèrement augmenté entre 2009 et 2013 (0,31 et 0,52 par 10 000 jours-patients, respectivement) (**PCSIN 2015**).

En Europe, les données du réseau EARSS (Europeann Antimicrobial Resistance Surveillance) montrent une augmentation des ERG, avec néanmoins une évolution contrastée. La proportion d'*E. faecium* résistants aux glycopeptides isolés de bactériémies est supérieure à 20 % dans plusieurs pays (Irlande, Portugal, Grèce, Grande-Bretagne) et reste faible, inférieure à 1 %, dans d'autres comme les pays scandinaves.

En 2012, une augmentation inquiétante d'infections nosocomiales à ERV **en Allemagne**, avec un taux atteignant plus de 10% a été signalé (**L. Senn et al 2013**).

En France, la situation est restée stable jusqu'en 2004 (prévalence estimée à moins de 2%), bien que de petites épidémies aient été signalées. Des études datant de la fin des années 1990 avaient montré, en milieu extra-hospitalier, qu'un pourcentage non négligeable de personnes saines héberge des ERG dans les selles, jusqu'à 9% dans une population de sujets jeunes et en bonne santé. Trois centres hospitaliers ont fait l'objet d'épidémies d'ampleur inhabituelle (Nancy, Clermont Ferrand et divers hôpitaux de l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, APHP). Parmi ces signalements, 80% étaient des *E. faecium*, 15% des *E. faecalis*, et 5% des *Enterococcus spp* (**J-C. Lucet et al 2008**).

De 2001 à juin 2008, 382 signalements à ERG ont été effectués par 157 établissements de santé, 196(51,3 %) provenaient de l'inter-région Est, 118(30,1 %) de l'inter-région Paris-Nord (dont 73 de l'Île-de-France), 40 de l'inter-région Sud-Est, 17 de l'inter-région Ouest et 11 de l'inter-région Sud-Ouest. Il s'agissait de *E. faecium* pour 341 (89,2 %) signalements et de *E. faecalis* pour 29 (7,6 %), 59(15,4 %) concernaient des cas groupés (n>2 cas) à la date du signalement. En 2007, le nombre de signalements (n=141) a plus que triplé par rapport à 2005 et 2006(**C. Rabaud et al 2008**).

En 2010, la proportion de résistance à la vancomycine pour l'espèce *E. faecium* était estimée à 1,1% (**EARSS 2010**). Entre 2010 et 2011, le taux de résistance restait stable (<1%) (**InVS 2014**).

Le nombre des infections nosocomiales(IN) de l'ERG a nettement augmenté entre 2003 (5 IN, soit 0,7% du total des IN) et 2008 (245 IN, soit 18,6%), période marquée par des épidémies importantes dans le nord et l'est de la France. Ce chiffre a diminué en 2009 et s'est stabilisé entre 110 et 155 IN reçus (environ 8%) jusqu'en 2014. Depuis, la proportion d' IN de l'ERG semble augmenter, avec 114 IN (9,9%) reçus pour les six premiers mois de 2015 (**M. Subiros et al 2016**).

En Afrique du Sud, en 1997, l'émergence de souches d'Entérocoques résistantes à la vancomycine ont été rapportées. D'autres auteurs sud-africains de Johannesburg notifient en

février 2000, l'émergence de souches d'Entérocoque résistantes aux glycopeptides : trois *E. faecium* Van A, dix *E. faecium* Van B, six *E. gallinarum* Van C et un *E. avium* Van A. Ces souches ont été isolées en 1998 lors d'une enquête de prévalence dans quatre hôpitaux à partir d'écouvillons rectaux de patients à haut risque d'infections nosocomiales (M. Dosso et al 2000 ; A. Von Gottbere et al 2000).

- Situation en Algérie :

En Algérie, l'isolement d'un ERG était rare (M. Hamidi et al 2013). Le premier cas d'Entérocoque résistant à la vancomycine (ERV) a été signalé en novembre 2006, chez un patient âgé de 24 ans, régulièrement suivi par le service de pédiatrie de l'hôpital central de l'armée depuis sa naissance pour uropathie malformative dans un échantillon d'urine (N. Aggoune 2008).

En 2007, un premier cas d'*E. faecalis* résistant à la vancomycine a été rapporté en Algérie. Après, deux cas d'infections à *E. faecium* résistant aux glycopeptides ont été signalés, Il s'agit d'un patient de sexe masculin âgé de 24 ans hospitalisé au niveau du service de médecine interne du CHU Béni-Messous pour syndrome infectieux sévère (M. Hamidi et al 2013).

De septembre 2007 à décembre 2008, une souche d'*Enterococcus sp* résistante à la vancomycine, identifiée phénotypiquement *Enterococcus faecalis* s'est avéré être un *E. gallinarum* par technique moléculaire au niveau de l'IPA (institut pasteur d'Alger) a été isolé chez un patient hospitalisé (AARN 2009), puis deux cas de ERV ont été signalés en 2009 (AARN 2010). En 2010, trois souches d'ERV ont été isolées chez deux patients hospitalisés et un externe (AARN 2011).

En 2011, un total de neuf ERG a été signalé (AARN 2012).

Entre 2012 et 2013, dix-sept souches d'*E. faecium* et trois souches d'*E. faecalis* résistants aux glycopeptides ont été isolés chez des patients hospitalisés (AARN 2015).

En 2014, un total de 21 ERV, dont 9 *E. faecium*, ont été signalés (AARN 2016). Aucun cas d'*E. faecalis* résistant aux glycopeptides n'a été signalé en 2015, alors que 11 souches d'*E. faecium* ont été signalées (AARN 2017).

III.6. TRAITEMENT :

Les infections à Entérocoques sont difficiles à traiter, non seulement du fait de la multiplication des résistances, mais aussi du fait que ce sont des bactéries « tenaces », avec une grande capacité de dissémination entre patients au sein d'un service hospitalier.

Ces bactéries sont naturellement résistantes à de nombreux antibiotiques, mais les glycopeptides étaient constamment actifs jusqu'aux années 1980 où l'utilisation fréquente des glycopeptides et en particulier la vancomycine a favorisé le développement d'infections à Entérocoques résistants à la vancomycine (F. Jaureguy et al 2012 ; C. Doit 2015).

III.6.1. Traitement des infections à Entérocoques sensibles aux glycopeptides:

Les Entérocoques ont une sensibilité diminuée aux β -lactamines, les CMI pour la pénicilline G sont $< 4 \mu\text{g/ml}$. Ils sont naturellement résistants aux pénicillines M, aux céphalosporines (de la 1^{ère} à la 4^{ème} génération) et aux monobactam (A. Boibieux 2010). Les Entérocoques ont aussi une résistance naturelle de bas niveau aux aminosides (CMI gentamicine de 4-8 $\mu\text{g/ml}$), l'espèce *E. faecalis* se caractérise en plus par une résistance naturelle aux lincosamides et aux sulfamides (J-C. Quincampoix et J-L. Mainardi 2001). Ces antibiotiques ne sont en général que bactériostatiques.

Le traitement optimal repose sur l'association d'un antibiotique actif sur la paroi bactérienne (β -lactamine ou glycopeptide en cas d'allergie) à un aminoside (gentamicine). La synergie entre la gentamicine (CMI = 4–16 $\mu\text{g/ml}$) et les β -lactamines, permettant une action bactéricide (J-M. Miro 2009 ; F. Luchi et al 1994).

Malgré la résistance naturelle des Entérocoques aux céphalosporines de 3^{ème} génération, une synergie entre l'amoxicilline et le céfotaxime a été montrée avec une bactéricidie de l'association pour des concentrations faibles des deux antibiotiques. Le marquage des PLP par de la pénicilline radioactive en compétition avec l'amoxicilline, le céfotaxime et l'association a montré que ce phénomène s'explique par une fixation différente de ces deux antibiotiques sur les PLP (M-P. Fernandez-Gerlinger et J-L. Mainardi 2014).

III.6.2. Traitement des infections à Entérocoques résistants aux glycopeptides :

Les Entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG) sont des Entérocoques ayant développé une résistance non naturelle à au moins un antibiotique de la famille des glycopeptides (M. Subiros et al 2016).

L'association quinupristine-dalfopriline, la daptomycine, le linézolide, la tigécycline et l'oritavancine sont les alternatives des glycopeptides pour le traitement des ERG :

L'association quinupristine (streptogramine du groupe A) et dalfopriline (streptogramine du groupe B) n'est active que sur les souches d'*E. faecium*, cette association est synergique et lui confère une action bactéricide (son action étant dix fois supérieure à la somme des activités de chaque molécule). Elle inhibe la synthèse protéique bactérienne par la formation d'un complexe stable avec les ribosomes après pénétration dans la cellule bactérienne, elle s'administre par voie intraveineuse (IV) avec une posologie de 7,5 mg/kg toutes les huit heures. Sa veino-toxicité nécessite l'utilisation d'un cathéter veineux central (A. Makinson et V. Lemoing 2008 ; C. Doit 2015).

La daptomycine est un lipopeptide cyclique administrable par voie intraveineuse, rapidement bactéricide concentration-dépendant. Cependant, cet antibiotique a surtout été développé contre les Staphylocoques à la dose de 6 mg/kg par jour. Son mécanisme d'action implique la liaison aux membranes bactériennes des cellules en phase de croissance et en phase stationnaire entraînant une dépolarisation et aboutissant à une inhibition rapide de la synthèse protéique de l'ADN et de l'ARN provoquant la mort de la cellule bactérienne (VIDAL 2013 ; V. Cattoir et R. Leclercq 2010).

Le **linézolide** fait partie d'une nouvelle classe d'antibiotiques, les oxazolidinones, administrables par voie IV et par voie orale avec une bonne biodisponibilité. C'est un antibiotique bactériostatique, mais bactéricide sur les Entérocoques, il inhibe la synthèse protéique bactérienne en empêchant la formation du complexe ribosomal 70S, et dont la pharmacocinétique bien connue chez l'enfant en fait pour le moment l'antibiotique de première ligne dans les bactériémies à ERG (CMI 1 $\mu\text{g/ml}$) chez l'enfant, Les posologies suggérées sont de 10 mg/kg toutes les huit heures jusqu'à 12 ans et de 600 mg toutes les 12 heures au-delà de 12 ans. En raison de sa toxicité hématologique potentielle, son utilisation au-delà de 28 jours est proscrite (P-D. Tamma et A-J. Hsu 2014 ; O. Lesens 2009).

La tigécycline est une glycylcycline qui a l'intérêt par rapport aux tétracyclines classiques d'être active contre les souches résistantes à ces dernières. Les souches cliniques résistantes sont exceptionnelles. C'est un antibiotique bactériostatique à très large spectre comprenant

toutes les bactéries à Gram positif y compris les ERG et de nombreuses bactéries à Gram négatif (C. Doit 2015 ; V. Cattoir et C. Daurel 2010).

L'**oritavancine** est un nouveaux glycopeptide, semi-synthétique de la vancomycine ayant une activité bactéricide sur les bactéries à Gram positif, son administration est IV (HAS 2015).

Il a montré en association avec la gentamicine une supériorité comparée à une monothérapie par oritavancine seule en termes d'activité antimicrobienne dans un modèle d'endocardite expérimentale et de prévention de mutants résistants à l'oritavancine (M-P. Fernandez-Gerlinger et J-L. Mainardi 2014).

III.6.3. Perspective thérapeutiques:

Pour les Entérocoques, la synergie de l'association d'ampicilline (ou d'amoxicilline) et de ceftriaxone ou de céfotaxime démontrée in vitro a montré son intérêt in vivo pour les endocardites infectieuses à *E. faecalis* de haut niveau de résistance à la gentamicine dans des études non randomisées. Du fait de la non-infériorité de l'association ampicilline-gentamicine «court» versus ampicilline-gentamicine «standard», il serait intéressant de comparer dans des études cliniques la combinaison ampicilline-gentamicine «court» avec l'association ampicilline-céphalosporines de 3^{ème} génération 6 semaines, voire de diminuer la durée de bithérapie à 2 semaines dans les deux groupes. Concernant *E. faecium* résistant à la vancomycine, l'émergence de mutants résistants à la daptomycine du fait de CMI de base plus élevées nécessite de poursuivre l'évaluation des associations. L'apport de nouvelles molécules telles que l'oritavancine en association pour le traitement de ces infections reste à définir (M-P. Fernandez-Gerlinger et J-L. Mainardi 2014).

De plus, les probiotiques peuvent constituer une alternative thérapeutique. Les probiotiques contiennent des monocultures ou des cultures mixtes vivantes de microorganismes agissant de façon bénéfique sur l'organisme en améliorant les caractéristiques de la microflore qui y réside.

Les probiotique les plus utilisés sont les *Lactobacillus sp*, *Bifidobacterium sp* et *Saccharomyces boulardii*. Ils ont déjà montré leur intérêt dans la prévention et le traitement des diarrhées infectieuses (W. Isakow et al 2007).

Ils peuvent aider à réduire le déséquilibre bactérien intestinal induit par un traitement antibiotique. Et ils pourraient avoir un impact sur le portage de bactéries multi-résistantes. Les principaux risques d'utilisation rapportés jusqu'alors sont les risques d'infection généralisée chez les immunodéprimés, le risque d'acquisition de résistance par transfert plasmidique, et le risque de recolonisation à l'arrêt du traitement (M-H. Land et al 2005).

Un essai en double aveugle, randomisé, contrôlé par placebo, effectué au sein du service de soins rénaux d'Austin Health (Australie) de février à octobre 2005, a comparé deux yaourts dont l'un contient un probiotique, *Lactobacillus rhamnosus GG* (LGG), chez 27 patients ERV positifs, 14 recevant un traitement actif et 13 contrôles.

Les patients ont été assignés au hasard à un groupe de traitement (recevant chaque jour 100 g de yaourt contenant du LGG pendant 4 semaines) et un groupe témoin (recevant du yaourt standard pasteurisé). Des échantillons de matières fécales ont été obtenus trois fois à intervalles d'une semaine environ. Les patients traités ont été soumis à un nouveau test d'ERV à 8 semaines. Les patients du groupe témoin qui n'avaient pas réussi à éliminer l'ERV au bout de 4 semaines recevaient ensuite le yaourt LGG pendant 4 semaines, en continu.

Sur les 27 patients inscrits, 23 ont terminé l'étude. Deux patients ont été perdus au cours du suivi, un décédé et un s'est retiré. 11 patients du groupe de traitement qui ont complété l'étude ont éliminé l'ERV. Trois sujets sont retournés à la positivité ERV après avoir utilisé des antibiotiques pour lesquels LGG est sensible, tandis que tous les autres sont restés négatifs pendant au moins 4 semaines après l'achèvement de l'essai, alors que parmi les douze témoins qui ont terminé l'étude, un a éliminé l'ERV. Huit patients de groupe témoin qui ont reçu le LGG après la 4^{ème} semaine, se sont négativés.

Il s'agit de la première description d'un traitement probiotique qui a éliminé avec succès le portage digestif d'ERV chez les insuffisants rénaux **(K-J. Manley et al 2007)**.

CHAPITRE IV
PREVENTION

CHAPITRE IV : PREVENTION

Sont considérés comme BHRe, les Entérobactéries productrices de carbapénèmases (EPC) et les Entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG). Il a été démontré que l'application rigoureuse de mesures de prévention et de contrôle s'est avérée efficace pour prévenir la transmission et le contrôle des éclosions des BHRe (C. Doit 2015 ; L-S. Munoz-Price et al 2010).

IV.1. LES MESURES PREVENTIVES :

Les mesures préventives des BHRe sont celles des bactéries multirésistantes (BMR) avec des mesures spécifiques pour les BHRe, associant des mesures d'hygiène et d'organisation des soins. Les précautions à appliquer pour minimiser le risque de diffusion des BHRe doivent être adaptées à la situation épidémiologique (HCSP 2013 ; J-C. Lucet et G. Birgand 2016).

IV.1.1. Le dépistage :

La surveillance épidémiologique des BHRe requiert la réalisation des dépistages auprès des patients à risque d'être porteurs et dans certaines circonstances, des dépistages de suivi des cas connus, afin de prévenir leur transmission à d'autres patients (INSPQ 2010).

Le dépistage s'effectue par un écouvillonnage rectal chez les patients cas et les patients contacts, s'il y a présence d'une BHRe, des précautions spéciales doivent être mises en place afin de prévenir leur propagation (INSPQ 2016).

Patients « cas » : sont considérés comme patients « cas » tous les patients ayant au moins un prélèvement de diagnostic ou de dépistage positif à une BHRe (J. Robert 2007).

Patients « contact » : sont considérés comme patients « contact » tous les patients exposés à un cas, c'est-à-dire tous les patients pris en charge en hospitalisation par la même équipe soignante qu'un cas (HCSP 2013).

Selon les modalités de prise en charge du patient porteur de BHRe depuis son admission, différents niveaux de risque de devenir porteur de BHRe par un patient contact peuvent être établis:

- **risque faible**, le patient a été pris en charge avec des mesures d'hygiène spécifiques BHRe dès son admission. (Annexe I)
- **risque moyen**, le patient a été identifié cas porteur BHRe au cours de l'hospitalisation.
- **risque élevé**, au moins un patient porteur (cas secondaire) a été identifié parmi les patients contacts (situation épidémique) (D. Lepelletier et al 2015).

Les modalités de dépistage sont variables en fonction des patients (cas ou contact) et de la situation épidémique, le dépistage se fait comme suit :

- Chez un patient déjà connu porteur d'une BHRe : le dépistage est hebdomadaire, puis espacé.
- Découverte fortuite d'un patient porteur de BHRe en cours d'hospitalisation : dépistages hebdomadaires des contacts, répétés au moins trois fois.
- Lors d'un contrôle d'une épidémie de BHRe : dépistages hebdomadaires des cas et des contacts.
- Admission d'un patient contact d'un patient porteur en dehors d'une situation épidémique : 3 dépistages, à une semaine d'intervalle chez les contacts.

- Admission d'un patient contact d'un patient porteur lors d'une situation épidémique : dépistages hebdomadaires des contacts présents tant que le porteur est présent (**HCSP 2013**).

IV.1.2. Le regroupement et le cohorting des patients:

Une cohorte de cas est un regroupement dans un lieu géographique spécifique des patients présentant un statut identique au sujet du portage d'une BHRé. Par exemple, deux patients porteurs d'ERG qui séjournent dans une même chambre constituent une cohorte. La cohorte peut également être constituée de patients à risque d'être porteurs en attente de résultats de dépistage pour recherche d'une BHRé. Idéalement, une cohorte doit être prise en charge par du personnel dédié, et le matériel partagé qui y est utilisé est également dédié à cette cohorte, elle permet de limiter efficacement la propagation des BHRé dans le milieu hospitalier et de limiter également le nombre des patients « contacts » (**INSPQ 2012**).

IV.1.3. La décontamination: Décolonisation

La décontamination digestive consiste à administrer au niveau de l'oropharynx et du tube digestif des antibiotiques non absorbables destinés à s'opposer à la colonisation bactérienne impliquée dans la survenue d'infections à bactérie hautement résistante (**C. Camus 2005**), elle est indispensable pour contribuer à limiter la dissémination des BHRé à partir des réservoirs humains, sur le plan individuel elle contribue à la prévention des Infections Associées aux Soins (IAS). La littérature sur la décontamination est extrêmement vaste (**CCLIN 2011**).

La décolonisation des patients porteurs d'EPC a moins été évaluée. Une étude randomisée en double aveugle évaluant l'association gentamicine/polymyxine E concluait en une réduction significative du portage (16,1 % contre 61,1 % pour les témoins à 3 semaines et 33,3 % contre 58,5 % à 6 semaines) (**L. Saidel-Odes et al 2012**). Mais l'utilisation en prophylaxie de la polymyxine comporte le risque d'émergence de résistance à cette famille d'antibiotiques, dernières molécules utilisables en curatif en cas d'infection (**G. Birgand et J-C. Lucet 2013**).

Les études sur la décontamination des porteurs d'ERG sont rares et avec de faibles effectifs. Deux études avant/après utilisant la bacitracine seule ou en association avec la doxycycline sur des filières d'hémodialyse et d'oncologie concluent à une efficacité des traitements avec 15/15(100 %) patients décolonisés à la fin du traitement pour l'une et 5/28 (18 %) pour la seconde contre 1/28 pour les patients témoins (**R. Hachem et I. Raad 2002**). Une autre étude randomisée traitement contre placebo ne retrouvait aucune différence entre les 2 bras après 3 semaines. Ces rares études semblent prouver une inefficacité de la décontamination des patients porteurs d'ERG (**K-E. Mondy et al 2001 ; G. Birgand et J-C. Lucet 2013**).

En 2013, une autre étude importante est venue compléter les séries précédentes qui a testé dans un essai alterné sur 6 mois, l'effet préventif de toilettes quotidiennes à la chlorhexidine (2 %, sans rinçage) ou de toilettes standards au savon, sur la prévention de l'acquisition d'ERG. Le taux d'acquisition d'ERG a baissait significativement (de 4,28 à 3,21 ; $p = 0,05$) (**C. Brun-Buisson 2014**). Ainsi, dans un travail prospectif multicentrique randomisé en cluster évaluant l'intérêt de la toilette quotidienne à la chlorhexidine en réanimation et unité de transplantation, les auteurs mettaient en évidence, sur une cohorte de 7 727 patients inclus, une réduction globale significative de l'acquisition de bactéries multirésistantes et des

bactériémies acquises. Les résultats de ces travaux ont été secondairement confirmés dans d'autres populations (C. Legeay 2015).

IV.1.4. Le renforcement des mesures d'hygiène:

L'hygiène des mains est la mesure principale, qui assure la sécurité des autres patients et celle des soignants, elle lutte contre la transmission manuportée par l'utilisation des solutions hydro-alcooliques qui désinfectent et éliminent les micro-organismes (CCLIN Arlin 2016).

Port de gants à usage unique lors d'un soin, si risque de contact avec du sang ou tout autre liquide biologique, les muqueuses ou le matériel souillé, y compris le contact avec la peau saine du patient.

Les gants doivent être changés entre deux patients, deux activités suivie d'une friction avant de toucher à l'environnement du patient (C. Jehl et al 2011 ; CCLIN Ouest 2011).

Port de masque, lunettes et surblouse, si les soins ou les manipulations exposent à un risque de projection de liquides biologiques.

Le port du tablier évite la contamination de la tenue et celle des mains par contact ultérieur avec la tenue contaminée (C. Jehl et al 2011).

Nettoyage de l'environnement, l'environnement immédiat des patients colonisés ou infectés par les BHRe est fréquemment contaminé, dont tous les objets manipulés par le patient comme cloche d'appel, téléphone, télécommande de télévision, ainsi que les toilettes et les salles de bain, de même que les équipements de soins. Le fait que le personnel de soins ait à travailler à la fois dans l'environnement contaminé de porteurs de BHRe et auprès de patients non porteurs représente un risque de transmission. Les mesures d'hygiène et salubrité tant au niveau des chambres des porteurs que dans les autres secteurs de l'unité de soins revêtent donc une importance cruciale. Par ailleurs, la technique de nettoyage/désinfection doit être rigoureusement réalisée pour que toutes les surfaces soient décontaminées (INSPQ 2010 ; CCLIN Arlin 2016).

IV.1.5. La restriction de l'utilisation des antibiotiques:

Avec la transmission croisée, la pression de sélection exercée par les antibiotiques est l'autre facteur essentiel qui amplifie la résistance bactérienne. (C-J. Donskey et al 2000).

Le bon usage des antibiotiques est un autre point, souvent négligé dans la prise en charge de ces patients porteurs ou contacts de BHRe. Plusieurs publications montrent que l'antibiothérapie, notamment les antibiotiques ayant un impact sur la flore digestive, augmente les concentrations digestives d'ERG ou d'EPC. Par cet intermédiaire, le risque de contamination de l'environnement et probablement de dissémination de la BHRe est majoré. Ainsi toute antibiothérapie chez un patient porteur de BHRe doit être discutée avec un référent antibiotique (J-C. Lucet et G. Birgand 2016).

Plusieurs classes d'antibiotiques peuvent sélectionner les EPC, comme les fluroroquinolones, les céphalosporines de 3^{ème} génération et les carbapénèmes. Pour les ERG, les céphalosporines et les glycopeptides (R-M. Da Silva et al 2012 ; S-G. Colomban 2016).

Au niveau individuel, il est impératif de limiter les traitements antibiotiques au strict nécessaire chez les patients porteurs de BHRe. Si une antibiothérapie est nécessaire, il est recommandé de solliciter l'avis du référent antibiotique pour qu'il puisse évaluer la pertinence du traitement, guider le choix de la molécule et définir la durée optimale. La pression de sélection exercée par les antibiotiques doit également être prise en compte chez les patients

contacts et, là encore, l'indication doit être pesée avec le référent antibiotique. Chez ces patients à risque, parfois porteurs de BHRe en faible concentration, l'antibiotique pourra jouer le rôle de révélateur et le dépistage digestif devra donc être renouvelé. Enfin, d'un point de vue collectif, il est indispensable de réduire les volumes globaux d'antibiotiques consommés (ENP 2012 ; S. Fournier 2014).

IV.1.6. La surveillance épidémiologique :

La surveillance épidémiologique, permet le suivi de la situation épidémiologique locale et régionale, et l'adaptation des mesures de prévention en fonction de l'évolution de l'épidémiologie (HPCI 2014 ; M. Abbas et al 2012).

Les milieux de soins doivent mettre en place une surveillance prospective des cas afin de connaître l'incidence locale des porteurs, de repérer les cas et les éclosions, et de s'assurer de l'efficacité des mesures de prévention et de contrôle.

Une évaluation rétrospective (six à douze mois) des résultats de laboratoires pour repérer des cas qui auraient été peut être hospitalisés sans mesures de prévention (S. Demir et al 2008).

La mise en place de cette surveillance nécessite une solidarité des différents laboratoires et des prestataires de soins. Un programme de sensibilisation auprès des responsables de laboratoires devrait être entrepris (HPCI 2014 ; M. Abbas et al 2012).

IV.2. CONDUITE A TENIR DEVANT UN PATIENT «CAS» :

Une fois le patient identifié porteur, des mesures de prévention de la transmission croisée doivent être mises en place:

- Isoler le patient porteur de BHRe en chambre individuelle dès son admission.
- Organiser les soins, au mieux personnel dédié.
- Dépister les contacts aussi longtemps qu'ils restent hospitalisés.
- Renforcer l'hygiène des mains.
- Un usage raisonné des antibiotiques en particuliers les carbapénèmes, les glycopeptides et les céphalosporines.
- Renforcer le bionettoyage de l'environnement et gérer les excréta.
- Former le personnel à l'application de ces mesures.
- Rechercher un portage de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) chez les porteurs d'ERV. Si cette recherche est positive, utiliser un protocole de décontamination nasale et cutanée du malade.
- Envoyer les souches aux laboratoires de référence de la résistance aux antibiotiques (HCSP 2013 ; D. Lepelletier et al 2015; S. Fournier 2014).

IV.3. CONDUITE A TENIR DEVANT UNE EPIDEMIE:

En cas d'épidémie (c'est-à-dire, en cas d'identification d'au moins un cas secondaire), les points essentiels pour la surveillance sont :

- La rapidité de mise en place des mesures préventive, dès le premier jour.
- L'arrêt des transferts des cas et des contacts pour ne pas créer des foyers secondaires.
- Le dépistage des contacts présents et déjà transférés.
- La prise en charge des porteurs, des contacts et des indemnes par des personnels dédiés dans 3 secteurs distincts : secteur des cas, secteur des contacts, secteur des indemnes.

- L'arrêt des admissions dans les secteurs des cas et des contacts.
- L'identification rapide des patients porteurs et des contacts en cas de réadmission (S. Fournier 2014, CCLIN 2011).

IV.4. ENJEUX DE LA MAITRISE DE LA DESSIMINATION:

Il est important de mettre en œuvre les moyens de lutte pour maîtriser l'émergence et la diffusion des BHR.

Les bactéries hautement résistantes aux antibiotiques ne sont ni plus virulentes (elles ne donnent pas de tableau clinique plus grave) ni plus pathogènes (elles ne donnent pas plus d'infection) que leurs homologues sensibles. Dans la plupart des cas, la résistance aux antibiotiques n'émerge pas directement chez les bactéries pathogènes, mais dans un avenir proche, les mécanismes de résistance diffusent largement parmi les bactéries responsables d'infection du fait de la mobilité des gènes plasmidiques de la résistance, c'est le cas de la transmission de la résistance des ERG vers les SARM, l'utilisation abusive de la vancomycine est le facteur principalement responsable de l'émergence de cette résistance (INSPQ 2010 ; C. Sylvie 2009).

En effet, ces deux germes colonisent des sites écologiques différents, *Staphylococcus aureus* est retrouvé dans les fosses nasales, alors que les Entérocoques font partie de la flore intestinale, par contre certaines situations peuvent favoriser le transfert, comme la présence de plaies cutanées colonisées par du *Staphylococcus aureus*. L'étude de Rossi et al montre l'importance de la double contamination à la fois par le SARM et l'ERG dans l'apparition de *Staphylococcus aureus* résistant à la vancomycine, c'est pourquoi le dépistage de SARM doit être systématique chez tous les patients ERG positifs (F. Rossi et al 2014). Les souches de *Staphylococcus aureus* ayant acquis le gène de la résistance aux glycopeptides sont appelées VRSA (Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus*) (A. Friaes et al 2015).

La conséquence est qu'en cas d'infection, cette dernière est plus difficile à traiter car l'arsenal thérapeutique disponible est restreint et le risque d'impasse thérapeutique est majeur (ECDC 2009).

PARTIE
PRATIQUE

CHAPITRE V
MATERIELS ET METHODES

CHAPITRE V : MATERIELS ET METHODES

V.1. PROTOCOLE ET DUREE DU TRAVAIL :

Ce travail a été réalisé au niveau de l'unité de microbiologie du laboratoire central du CHU de Blida, hôpital Frantz Fanon et s'est réparti en deux volets :

- ✓ Une étude rétrospective étalée sur une période de six ans, allant de janvier 2011 à décembre 2016.
- ✓ Une étude prospective ayant duré 04 mois, de janvier 2017 à avril 2017.

Au cours de cette étude, nous avons recherché :

- La production des carbapénèmases chez les souches d'Entérobactéries isolées des différents types de prélèvements ;
- La résistance aux glycopeptides chez les souches d'Entérocoques isolés des différents types de prélèvements ;
- Le portage digestif des BHRé ;
- Le portage nasal de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline SARM chez les patients porteurs de l'ERG ;
- Les BHRé au niveau de l'environnement des chambres des patients cas.

V.2. MATERIELS :

V.2.1. Appareillage :(Annexe II)

Balance, bec bunsen, bain-marie, densitomètre, étuve, microscope optique, réfrigérateur, séchoir, ordinateur.

V.2.2. Matériel non biologique : (Annexe III)

Verrerie, milieux de culture, boîtes de pétri, lames, lamelles, pipettes pasteurs stériles, écouvillons stériles, pied à coulisse, micropipettes, seringues, eau physiologique stérile, eau distillée stérile, eau oxygénée, poire, pince, portoirs, disques d'antibiotiques, disques vierges, solution d'EDTA, galeries d'identification (classiques et API) et les réactifs.

V.2.3. Matériel biologique :

Représenté par :

- Les souches d'Entérobactéries isolées des différents types de prélèvements ;
- Les souches d'Entérocoque isolées des différents types de prélèvements ;
- Les souches de référence (ATCC) : ces souches sont utilisées pour valider les différents tests effectués, les souches de référence utilisées dans notre travail sont citées dans le tableau suivant :

Tableau VII : Souches de référence ATCC utilisées (Original)

Souches	Référence
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Staphylococcus aureus</i> SARM - (sensible à l'oxacilline)	ATCC 25923

V.3. METHODES :**V.3.1. Prélèvement à visée diagnostique :****V.3.1.1. Recherche des Entérobactéries productrices de carbapénèmes :**

L'étude bactériologique des EPC s'est effectuée en deux étapes :

- L'isolement et l'identification des Entérobactéries.
- La recherche de la production des carbapénèmes.

V.3.1.1.1. Isolement et identification des Entérobactéries :

L'isolement et l'identification des Entérobactéries ont été réalisés par les techniques conventionnelles. Les étapes suivies sont résumées dans l'organigramme ci-dessous :

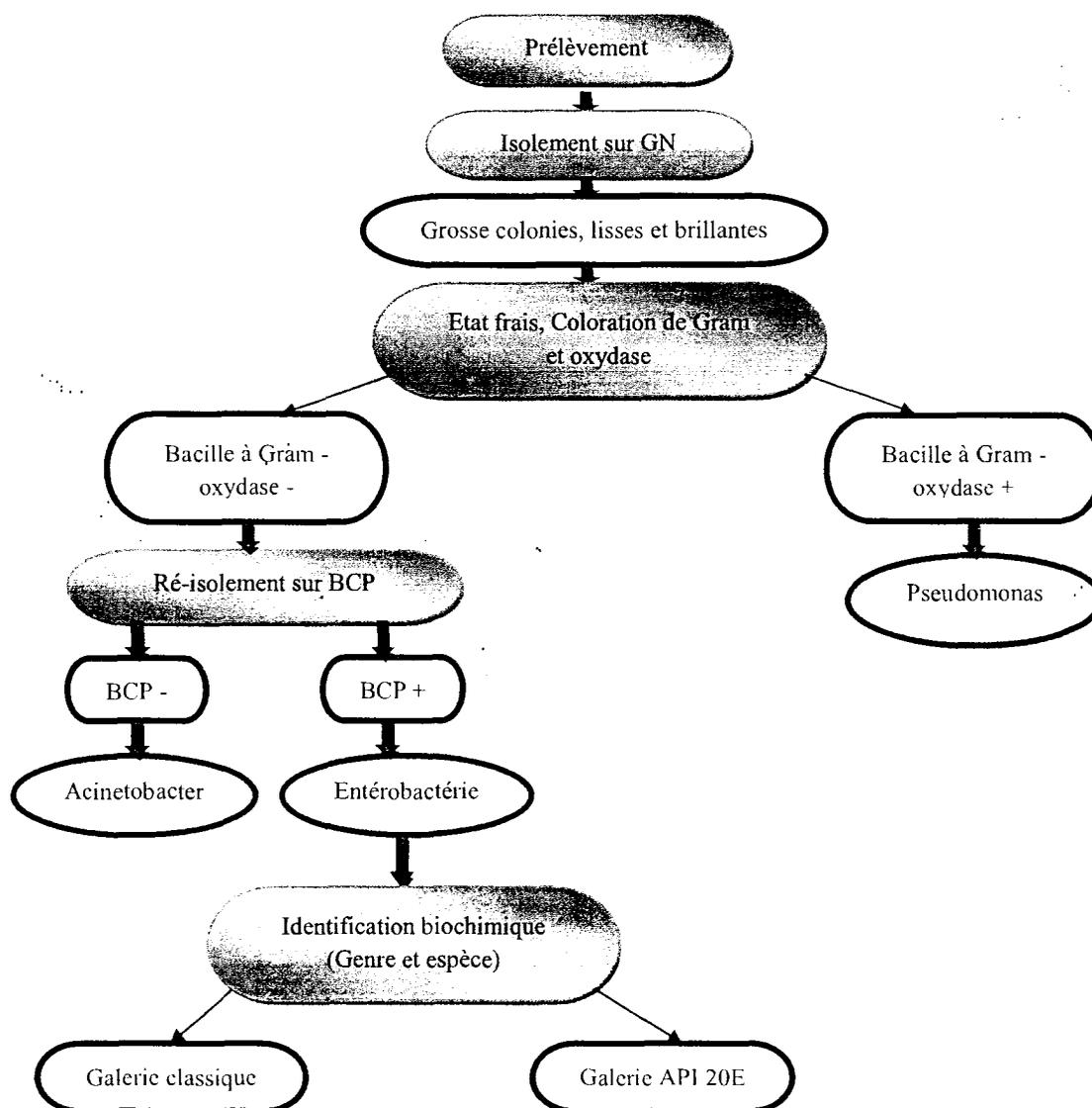


Figure 13 : Les étapes de l'étude bactériologique des Entérobactéries (Originale)

a) **Examen microscopique :**(Annexe IV)

• **Examen microscopique à l'état frais :**

L'examen à l'état frais permet d'observer les bactéries vivantes, afin de mettre en évidence leurs mobilités, leurs modes de groupement et faire une approche de leurs morphologies. Les Entérobactéries se présentent sous forme de bacilles mobiles ou immobiles.

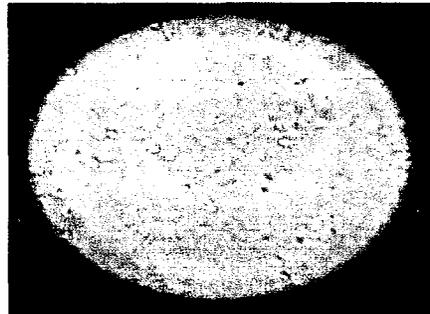


Figure 14: Examen microscopique à l'état frais (Originale)

• **Examen microscopique après coloration de Gram :** (Annexe IV)

Il s'agit d'une coloration double, qui permet de différencier entre les bactéries en fonction de leurs formes (cocci ou bacille) et en fonction de leurs affinités pour les colorants (Gram positif ou Gram négatif).

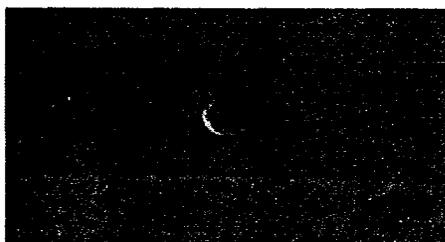
Les Entérobactéries apparaissent sous forme de bacilles à Gram négatif.



Figure 15: Aspect des Entérobactéries après coloration de Gram (Originale)

b) **Recherche de l'oxydase :** (Annexe IV)

Les Entérobactéries sont oxydase (-)



Oxydase -



Oxydase +

Figure 16: Lecture de l'oxydase (Originale)

c) Isolement :

Les Entérobactéries poussent facilement sur les milieux ordinaires(GN) et sur les milieux sélectifs (BCP) en 24 heures à 37°C, en aérobiose et en anaérobiose.

Sur GN :

Les colonies des Entérobactéries sont habituellement lisses, brillantes, de 2-4mm de diamètre.

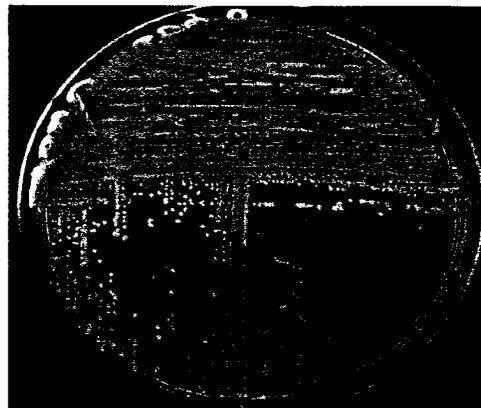
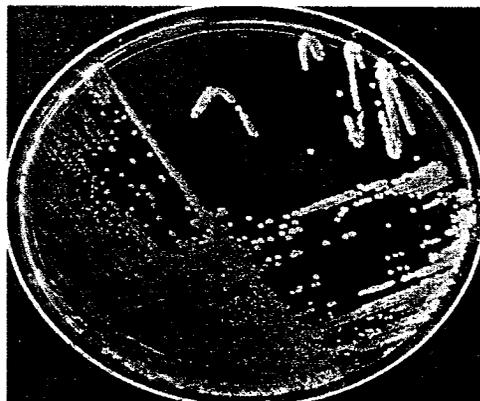


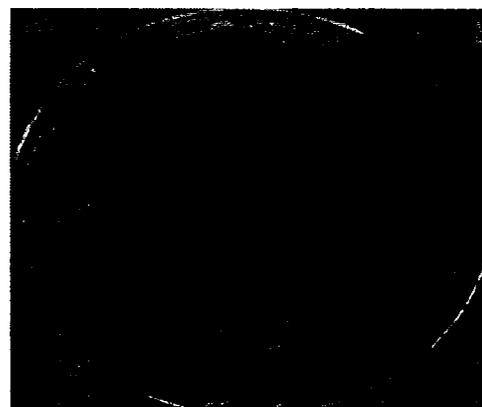
Figure 17: Aspect des colonies des Entérobactéries sur GN (Originale)

Sur BCP :

Les colonies des Entérobactéries peuvent être lactose+ (virage du milieu au jaune) ou lactose- (pas de virage).



Lactose -



Lactose +

Figure 18 : Aspect des colonies des Entérobactéries sur BCP (Originale)

d) Tests d'identification :

L'identification du genre et de l'espèce repose sur l'étude des caractères biochimiques en utilisant des galeries:

***Galerie classique :**

Les milieux utilisés dans la galerie d'identification des Entérobactéries sont : Clark et lubs, eau peptonée exempte d'indole, citrate de Simmons, milieu d'étude de la voie d'attaque des glucides (MEVAG), Triple Sugar Iron (TSI), les acides aminés (Annexe V).



Figure 19 : Galerie classique des Entérobactéries après incubation (Originale)

***Galerie API 20E :**

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



Figure 20: Galerie API 20 E après incubation (Originale)



Figure 21: Fiche de résultats de la galerie API 20 E (Originale)

V.3.1.1.2. Recherche de la production des carbapénèmes chez les Entérobactéries :

L'organigramme suivant résume la démarche adoptée :

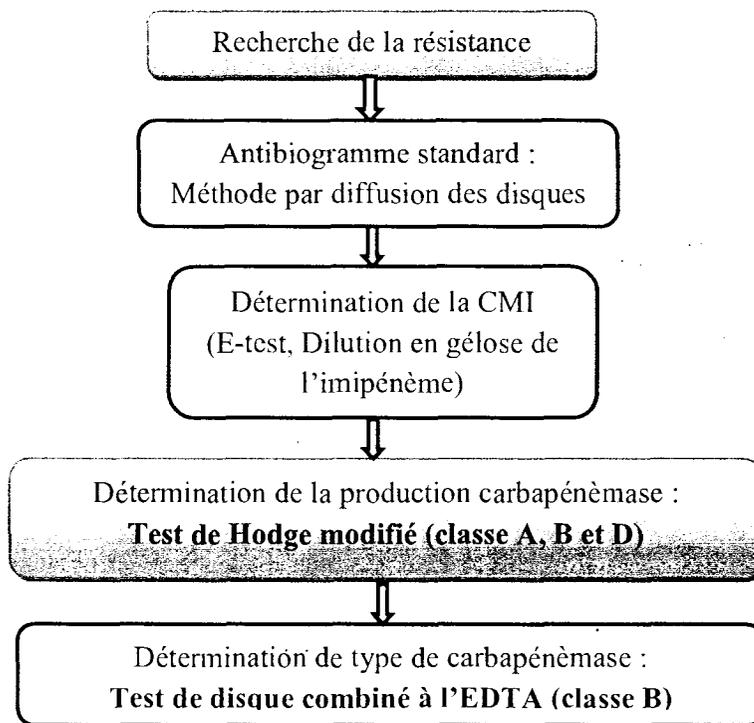


Figure 22: Recherche de la production des carbapénèmes chez les Entérobactéries (Originale)

a) Antibiogramme standard : Méthode par diffusion des disques :

La recherche des souches d'Entérobactéries résistantes aux carbapénèmes a été déterminée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition de disque d'imipénème chargé de 10 μ g (IMP) au niveau de l'antibiogramme standard des Entérobactéries.

L'antibiogramme a été effectué par la méthode de diffusion des disques préconisé par CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) 2014 et recommandé par l'OMS (Annexe VI).

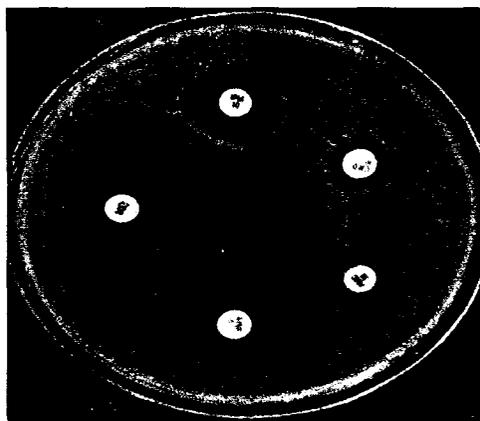


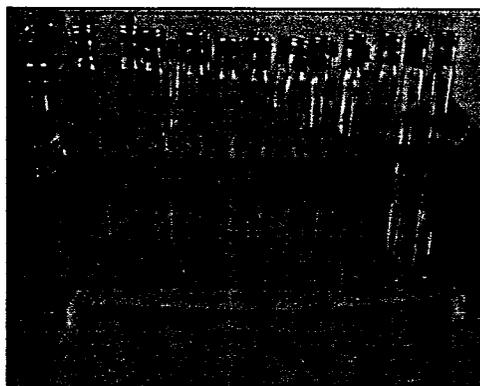
Figure 23: Antibiogramme standard des Entérobactéries (IMP) (Originale)

La confirmation de la résistance aux carbapénèmes a été effectuée par la détermination de la CMI à l'imipénème par technique de dilution en milieu gélosé et/ou l'E-test.

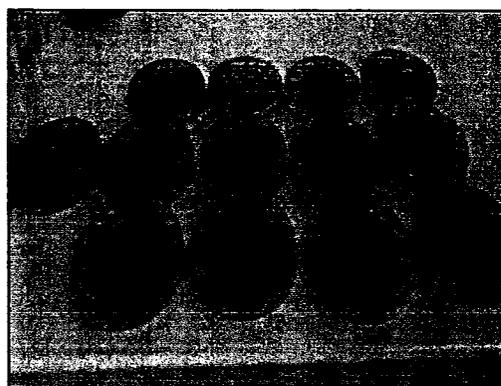
b) Détermination de la CMI :

- Technique de dilution en gélose de l'imipénème:

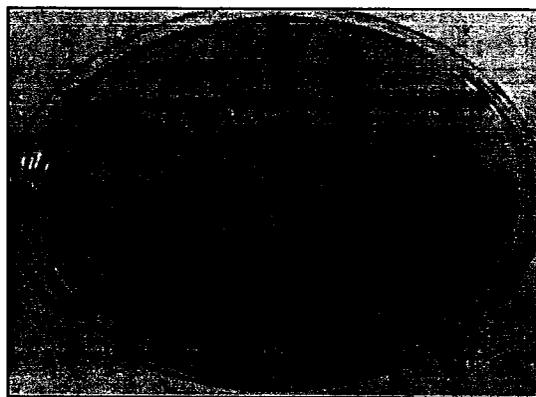
La méthode de dilution est effectuée en milieu solide gélosé. Elle consiste à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques selon une progression géométrique de raison 2 (Annexe VI).



**Figure 24 : Préparation des dilutions
(Originale)**



**Figure 25 : Préparation des milieux
(Originale)**



**Figure 26 : Lecture des CMI technique de dilution en gélose
(Originale)**

-Technique de l'E-test :

Cette technique, utilisant des bandelettes imprégnées d'un gradient de concentration d'antibiotique, permet d'obtenir simplement et rapidement une détermination de la CMI, dans les mêmes conditions que l'antibiogramme standards. (Annexe VI)

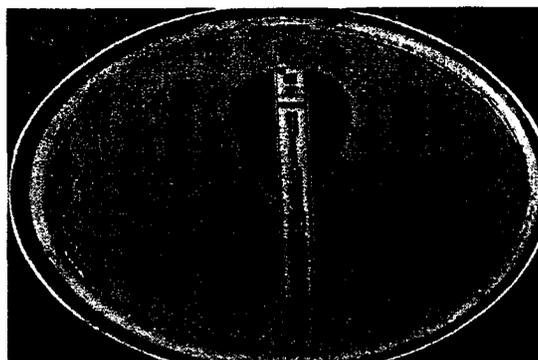


Figure 27: CMI bandelette de l'IMP (Originale)

Une Entérobactérie est susceptible d'être productrice de carbapénémases s'elle présente l'un des signes d'appel :

- Un diamètre d'inhibition pour méropénème et imipénème < 22 mm et le diamètre d'inhibition pour ertapénème < 21 mm.
- La présence de colonies discrètes dans la zone d'inhibition des carbapénèmes (surtout ertapénème).
- Une CMI (E-test) pour les carbapénèmes ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ et CMI (E-test) pour ertapénème > 0.5 $\mu\text{g/ml}$.
- Une résistance aux C3G (céftazidime, céfotaxime, ceftriaxoné).

c) Détection de la production de carbapénémase :

La détection de la production du carbapénémase a été effectuée par le test de Hodge modifié qui est la méthode phénotypique actuellement recommandée par le CLSI (Voir chapitre II).

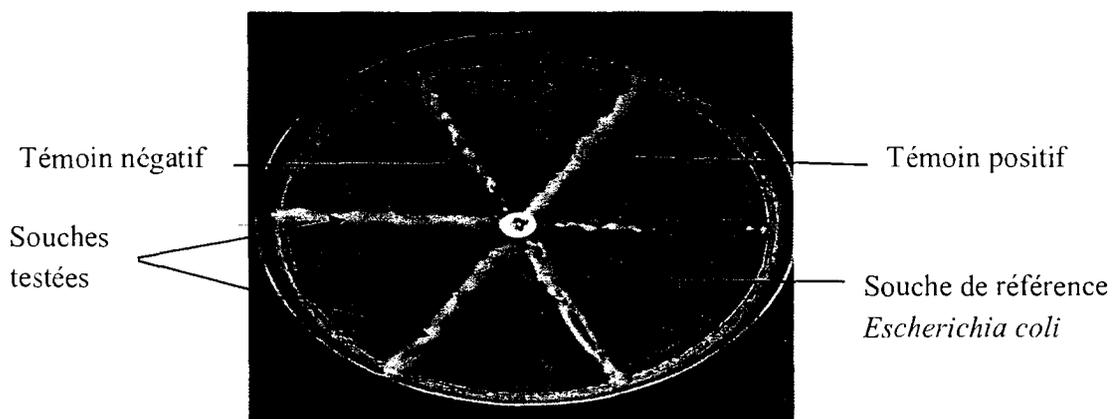


Figure 28: Test de Hodge modifié (Originale)

*Détermination du type de carbapénémase :

La détermination du type de carbapénémase a été effectuée par le test de disque combiné à l'EDTA. Cette technique, utilisant deux disques de 10 μg d'imipénème dont l'un contient en plus 10 μg d'une solution d'EDTA dans les mêmes conditions que l'antibiogramme standards (Voir chapitre II).

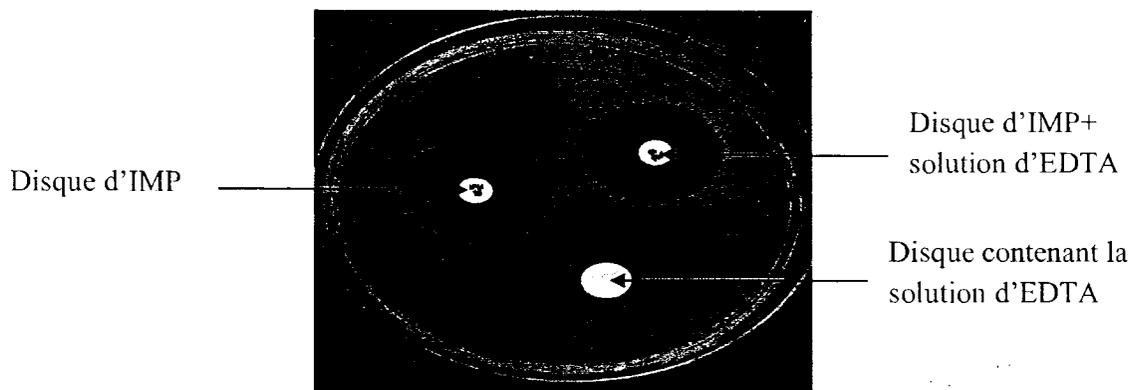


Figure 29 : Test de disque combiné à l'EDTA (Originale)

V.3.1.1.3. Recherche des résistances associées :

*Recherche de la production de la BLSE

La recherche de la production de la BLSE se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme selon les recommandations de la CLSI en déposant un disque d'amoxicilline + Ac. clavulanique (AMC 20/10 μ g) à 30 mm centre à centre d'un disque de C3G (CTX 30 μ g ou CRO 30 μ g) (Annexe VI).

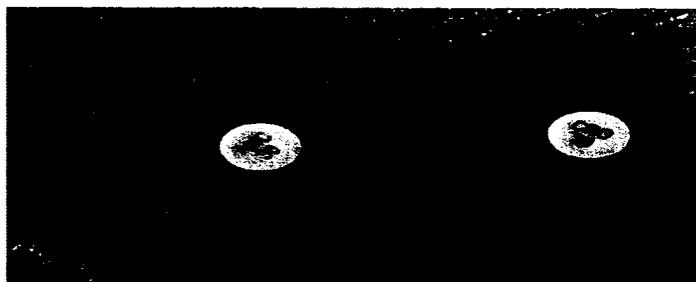


Figure 30 : Entérobactérie productrice de BLSE (Originale)

V.3.1.2. Recherche des Entérocoques résistants aux glycopeptides :

L'étude bactériologique des ERG s'est effectuée en deux étapes :

- L'isolement et l'identification des Entérocoques,
- La recherche de la résistance des Entérocoques aux glycopeptides.

V.3.1.2.1. Isolement et identification des Entérocoques :

L'isolement et l'identification des Entérocoques ont été réalisés par les techniques conventionnelles. Les étapes suivies sont résumées dans l'organigramme ci-dessous :

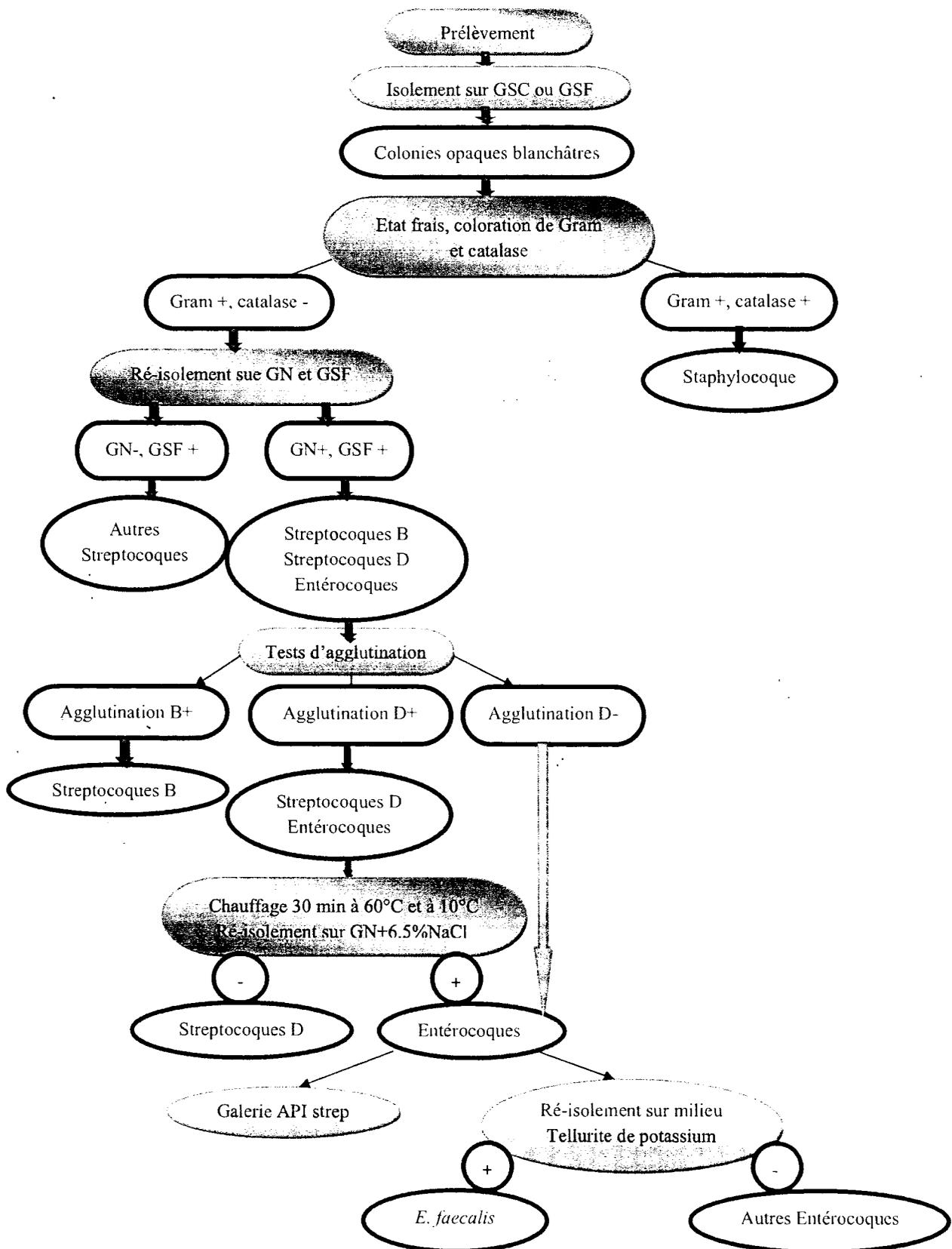


Figure 31 : Les étapes de l'étude bactériologique des Entérocoques (Originale)

a) Examen microscopique :**• Examen microscopique à l'état frais :**

Les Entérocoques apparaissent sous forme de cocci immobiles (à l'exception de *E. casseliflavus* et *E. gallinarum*).

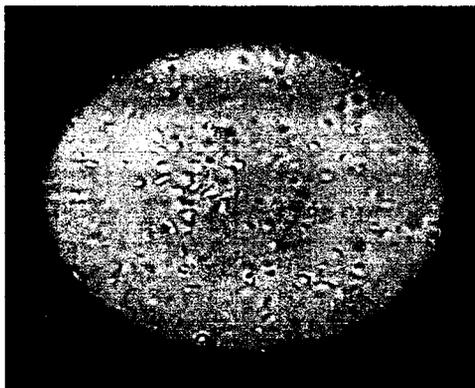


Figure 32 : Examen microscopique à l'état frais (Originale)

• Examen microscopique après coloration de Gram

Les Entérocoques apparaissent sous forme de cocci à Gram +, en paire ou en chainettes.

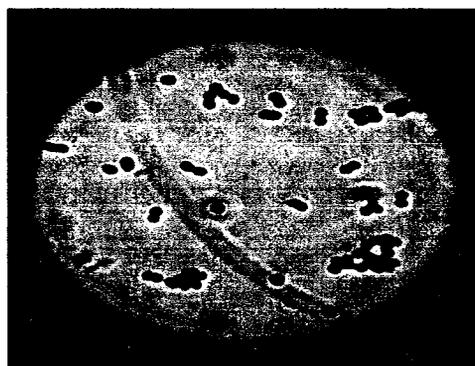


Figure 33: Aspect des Entérocoques après coloration de Gram (Originale)

b) Recherche de la catalase : (Annexes IV)

La recherche de la catalase est un test fondamental pour l'identification des bactéries à Gram positif, c'est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'oxygène (H_2O_2), produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries, en H_2O et $1/2 O_2$, selon la réaction suivante :



Les Entérocoques sont catalase négative.



Figure 34: Aspect de la catalase négative des Entérocoques (Originale)

c) Isolement :

La culture des Entérocoques est plus aisée que celle des Streptocoques. Leur isolement se fait sur divers milieux de culture :

- Milieu de base pour les bactéries non exigeantes : gélose nutritive (GN),
- Milieu à base de sang : gélose au sang frais (GSF), gélose au sang cuit (GSC).

Sur GN :

Les colonies des Entérocoques sont légèrement opalescentes, de 0.5 à 1 mm de diamètre.



Figure 35: Aspect des colonies des Entérocoques sur GN (Originale)

Sur GSF ou GSC :

Les colonies des Entérocoques peuvent être α -hémolytiques, β -hémolytique ou non hémolytiques, elles sont de 2-4 mm de diamètre, opaques ou blanchâtres.

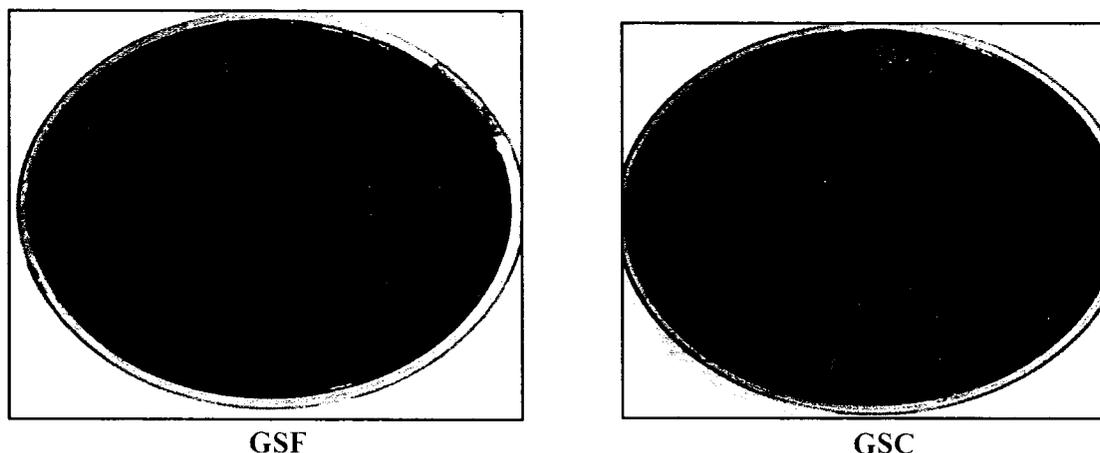


Figure 36: Aspect des colonies des Entérocoques sur gélose à base de sang (Originale)

d) Tests d'identification :

- **Identification du genre :**

-Test d'agglutination :

Il repose sur l'agglutination de particules de latex recouvertes d'anticorps spécifiques de chacun des groupes de la classification de Lancefield des Streptocoques (A, B, C, D, E, F, G,...) en présence de la souche possédant le polyside C correspondant (qui a été extrait enzymatiquement).

- Ré-isolement sur gélose nutritive (ou GSC) additionnée de 6.5% de NaCl :(Annexe IV)

Les Entérocoques poussent dans des conditions hostiles de 6.5% de NaCl à l'inverse des Streptocoques D.

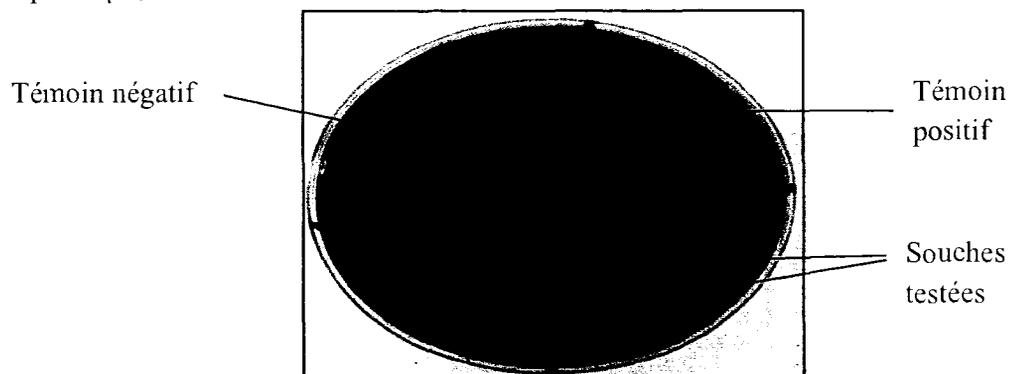


Figure 37: Aspect des Entérocoques sur GSC additionné de 6.5% de NaCl (Originale)

- Chauffage 30 min à 60°C et à 10°C : (Annexe IV)

Les Entérocoques peuvent survivre à un chauffage de 60°C pendant 30 min, de même à 10°C.



Figure 38: Aspect de la suspension bactérienne chauffée avant et après incubation (Originale)

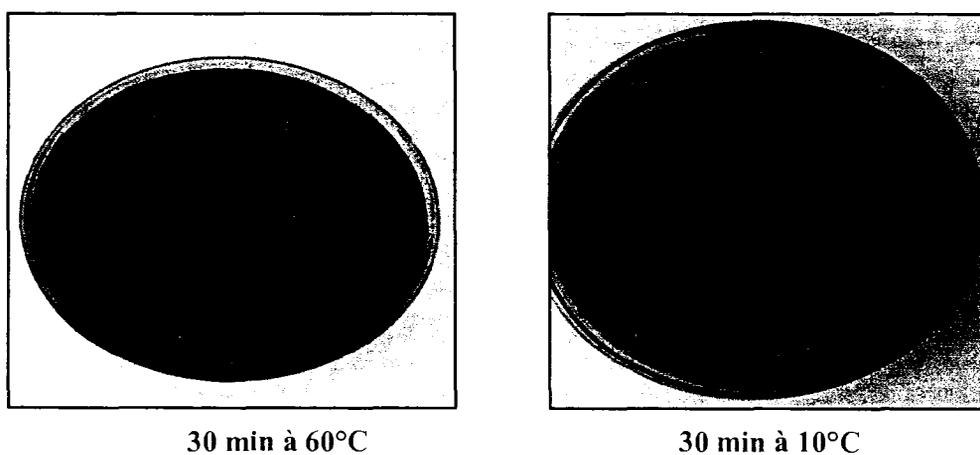


Figure 39: Aspect des colonies des Entérocoques sur GSC après chauffage (Originale)

- **Identification de l'espèce :**

L'identification de l'espèce a été faite à l'aide des tests suivants :

- **Ré-isolément sur milieu tellurite de potassium :** (Annexe IV)

Ce test permet la différenciation entre *E. faecalis* (résistant au tellurite) des autres Entérocoques.

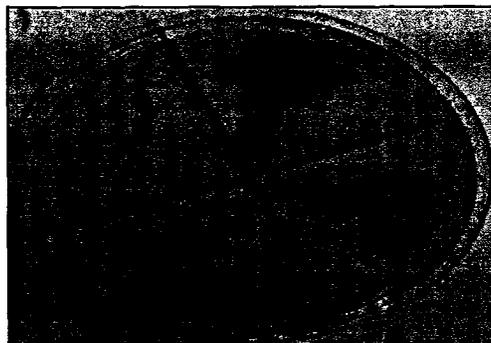


Figure 40 : Aspect des colonies des Entérocoques sur milieu tellurite de potassium (Originale)

- **Ré-isolément sur milieu MH additionné d'imipénème :** (Annexe IV)

Ce test permet la différenciation entre *E. faecium* (résistant à l'imipénème) des autres Entérocoques ainsi l'inhibition des Entérobactéries (Entérobactéries sensibles à l'imipénème).

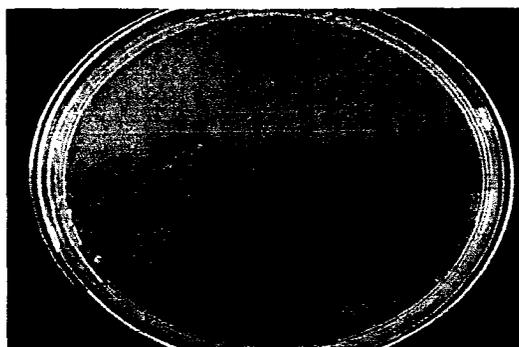


Figure 41: Aspect des colonies des Entérocoques sur milieu MH additionné d'imipénème (Originale)

- **Identification biochimique : Galerie API**

L'identification de l'espèce repose sur l'étude des caractères biochimiques, par l'utilisation des tests qui étudient le métabolisme protéique (la production de leucine aminopeptide LAP, la pyrrolidonyl-arylamidase Pyr A, hydrolyse de l'arginine...), la fermentation des sucres, ainsi que l'hydrolyse de l'esculine.

Ces caractères sont mis en évidence par des galeries API 20 Strep (Annexe V).



Figure 42: Galerie API 20 Strep après incubation (Originale)

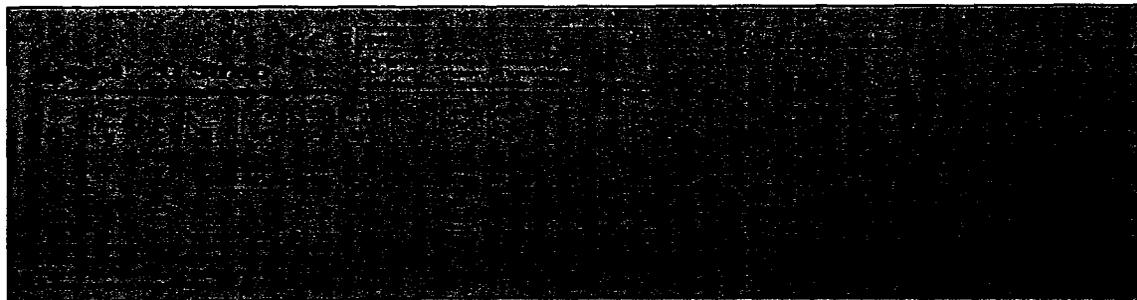


Figure 43: Fiche de résultats de la Galerie API 20 Strep (Originale)

V.3.1.2.2. Recherche de la résistance des Entérocoques aux glycopeptides :

L'organigramme suivant résume la démarche adoptée :

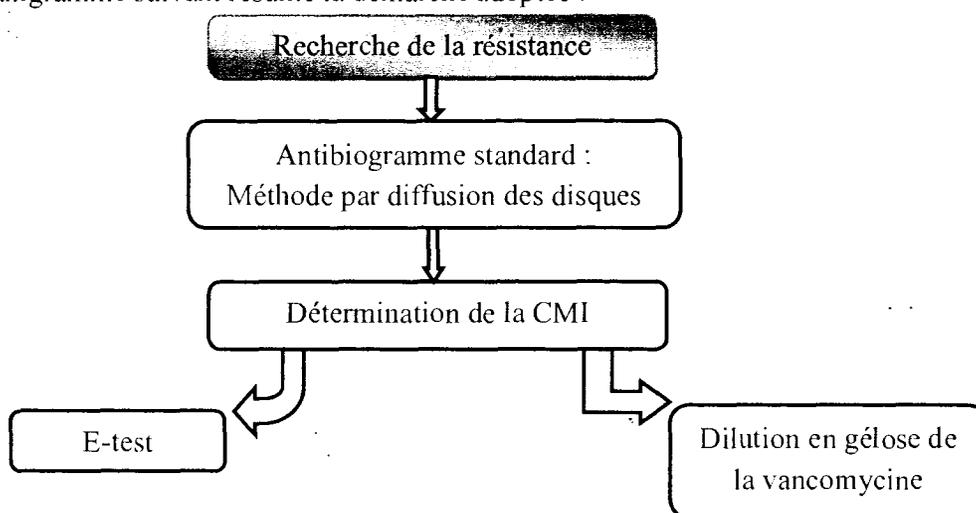


Figure 44: Recherche de la résistance des Entérocoques aux glycopeptides (Originale)

a) Antibiogramme standard : Méthode par diffusion des disques :

La recherche des souches d'Entérocoques résistants aux glycopeptides a été déterminée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition de disque de vancomycine chargé de 30 μ g (VAN) et un disque de ticoplanine chargé de 30 μ g (TEC) simultanément au niveau de l'antibiogramme standard des Entérocoques.

L'antibiogramme a été effectué par la méthode de diffusion des disques préconisé par CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) 2014 et recommandé par l'OMS (Annexe VI).

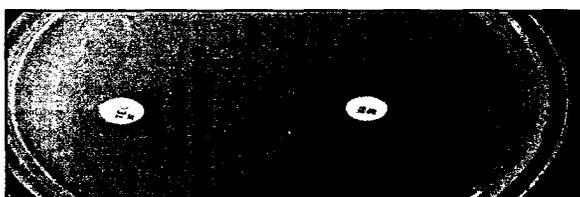


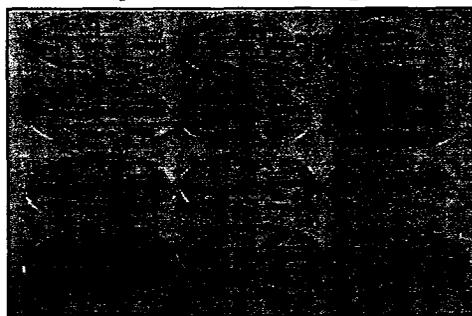
Figure 45: Antibiogramme standard des Entérocoques (VAN et TEC) (Originale)

Un Entérocoque est susceptible d'être résistant aux glycopeptides s'il présente l'un des signes d'alerte (Voir Chapitre III).

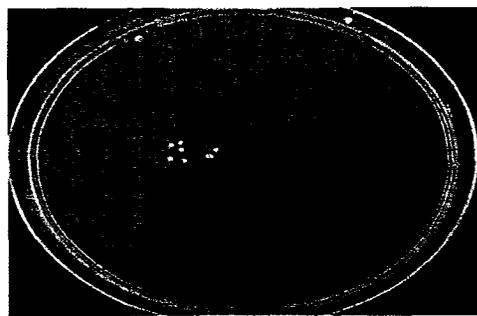
La confirmation de la résistance aux glycopeptides a été effectuée par la détermination de la CMI aux glycopeptides par technique de dilution en milieu gélosé et/ou l'E-test.

b) Détermination de la CMI :

- Technique de dilution en gélose de la vancomycine :



Préparation des milieux



Lecture des CMI

Figure 46: CMI vancomycine technique de dilution en gélose (Originale)

-Technique de l'E-test :

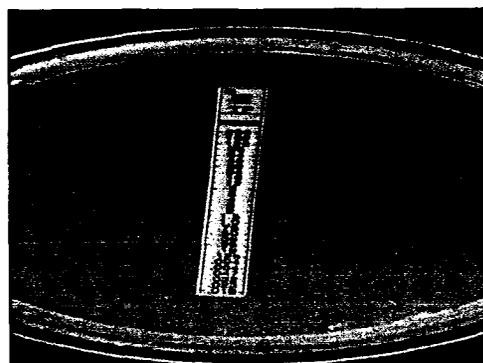
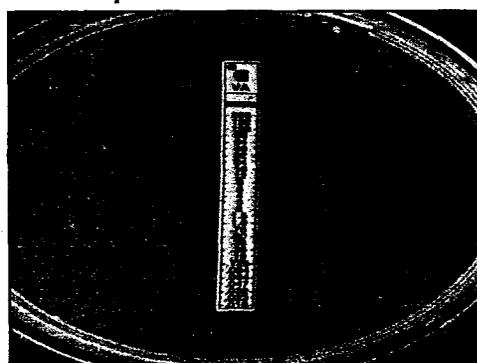


Figure 47 : CMI bandelette de VAN et TEC (Originale)

V.3.1.2.3. Recherche des résistances associées :

La recherche de la résistance associée aux autres antibiotiques se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme selon les recommandations de la CLSI en testant les antibiotiques suivants : ampicilline (AMP10 μ g), gentamycine haut niveau (GHN120 μ g), streptomycine haut niveau (SHN300 μ g), erythromycine (ERY15 μ g), tétracycline (TE30 μ g), ciprofloxacine (CIP5 μ g), lévofloxacine (LEV5 μ g), rifampicine (RIF5 μ g), fosfomycine (FOS200 μ g), quinapristine-dalfopristine (QDF15 μ g) et le chloramphénicol (CHL30 μ g).

V.3.1.2.4. Etude moléculaire :

Les souches d'ERG identifiées ont été adressées à l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA) pour confirmation de l'identification et caractérisation du gène de résistance aux glycopeptides.

V.3.2. Prélèvement à visée de dépistage:

V.3.2.1. Recherche du portage digestif de BHRé :

Des prélèvements de dépistage à la recherche du portage digestif de BHRé ont été réalisés chez les patients par écouvillonnage rectal.

Ces prélèvements ont été faits suite à la mise en évidence de la BHRé dans un prélèvement à visée diagnostique ou à l'admission des patients pour certains services (service onco-hématologie du Centre Anti-Cancer).

Mode opératoire :

Milieus utilisés :

*EPC :

-BCP

-Milieu MH additionné d'imipénème (MHI) à une concentration de 4 μ g/l (ce milieu permet l'isolement des Entérobactéries résistantes aux carbapénèmes des autres Entérobactéries sensibles) (Annexe IV)

*ERG :

-Milieu MH additionné d'imipénème (MHI) à une concentration de 4 μ g/l.

-Milieu MH additionné de vancomycine (MHV) à une concentration de 8 μ g/l: (ce milieu permet l'isolement des Entérocoques résistant aux glycopeptides des autres Entérocoques sensibles) (Annexe IV)

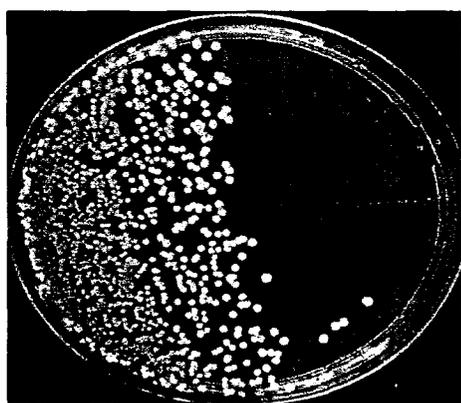
Ensemencement :

- Après humidification des écouvillons par du BHIB (Brain Heart Infusion Broth), ensemercer par la technique de trois cadrans à l'aide de l'écouvillon de prélèvement sur les différents milieux.

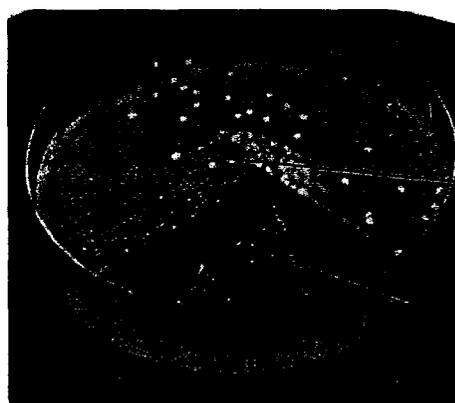
- Incuber à 35-37°C pendant 18-24h.

Lecture et interprétation :

- Les colonies suspectes ont été identifiées selon les techniques conventionnelles disponibles (étude bactériologique).



MHV



MHI

Autres
bactéries

Entérocoque

Figure 48: Aspect des colonies des Entérocoques sur les milieux MH additionné d'antibiotique (Originale)

La recherche de la résistance aux antibiotiques a été effectuée de la même manière que pour les souches isolées à partir des prélèvements à visée diagnostique.

V.3.2.2. Recherche du portage nasal du SARM chez les patients porteurs de l'ERG :

Des écouvillonnages nasals ont été réalisés chez les patients cas (ERG +) à la recherche du portage nasal de SARM.

Mode opératoire :

- Après humidification des écouvillons par du BHIB, ensemercer par la technique de trois cadrans à l'aide de l'écouvillon de prélèvement sur gélose nutritive.
- Incuber à 35-37°C pendant 18-24h.
- Les colonies suspectes ont été identifiées selon les techniques conventionnelles (Gram, catalase, recherche de la coagulase).
- Si présence du *Staphylococcus aureus* : rechercher de la résistance à la méticilline.

V.3.3. Etude du prélèvement de l'environnement :

Des prélèvements d'environnement ont été effectués au niveau des chambres des patients cas (enquête) (Annexe VII)

Mode opératoire :

Prélèvement:

- Humidification des écouvillons par le BHIB, écouvillonnage des surfaces de la chambre.
- Décharger les écouvillons dans 5-10ml de BHIB.
- Incuber à 35-37°C pendant 18-24h.



Figure 49 : Les différents prélèvements réalisés au niveau de la chambre (Originale)

Ensemencement :

L'ensemencement a été effectué par la technique de trois cadrans sur :

- BCP.
 - Milieu MH additionné d'imipénème (MHI).
 - Milieu MH additionné de vancomycine (MHV).
- } Chambre EPC+ ERG

- Milieu MH additionné d'imipénème (MHI).
 - Milieu MH additionné de vancomycine (MHV).
- } Chambre ERG

Incuber à 35-37°C pendant 18-24h.

Lecture et interprétation :

-Les colonies suspectes ont été identifiées selon les techniques conventionnelles disponibles (étude bactériologique).

- La recherche de type de résistance aux antibiotique, a été effectuée de la même manière que pour les souches isolées à partir des prélèvements a visés diagnostiques.

NB ! Une contre-enquête a été effectuée après désinfection des chambres des patient cas.

V.3.4. Conservation des souches :

Les souches des BHRé isolées sont conservées dans des tubes contenant 0.5 ml de milieu de conservation ou dans la gélose nutritive inclinée, pour des études ultérieures.

CHAPITRE VI
RESULTATS

CHAPITRE VI : RESULTATS

Les résultats obtenus durant notre étude se répartissent en trois volets :

- Résultats de l'étude des prélèvements à visée diagnostique.
- Résultats de l'étude des prélèvements à visée de dépistage.
- Résultats de l'enquête de l'environnement.

Pour l'étude rétrospective, les résultats étaient exploités à partir des registres et grâce au logiciel WHONET5.6, qui est un logiciel utilisé pour la surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques.

VI.1. TAUX DE BHRé ISOLEES AU CHU BLIDA :

Durant la période de l'étude, 65 BHRé ont été isolées, dont 32 Entérobactéries productrices de carbapénèmases (29 souches isolées à partir des prélèvements à visée diagnostique, 2 souches isolées à partir des prélèvements à visée de dépistage et une souche isolée à partir des prélèvements de l'environnement.) et 33 Entérocoques résistants aux glycopeptides (20 souches isolées à partir des prélèvements à visée diagnostique, 11 souches isolées à partir des prélèvements à visée de dépistage et 2 souches isolées à partir des prélèvements de l'environnement).

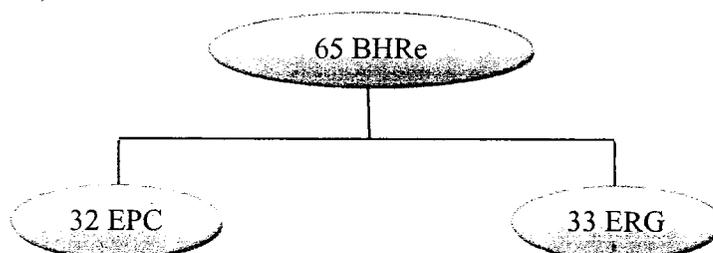


Figure 50 : Répartition des BHRé isolées au CHU Blida

VI.2. RESULTATS DE LA RECHERCHE DES EPC :

VI.2.1. Taux des EPC :

Durant la période d'étude, 4491 souches d'Entérobactéries provenant de différents types de prélèvements, issus soit de sujets hospitalisés ou externes ont été isolées, sur ces 4491 Entérobactéries, 49 présentaient une résistance à l'un des carbapénèmes testés, dont 31 souches étaient productrices de carbapénèmases soit un taux de 0.69%.

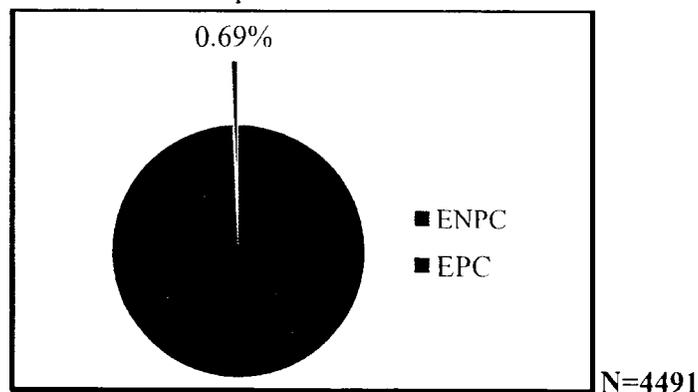


Figure 51: Taux des Entérobactéries productrices de carbapénèmases.

ENPC : Entérobactéries non productrices de carbapénèmases.

EPC : Entérobactéries productrices de carbapénèmases.

VI.2.2. Résultats de l'étude des prélèvements à visée diagnostique :

VI.2.2.1. Aspect épidémiologique :

Parmi les souches d'Entérobactéries isolées à partir des différents types de prélèvements à visée diagnostique, 29 souches étaient productrices de carbapénèmes (test d'Hodge modifié positif). Ces EPC sont issus des prélèvements des patients hospitalisés ou externes, le tableau ci-après résume les résultats obtenus :

Tableau VIII: Répartition des EPC selon le service et le type de prélèvement

Période d'étude	Numéro de souche	Bactérie	Service	Prélèvement
ETUDE RETROSPECTIVE	1	<i>K.pneumoniae</i>	Externe	Prélèvement Vaginale
	2	<i>K. pneumoniae</i>	CAC Hématologie	Hémoculture
	3	<i>K. pneumoniae</i>	Externe	Urine
	4	<i>K. pneumoniae</i>	Chirurgie générale	Urine
	5	<i>K. pneumoniae</i>	Rééducation	Urine
	6	<i>K. pneumoniae</i>	CAC Hématologie	Hémoculture
	7	<i>K. pneumoniae</i>	CAC Hématologie	Hémoculture
	8	<i>E.cloacae</i>	Traumatologie-orthopédie	Fragment d'OS
	9	<i>E. cloacae</i>	Externe	Urine
	10	<i>E. cloacae</i>	Neurochirurgie	LCR
	11	<i>E. cloacae</i>	C.A.C Chirurgie	Pus
	12	<i>E. coli</i>	Traumatologie-orthopédie	Fragment d'os
	13	<i>K. oxytoca</i>	C.A.C Hématologie	Prélèvement de gorge
	14	<i>K. pneumoniae</i>	Traumatologie-orthopédie	Matériel ostéosynthèse
	15	<i>K. oxytoca</i>	Externe	Urine
	16	<i>M. morgannii</i>	C.A.C Hématologie	Pus de furoncle
	17	<i>K.pneumoniae</i>	Réanimation polyvalente	Hémoculture
	18	<i>M. morgannii</i>	Chirurgie générale	Pus de plaie
	19	<i>M. morgannii</i>	Externe	Urine
	20	<i>K. pneumoniae</i>	Externe	Urine
	21	<i>K. oxytoca</i>	C.A.C Hématologie	Hémoculture
	22	<i>K.pneumoniae</i>	Traumatologie-orthopédie	Pus
	23	<i>P. vulgaris</i>	Externe	Pus
	24	<i>E. coli</i>	C.A.C Hématologie	Hémoculture
	25	<i>P. mirabilis</i>	Externe	Pus
	26	<i>E. coli</i>	Externe	Urine
ETUDE PROSPECTIVE	27	<i>K. pneumoniae</i>	C.A.C Hématologie	Hémoculture
	28	<i>K. pneumoniae</i>	Traumatologie-orthopédie	Pus
	29	<i>K. pneumoniae</i>	C.A.C Hématologie	Hémoculture

a) Répartition des Entérobactéries productrices de carbapénèmases selon la provenance des prélèvements (interne/externe) :

Les résultats obtenus montrent que la plupart des souches EPC sont isolées chez les patients hospitalisés (20 souches sur 29).

b) Répartition des Entérobactéries productrices de carbapénèmases selon le service :

Sur les 20 souches d'Entérobactéries productrices de carbapénèmases isolées chez les patients hospitalisés, la majorité provenaient de Centre Anti-Cancer(CAC) à savoir :

-9 souches du service d'hématologie.

-1 souche du service de chirurgie.

Suivi du service de traumatologie-orthopédie (5 souches).

c) Répartition des Entérobactéries productrices de carbapénèmases selon le type de prélèvement :

Nous avons constaté que les souches d'EPC isolées durant la période de l'étude provenaient dans la grande majorité des cas des hémocultures et des urines suivi des pus.

d) Répartition des Entérobactéries productrices de carbapénèmases selon les genres :

Dans cette étude, on note la présence d'une diversité de genres bactériens, notons que le genre *Klebsiella* arrivait en tête de liste avec 17 souches sur 29 suivi par *Enterobacter* avec 4 souches sur 29 puis *Morganella* et *Escherichia* avec 3 souches.

VI.2.2.2. Résultats de la détermination du type de carbapénémase :

La détermination du type de carbapénémase a été réalisée pour toutes les souches EPC, ceci a été fait par le test à l'EDTA qui a montré que quatre souches sur les 29 étaient EDTA positif.

VI.2.2.3. Résultats de la recherche de la BLSE :

La recherche de la BLSE a été effectuée chez différentes souches d'Entérobactéries productrices de carbapénèmases.

Nous avons pu constater que plus de la moitié des EPC isolées étaient productrices de BLSE (16 souches sur 29).

VI.2.3. Résultats de l'étude des prélèvements à visée de dépistage :

Durant la période rétrospective de cette étude, il n'y avait pas de recherche du portage des Entérobactéries productrices de carbapénèmases chez les patients, alors que durant la période prospective, il y eu la recherche de portage.

Deux Entérobactéries productrices de carbapénèmases (test d'Hodge modifié positif) ont été détectées chez deux patients lors de la recherche systématique à l'admission.

VI.3. RESULTATS DE LA RECHERCHE DES ERG :

VI.3.1. Taux des ERG :

Durant la période de l'étude, sur un total de 584 souches d'Entérocoques isolées des différents types du prélèvement (prélèvements à visée diagnostique et prélèvements à visée dépistage), 31 souches se sont révélées résistantes aux glycopeptides, soit un taux de 5.3%.

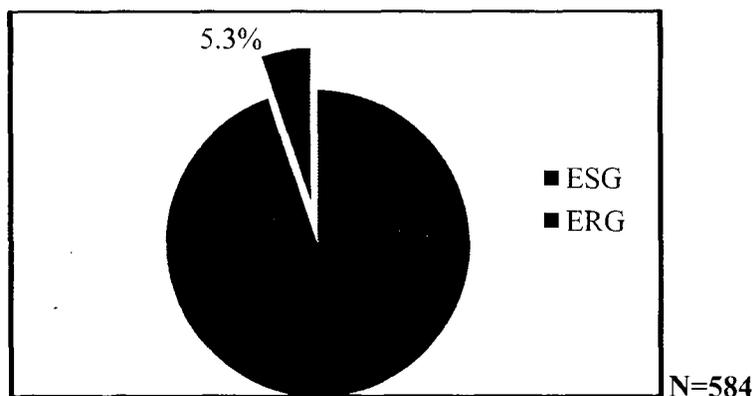


Figure 52 : Taux des Entérocoques résistants aux glycopeptides

ESG : Entérocoques sensibles aux glycopeptides.

ERG : Entérocoques résistants aux glycopeptides.

VI.3.2. Résultats de l'étude des prélèvements à visée diagnostique :

VI.3.2.1. Aspect épidémiologique :

Parmi les souches d'Entérocoques isolées à partir des différents types de prélèvements à visée diagnostique, 20 souches étaient résistantes aux glycopeptides. Ces ERG sont issus des prélèvements des patients hospitalisés, le tableau ci-après résume les résultats obtenus :

Tableau IX: Répartition des ERG selon le service et le type de prélèvement

Période d'étude	Numéro de souches	Germe isolé	Service	Prélèvement
ETUDE RETROSPECTIVE	1	<i>Enterococcus spp</i>	CAC-hématologie	Pus de plaie
	2	<i>E. faecium</i>	CAC-hématologie	Pus de plaie Hémoculture
	3	<i>E. faecium</i>	CAC-réanimation	Hémoculture
	4	<i>E. faecium</i>	Réanimation polyvalente	Hémoculture
	5	<i>E. faecium</i>	CAC-chirurgie	Hémoculture
	6	<i>E. faecium</i>	CAC-hématologie	Hémoculture
	7	<i>E. faecium</i>	CAC-hématologie	Hémoculture
	8	<i>E. faecium</i>	CAC-hématologie	Pus d'abcès Hémoculture
	9	<i>E. faecium</i>	CAC-hématologie	Pus d'abcès
	10	<i>E. faecium</i>	CAC-hématologie	Crachat
	11	<i>E. faecium</i>	CAC-hématologie	Fissure anale
	12	<i>E. faecium</i>	CAC-hématologie	Fissure anale
	13	<i>E. faecium</i>	CAC-hématologie	Coproculture
	14	<i>E. faecium</i>	CAC-hématologie	Pus
	15	<i>E. faecium</i>	Réanimation polyvalente	Hémoculture
	16	<i>E. faecium</i>	CAC-hématologie	Hémoculture
	ETUDE PROSPECTIVE	17	<i>E. faecium</i>	Ophthalmologie
18		<i>E. faecium</i>	CAC-hématologie	Hémoculture
19		<i>E. faecium</i>	Réanimation polyvalente	Hémoculture
20		<i>E. faecium</i>	CAC-hématologie	Abcès péri-anal

a) Répartition des Entérocoques résistants aux glycopeptides selon la provenance des prélèvements (interne/externe) :

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches d'Entérocoques résistantes aux glycopeptides ont été isolées chez des patients hospitalisés (internes).

b) Répartition des Entérocoques résistants aux glycopeptides selon le service :

Sur les 20 souches d'Entérocoques résistantes aux glycopeptides isolées, 16 souches provenaient de Centre Anti-Cancer(CAC) à savoir :

- 14 souches de l'unité d'hématologie.
- 1 souche de l'unité de réanimation.

-1 souche de l'unité de chirurgie.

Trois souches provenaient du service de réanimation polyvalente du CHU et une souche provenait du service d'ophtalmologie.

c) Répartition des Entérocoques résistants aux glycopeptides selon le type de prélèvement :

La grande majorité des souches d'Entérocoques résistantes aux glycopeptides isolées durant la période de notre étude provenait des hémocultures, suivi des pus.

d) Répartition des Entérocoques résistants aux glycopeptides selon l'espèce :

Dans cette étude, on note une nette prédominance de l'espèce *E.faecium* avec 19 souches sur les 20 souches isolées.

VI.3.2.2. Entérocoques résistants aux glycopeptides et résistances associées:(AnnexeVIII)

La figure ci-après résume les résultats de l'antibiorésistance des souches d'ERG

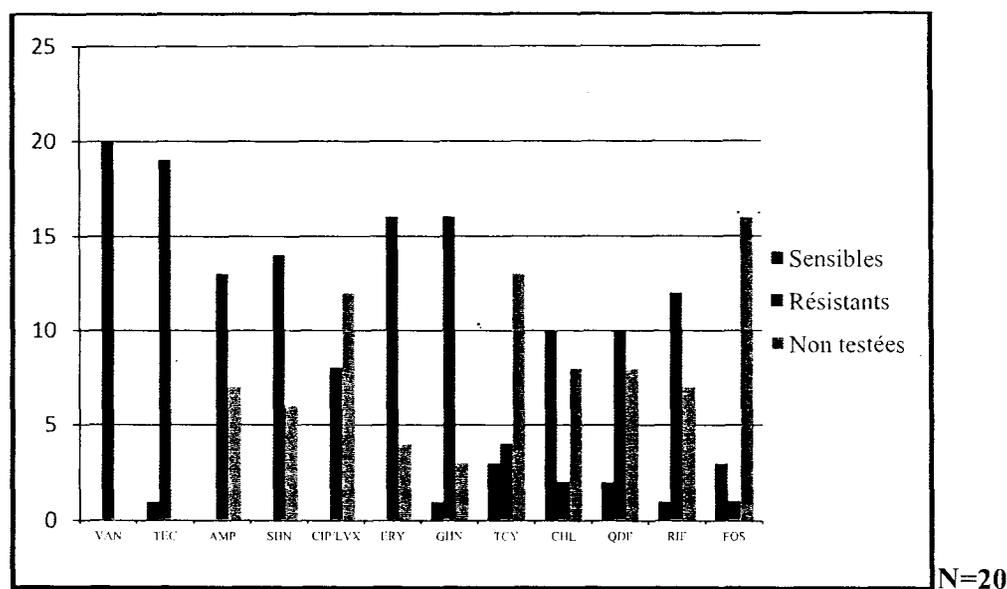


Figure 53:Résistance aux antibiotiques des ERG

Durant la période de l'étude, toutes les souches de l'ERG isolées étaient résistantes à la vancomycine, alors qu'une seule souche était sensible à la teicoplanine.

On note un taux de résistance élevé vis-à-vis de l'ampicilline, la gentamycine haut niveau, streptomycine haut niveau, l'érythromycine, rifampicine et la quinupristine-dalfopristine.

VI.3.3. Résultats de l'étude des prélèvements à visée de dépistage:

- La recherche d'ERG au niveau rectal était positive pour tous les patients cas où la recherche a été effectuée (6 patients cas durant la période de l'étude rétrospective, 3 patients cas durant la période prospective de l'étude).

Alors que 2 souches d'ERG étaient isolées chez deux patients porteurs sans infection lors de la recherche systématique à l'admission.

- Toutes les souches de l'ERG isolées à partir des prélèvements à visée de dépistage étaient des *Enterococcus faecium* qui présentaient le même profil d'antibiorésistance (antibiotype) que les souches isolées à partir des prélèvements à visée diagnostique pour chaque patient cas.
- La recherche de SARM au niveau nasal s'est révélée négative pour l'ensemble des patients.

VI.3.4. Résultats de l'étude moléculaire :

Parmi les souches de l'ERG identifiées, 8 souches ont été adressées à l'institut Pasteur d'Algérie (IPA) pour confirmation de l'identification et caractérisation du gène de résistance aux glycopeptides (5 souches de l'étude rétrospective et 3 souches de l'étude prospective), il s'agit d'*E. faecium* porteur de gène van A exprimant une résistance de très haut niveau à la vancomycine et à la teicoplanine.

VI.4. RESULTATS DE L'ENQUETE DE L'ENVIRONNEMENT :

Nous avons mené une enquête de l'environnement au niveau des chambres occupées par les trois patients cas de l'étude prospective à la recherche des BHR.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau X: Résultats de l'enquête de l'environnement des BHRé

	Numéro de prélèvement	Site du prélèvement	Résultats
Chambre « 1 » Recherche des EPC et des ERG	1	Lit+literie	<i>K. pneumoniae</i> productrice de carbapénèmases
	2	Potence	SCN <i>Bacillus</i>
	3	Poignet de la porte	SCN
	4	Poignet de la porte de sanitaire	SCN ESG
	5	Poignet de robinet	SCN ESG
	6	Poignet de la fenêtre	SCN
	7	Interrupteur d'électricité	SCN
	8	commode	<i>Acinetobacterbaumani</i> SCN ESG
Chambre « 2 » Recherche des EPC et des ERG	1	Poignet de la porte	Absence de germe
	2	Porte de sanitaire+poignet	<i>Bacillus</i> ERG <i>Staphylococcus sp</i>
	3	Lit+ literie	<i>Bacillus</i> ERG
	4	Murs	ERG <i>Staphylococcus sp</i>
	5	Potence	Absence de germe
	6	Table	Entérobactérie sensible à l'imipénème
Chambre « 3 » Recherche des ERG	1	Lit+ literie	<i>Acinetobactersp</i> ERG
	2	Table	<i>Staphylococcus sp</i>
	3	Porte sérum	<i>Acinetobactersp</i> ERG
	4	appareil d'oxygénothérapie	Absence de germe
	5	tuyaux + appareil de respiration	<i>Acinetobactersp</i> ESG

ESG : Entérocoque sensible aux glycopeptides.

ERG : Entérocoque résistant aux glycopeptides.

SCN : Staphylocoque à coagulase négative.

Les souches BHRé isolées à partir des prélèvements de l'environnement présentaient le même antibiotype que les souches isolées chez les patients cas.

CHAPITRE VII
DISCUSSION

CHAPITRE VII : DISCUSSION

Les Bactéries Hautement Résistantes émergentes (BHRe), qui ont été découvertes il y a plus de 20 ans, n'ont pas cessé de voir leur fréquence augmenter ces dernières années. A ce jour, elles ont été responsables de plusieurs épidémies hospitalières, principalement des colonisations digestives, et font craindre des impasses thérapeutiques en cas d'infection (CCLIN ARLIN 2016).

L'isolement des souches de bactéries hautement résistantes émergentes était rare en Algérie, le premier cas d'ERG a été rapporté en 2006 (N. Aggoune et al 2008), suivi de celui d'EPC deux ans plus tard (F. Robin et al 2010), alors qu'ils sont identifiés de plus en plus fréquemment dans le monde (InVS 2013).

La surveillance des BHRe est primordiale dans la prise en charge des infections générées par ces bactéries hautement résistantes (faisant craindre les impasses thérapeutiques) et dans la maîtrise de leurs disséminations (D. Lepelletier et al 2015).

C'est dans ce but que nous avons réalisé cette étude, qui s'est étalée sur une période de six ans et quatre mois allant de janvier 2011 à avril 2017, qui permet d'actualiser les données épidémiologiques au niveau du CHU Blida sur la dissémination des BHRe, et qui a démontré que :

*Un nombre important de BHRe a été isolé au CHU Blida (65 souches).

* Le taux des EPC au sein du CHU Blida est de 0.69%.

- Ce taux est proche de celui retrouvé dans l'étude réalisée au niveau du CHU de Constantine en 2014, où sur les 696 Entérobactéries isolées 9 souches étaient résistantes aux carbapénèmes, dont 5 productrices de carbapénèmases soit un taux de 0.71% (H. Salhi et al 2015).

- Un taux plus bas a été retrouvé dans l'étude réalisée par les 71 laboratoires français, de novembre 2011 à avril 2012, où ils ont identifié 133 244 Entérobactéries, dont 846 étaient résistantes à au moins un carbapénème parmi eux 107 souches étaient productrices de carbapénèmases soit un taux de 0,08% (J. Robert et al 2014).

- Un taux plus élevé a été retrouvé dans d'autre pays, au Maroc par exemple durant l'année 2012, parmi 81 souches d'Entérobactéries isolées, 5 souches étaient productrices de carbapénèmases soit un taux de 6,17% (S. Natoubi et al 2013).

* Le taux des ERG au sein du CHU Blida est de 5.3 %, ce taux est :

- Elevé par rapport aux données du réseau national de la surveillance de la résistance aux antibiotiques (AARN) où sur un total de 8123 souches d'Entérocoques isolées entre 2008 et 2015, 177 étaient résistantes aux glycopeptides, soit un taux de 2.17% (AARN 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017).

- Considérablement bas par rapport à celui retrouvé :

- ✓ Dans des études réalisées au niveau de l'Institut Pasteur d'Algérie sur une période de 10 ans, de janvier 2005 à décembre 2014, où sur un total de 330 souches d'Entérocoques, 56 souches étaient résistantes aux glycopeptides, soit un taux de 16.96% (**S. Bouheraoua et al 2015**).
- ✓ Dans d'autre pays, en France par exemple entre juillet 2001 et juin 2015, 1440 souches étaient résistantes aux glycopeptides, soit un taux de 8.1% (**M. Subiros et al 2016**).

*Durant la période d'étude, la majorité des BHRé ont été isolés chez des patients hospitalisés, ce qui suggère que l'acquisition a eu lieu probablement en milieu hospitalier. Cette constatation concorde avec les données de la littérature où ils ont noté que les carbapénèmases sont très majoritairement identifiées dans des souches nosocomiales (**P. Nordmann 2010**) et avec les données du réseau national de la surveillance de la résistance aux antibiotiques (AARN) où sur un total de 177 souches d'ERG isolées entre 2008 et 2015, 153 souches ont été isolées chez des patients hospitalisés (**AARN 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017**).

*Les BHRé sont isolées dans la plupart des cas de prélèvement issus des patients hospitalisés au niveau du Centre Anti-Cancer, du service de traumatologie et du service de réanimation. Ce taux élevé peut être expliqué par la présence de facteurs prédisposant à l'infection par des BHRé, et qui sont :

- l'immunodépression ;
- la notion de prise antérieure d'antibiotiques à large spectre (**M. Abass et al 2012**).

A savoir que les patients hospitalisés au niveau du service du CAC sont des immunodéprimés et ils sont souvent mis sous antibiotiques à large spectre (C3G, carbapénèmes).

A noter également l'utilisation anarchique et abusive des antibiotiques à large spectre entre autre l'imipénème au niveau des services de spécialité chirurgicale.

*La majorité des BHRé isolées dans notre étude chez les patients hospitalisés, provenaient d'hémoculture ceci peut être expliqué par le fait que les Entérobactéries et les Entérocoques sont des bactéries opportunistes, pouvant entraîner des infections invasives à la faveur d'une diminution des moyens de défense chez l'hôte (**F. Denis et al 2016**).

A savoir que la plupart de ses souches isolées provenaient des patients hospitalisés au sein du service du CAC-hématologie, qui sont des patients immunodéprimés.

* Durant notre étude, il ressort que *K. pneumoniae* et *E. cloacae* sont les bactéries les plus fréquemment productrices de carbapénèmases. Cette fréquence a été également rapportée dans certains pays comme la Grèce, où les souches de *K. pneumoniae* productrice de carbapénèmases représentent plus de 70% de l'ensemble des souches (**O. Patey et A. Dublanche 2015**), et dans l'étude réalisée durant l'année 2016 à l'Institut Pasteur d'Algérie, où 76.78% des EPC isolées étaient des Klebsella (**S. Hamrouche et al 2016**).

A noter que les espèces les plus fréquemment concernées par la production des carbapénèmases sont *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* et *Enterobacter spp.* La présence de carbapénèmases est rare dans les autres espèces (**DORTET et al 2014**).

* L'espèce d'ERG la plus fréquemment isolée est l'*Enterococcus faecium* avec 19 souches sur les 20 isolats, d'autres études ont confirmé ces résultats :

- ✓ L'étude de Hamidi et al a démontré que l'*Enterococcus faecium* est l'espèce la plus concernée par la résistance aux glycopeptides (**M. Hamidi et al 2013**).
- ✓ L'étude faite à l'Institut Pasteur d'Algérie entre janvier 2005 à décembre 2014, a démontré une prédominance de l'*E. faecium* (**S. Bouheraoua et al 2015**).

*Pour ce qui est de l'antibiorésistance :

- Dans notre étude plus de la moitié des EPC isolées étaient productrices de BLSE (16 souches sur 29), ceci concorde avec le résultat de l'étude de N. Aggoune et al réalisée entre septembre 2011 et avril 2014 où sur 17 souches d'Entérobactéries de sensibilité diminuée aux carbapénèmes, 9 souches coproduisaient une BLSE (**N. Aggoune et al 2014**).

- Nous avons noté que les souches de l'ERG isolées présentent une résistance très importante à la gentamycine haut niveau, la streptomycine haut niveau, la rifampicine, l'érythromycine et l'ampicilline, cette multirésistance a été également rapportée dans le rapport de l'AARN de l'année 2015 qui a révélé que tous les isolats étaient résistants à au moins six antibiotiques en plus des glycopeptides (**AARN 2017**).

*Dans notre étude, la détection des souches productrices de carbapénèmases a été réalisé par la méthode phénotypique classique «le test de Hodge modifié » qui a permis la détection de la production de carbapénémase chez 29 souches sur 46 résistantes aux carbapénèmes, à noter qu'une confirmation de ses résultats par les technique de biologie moléculaire (technique de référence) est indispensable vu les risques de faux positifs et de faux négatifs présentés par ce test.

*La détermination du type de carbapénémase dans notre étude a été effectuée par le test de disque combiné à l'EDTA qui a montré que 4 souches sur 29 appartiennent à la classe B d'Ambler (Métallo-B-Lactamase) d'autres techniques sont nécessaires. A savoir que l'OXA-48 est la carbapénémase la plus fréquente dans les hôpitaux algériens selon l'étude réalisée par N. Aggoune et al où sur les 40 EPC inclus, 35 étaient des EPC productrices d'OXA-48 (**N. Aggoune et al 2015**), et que les NDM-1 prédominent dans le sous-continent indien, KPC prédomine dans le pourtour méditerranéen (Grèce, Israël et Turquie), mais aussi dans le nord-est des Etats-Unis, alors que les OXA-48 sont surtout trouvés en Afrique du Nord (**G. Birgand et J-C. Lucet 2013**).

*Parmi les 20 souches de l'ERG identifiées, 7 souches d'*E. faecium* étaient porteuses de gène van A expriment une résistance de très haut niveau à la vancomycine et à la teicoplanine, ceci concorde avec l'étude de S. Bouheraoua et al où tous les isolats étaient de génotype van A (**S. Bouheraoua et al 2015**), le même génotype prédomine aux Etats-Unis et en Europe, alors que pour les pays asiatiques et l'Australie, c'est le génotype van B qui prédomine (**K-S. Yang et al 2007**).

*La plupart des épidémies à BHRe sont dues à la dissémination d'un seul et unique clone, le premier réservoir est présenté par les patients colonisés et infectés (C. Jehl et al 2011). Durant notre étude, le taux des EPC au niveau rectal est sous-estimé parce que la recherche n'a pas été réalisée d'une manière continue sachant que les deux EPC détectée au niveau rectal ont été mises en évidence lors de la recherche de portage de l'ERG. Alors que la recherche de portage de l'ERG a été faite d'une manière systématique chez les patients cas de l'étude prospective.

La recherche de l'ERG au niveau rectal était positive pour tous les patients cas (où la recherche a été effectuée). Ces ERG présentaient le même antibiotype que les souches isolées à partir des prélèvements à visée diagnostique pour chaque patient, ce qui nous informe sur l'origine probablement endogène de ses bactéries.

*Avec l'émergence récente du *Staphylococcus aureus* résistant à la vancomycine (VRSA), porteur de gène van A est retrouvé en co-colonisation avec les souches d'ERG par transmission du gène de résistance de l'ERG au Staphylocoque, il devient indispensable de contrôler la dissémination de l'ERG (R. Leclercq et V. Cattoir 2012). Des SARM résistants aux glycopeptides par transfert du gène de résistance van A sont déjà observés aux États-Unis (C. Rabaud et al 2008). En Algérie, aucun cas de VRSA n'a été détecté (AARN 2017).

Durant notre étude, la recherche du SARM au niveau nasal s'est révélée négative pour l'ensemble des patients.

*L'environnement constitue un moyen non négligeable dans la dissémination des BHRe (O. Lesens 2009). La recherche des BHRe au niveau des chambres des patients cas s'est révélée positive, une désinfection des chambres a été effectuée par la suite.

La contre-enquête visant à vérifier l'éradication du germe après désinfection a révélé l'absence de BHRe ce qui affirme l'efficacité de la désinfection.

CONCLUSION

CONCLUSION

Dans le but de déterminer le taux des bactéries hautement résistantes émergentes, leurs caractéristiques épidémiologiques et de suggérer les facteurs favorisant l'émergence des BHRe, nous avons réalisé ce travail qui s'est déroulé au niveau du CHU Blida durant la période allant de janvier 2011 à avril 2017.

Le taux des Entérobactéries productrices de carbapénèmases est de 0.69% et le taux des Entérocoques résistants aux glycopeptides est de 5.3%.

Les sujets hospitalisés sont plus exposés aux BHRe et plus particulièrement ceux qui proviennent du service du Centre Anti-Cancer.

L'espèce d'Entérobactérie productrice de carbapénèmases la plus rencontrée est *K. pneumoniae*.

L'espèce d'Entérocoque résistant aux glycopeptides la plus fréquemment isolée est *E. faecium*.

L'analyse des profils d'antibiorésistance des BHRe isolés démontre que la plupart des EPC produisaient des BLSE et que toutes les souches d'ERG étaient résistantes à d'autres familles d'antibiotiques en plus des glycopeptides.

Parmi les 20 souches de l'ERG identifiées, 7 souches d'*E. faecium* étaient porteuses de gène van A exprimant une résistance de très haut niveau à la vancomycine et à la teicoplanine.

Le potentiel réel de transfert des gènes de résistance de BHRe vers des espèces plus virulentes, tel que les gènes de l'ERG vers *Staphylococcus aureus* est inquiétant.

L'amélioration des techniques d'identification bactériologiques des BHRe, permettent de détecter à temps les infections dues à ces germes et d'éviter la dissémination des gènes de résistances à d'autres bactéries.

L'isolement des BHRe représente une réelle menace dans les établissements de santé à cause de la difficulté d'éradication de ces bactéries une fois disséminées. Ainsi il est nécessaire et urgent de prendre des mesures préventives et organisationnelles en priorité une surveillance stricte et continue, une vigilance des différents intervenants, un respect des règles de prescription des antibiotiques, et un renforcement des mesures d'hygiène dans nos établissements.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

ARTICLES

LES ARTICLES

-A-

- **Abbas. M, Cherkaoui. A, Fankhauser. C, Schrenzel. J, Harbarth. S**, avril 2012. Carbapénémases: implications cliniques et épidémiologiques pour la Suisse. Revue médicale suisse, vol : 8, p: 882-889.
- **Aggoune. N**, 2008. Premier cas d'*Enterococcus faecalis* résistant à la vancomycine en Algérie. Médecine et maladies infectieuses, vol : 38, P : 557-558.
- **Aggoune. N, Tali-Maamar. H, Assaous. F, Benamrouche. N, Naim. M, Rahal. K**, 2014. Emergence of plasmid mediated carbapenemase OXA-48 in a *Klebsiella pneumoniae* strain in Algeria. Journal of Global Antimicrobial Resistance, vol: 2, p: 327-329.
- **Aguirre-Quinonero. A, Martínez-Martínez. L**, 2017. Non-molecular detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates. Journal of Infection and Chemotherapy, vol: 23, p: 1-11.
- **Akova. M, Daikos. G-L, Tzouveleki. L, Carmeli. Y**, 2012. Interventional strategies and current clinical experiences with carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Infect, vol:18, p: 439-448.
- **Altamimi. M, AlSalamah. A, AlKhulaifi. M, AlAjlan. H**, 2017. Comparison of phenotypic and PCR methods for detection of carbapenemases production by Enterobacteriaceae. Saudi Journal of Biological Sciences, vol: 24, p: 155-161.
- **Arthur. M, Quintiliani. R**, 2001. Regulation of VanA- and VanB-Type Glycopeptide Resistance in Enterococci, American Society for Microbiology, vol : 45, P : 369-378.

-B-

- **Baba Ahmed-KaziT ani. Z, Arlet. G**, 2014. Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie. Pathologie Biologie, vol : 62, p : 169-178.
- **Balan. K, Sireesha. P, Setty. CR**, 2012. Study to detect incidence of carbapenemase among Gram negative clinical isolates from tertiary care hospital. Journal of Dental and Medical Sciences, vol: 1, p: 8-12.
- **Bernabeu. S, Poirel. L, Nordmann. P**, 2012. Spectrophotometry-based detection of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae. Diagn Microbiol Infect Dis, vol: 74, p : 88-90.
- **Binda. E, Marinelli. F, Letizia. G-M**, 2014. Ancien et du Nouveau glycopeptides Antibiotiques: Action et Résistance. Antibiotiques, vol : 3, P : 571-576.
- **Birgand. G, Lucet. J-C**, Juin 2013. Politique de dépistage des BMR : quand et qui faut-il dépister ? Revue francophone des laboratoires, vol : 453, p : 29-39.
- **Birgy. A, Bidet. P, Genel. N, Doit. C, Decré. D, Arlet. G, Bingen. E**. 2012. Phenotypic screening of carbapenemases and associated β -lactamases in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. Journal of clinical microbiology, vol: 50, p: 1295-1302.

- **Bocanegra-Ibariasa. P, Flores-Treviño. S, Camacho-Ortiz. A, Morfin-Oteroc. R, Villarreal-Treviño. L, Llaca-Díaz. J, Martínez-Landeros. E, Rodríguez-Noriega. E, Calzada-Güereca. A, Maldonado-Garza. H, Garza-González. E,** 2015. Phenotypic and genotypic characterization of vancomycin-resistant? *Enterococcus faecium* clinical isolates from two hospitals in Mexico : First detection of VanB phenotype-vanA genotype. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, vol : 10, P : 1-5.
 - **Boibieux. A,** mars 2010. CAT devant un entérocoque résistant aux glycopeptides (ERG) dans les établissements de santé français. Service des maladies infectieuses et tropicales Hôpital de la Croix-Rousse, p : 8-16.
 - **Boivin. S, Caux. C, Soucy. C et Allard. A,** décembre 2016. Les Entérobactéries productrices de carbapénémases. Prévention des infections s'unir pour prévenir vol : 13, P : 53-56.
 - **Bourdon. N,** 2011. Épidémiologie de la résistance aux antibiotiques chez les entérocoques en France. *Journal des Anti-infectieux*, vol : 13, P: 2-11.
 - **Bourdon. N, Fines-Guyon. M, Thiolet. J-M, Maugat. S, Coignard. B, Leclercq. R,** 2011. Changing trends in vancomycin-resistant enterococci in French hospitals. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. Vol : 66, P : 713-721.
 - **Bourdon. N, Lemire. A, Fines-Guyon. M, Auzou. M, Perichon. B, Courvalin. P, Cattoir. V, Leclercq. R,** 2011. Comparison of four methods including semi-automated rep-PCR for the typing of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Journal of Microbiological Methods*, vol : 84, P : 74-80.
 - **Bourgeois-nicolas. N, Moubareck. C, Doucet-Populaire. F,** 2005. Transfert de la résistance à la vancomycine entre entérocoques d'origine animale et humaine. *Antibiotiques*, vol : 7, P : 125-126.
 - **Boutet-dubois. A, Pantel. A, Sotto. A, Lavigne J-P,** avril 2012 Entérobactéries productrices de carbapénémases, lettre d'information du CCLinSud-Est, destinée aux Acteurs de la Lutte contre les Infections Nosocomiales & Associées aux Soins, vol : 2, P : 1-5.
 - **Brun-Buisson. C,** Octobre 2014. Le dépistage des porteurs de bactéries multirésistantes : chez quels patients ? *Reanimation*, vol : 24, P : 304-314.
 - **Brun-Buisson. C,** 2014. La maîtrise de la diffusion des bactéries multi-résistantes endémiques en réanimation : enseignements des récentes études. *Journal des Anti-infectieux*, vol : 16, p : 144-153.
 - **Butcu. M, Akcay. S, Sengoz Inan. A, Aksaray. S, Ozturk Engin. D, Calisici. G,** 2011. In vitro susceptibility of enterococci strains isolated from urine samples to fosfomicin and other antibiotics. *J Infect Chemother*, vol : 17, P: 573-576.
- C-
- **Camus. C, Bellissant. E, Seville. V, Perrotin. D, Garo. B, Legras. A, Renault. A, Le Corre. P, Donnio. P-Y, Gacouin. A, Le Tulzo. Y, Thomas. R,** 2005. Prevention of acquired infections in intubated patients with the combination of two decontamination regimens, vol : 33, p : 307-314.

- **Carmeli. Y, Akova. M, Cornaglia. G.**2010. Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control. *Clin Microbiol Infect*, vol : 16, p : 102-111.
- **Cattoir. V.**2014. Traitement des infections dues à Entérobactéries productrices de carbapénémases. *Journal des Anti-infectieux*, 2014, vol : 16, p: 99-105.
- **Cattoir. V, Daurel. C,** 2010. Quelles nouveautés en antibiothérapie ? *Med Mal Infect* vol : 40, P : 135-154.
- **Cattoir. V, Leclercq. R,** Novembre 2010. Les entérocoques résistants aux glycopeptides. *Medecine Sciences*, vol : 26, P : 936-937.
- **Chavers. L-S, Moser. S-A, Benjamin. W-H, Banks. S-E, Steinhauer. J-R, Smith. AM,** 2003. Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. *J Hosp Infect*, vol : 53, P : 159-171.
- **Colomban. S-G,** mars 2016. Bactéries hautement résistantes et émergentes BHRé recommandations pour la prévention de la transmission croisée. *DU d'infectiologie chimiothérapie anti infectieuse et de vaccinologie*, P : 1-80.
- **Courvalin. P,** 2005. Genetics of glycopeptide resistance in Gram-positive pathogens, *International Journal of Medical Microbiology*, vol : 294, P : 481-482.
- **Courvalin. P,** 2006, Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. *Clinical Infectious Diseases*, vol : 42, P : 26-30.
- **Cuzon .G, Naas.T, Nordmann.P,** 2010. Carbapénémases de type KPC: quel en jeu en microbiologie clinique ? *Pathologie Biologie*, vol : 58, p: 39-45.

-D-

- **Da Silva. R-M, Traebert. J, Galato. D,** 2012. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing: a review of epidemiological and clinical aspects. *Expert Opin Biol Ther*, vol : 12, p : 663-671.
- **Dekeyser. S, Beclin. E, Descamps. D,** 2011. Intérêt de la mise en place de la recherche des gènes vanA et vanB par technique PCR en système clos dans un laboratoire de microbiologie dans le cadre de la gestion d'une épidémie à *Enterococcus faecium* résistant aux glycopeptides (EfrG). *Pathologie Biologie*. 59: P : 73-78.
- **Delmas. J, Robin. F, Romaszko. J-P, Baraduc. R, Lesens. O, Sirot. J, Bonnet. R,** 2005. Utilisation de la gélose VCA3 (bioMérieux) pour l'isolement sélectif des entérocoques résistants à la vancomycine à partir de prélèvements fécaux. *Pathologie Biologie*, vol : 53, P: 486.
- **Demir. S, Soysal. A, Bakir. M, Kaufmann. M-E, Yagci. A,** 2008. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in paediatric wards: a nested case-control study. *Journal of paediatrics and child health*, vol: 44, p:548-553.
- **Depardieu. F, Courvalin. P, Kolb. A,** Juillet 2005. Binding sites of VanR_B and σ^{70} RNA polymerase in the *vanB* vancomycin resistance operon of *Enterococcus faecium* BM4524, vol : 57, P: 550-564.

- **Depardieu. F, Kolbert. M, Pruul. H, Bell. J, Courvalin. P**, Mai 2004. VanD-Type Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. American Society for Microbiology, vol : 48, P : 3889-3892.
 - **Doit. C**, Juillet 2015. Bactéries hautement résistantes émergentes en pédiatrie Multidrug Resistant Bacteria in Children. Réanimation, vol : 10, p : 1-6.
 - **Donskey. C-J, Chowdhry.T-K, Hecker. M-T, Hoyen. C-K, Hanrahan. J-A, Hujer. A-M**, 2000. Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. N Engl J Med, vol : 26, p : 1925-1932.
 - **Dortet. L, Bonnin. R, Jousset. A, Gauthier. L, Naas. T**, 2016. Émergence de la résistance à la colistine chez les Entérobactéries : une brèche dans le dernier rempart contre la pan-résistance ! Journal des Anti-infectieux, vol : 18, P : 139-159.
 - **Dortet. L, Cuzon. G et Naas. T**, mai 2016. Note technique : Détection des souches d'entérobactéries productrices d'une carbapénémase. CNR, v : 5, p:1-19.
 - **Dortet. L, Cuzon. G et Nordmann. P**, janvier 2014. Note technique : Détection des souches d'entérobactéries productrices d'une carbapénémase. CNR, P:1-12.
 - **Dortet. L, Poirel. L, Nordmann. P**, mai 2013. Épidémiologie, détection et identification des entérobactéries productrices de carbapénémases. Bactériologie Carbapénémases, vol : 312, P : 1-12.
 - **Dosso. M, BissagnenE. E, Coulibaly. M, Kette Faye. H, N'Douba. A, Guessennd. N, Diaha. H, Bouzid. S-A, Akoua Koffi. C, M'Bengue. A, Gnagne Adou. F, Fofana. K, Kadio. A**, 2000. Résistances acquises et prescriptions d'antibiotiques en Afrique : quelles adéquations? Méd Mal Infect, vol : 30, P : 199.
 - **Dutka-Malen. S, Courvalin. P**, 1994. Résistance aux glycopeptides et aux aminosides chez les entérocoques, Méd Mal Infect, vol : 24, P: 158-159.
- E-
- **Evers. S, Courvalin. P**, Mars 1996.Regulation of VanB type Vancomycin Resistance Gene Expression by the VanSB-RB Two-Component Regulatory System in *Enterococcus faecalis* V583. Journal of bacteriology, vol : 178, P : 1302-1309.
- F-
- **Fernandez-Gerlinger. M-P, Mainardi. J-L**, 2014. Nouvelles associations dans le traitement des infections graves à cocci à Gram positif. Journal des Anti-infectieux, vol : 16, P : 18-21.
 - **Fines. M, Bourdon. N, Leclercq. R**, Novembre 2007. Epidémies à entérocoques résistants aux glycopeptides en France : rôle du laboratoire. Revue francophone des laboratoires, vol : 396, P : 33, 34.
 - **Fournier. S**, 2014. Maîtrise des bactéries hautement résistantes aux antibiotiques émergentes(BHRe). Journal des Anti-infectieux, vol: 95, P : 1- 9.
 - **Friaes. A, Resina. C, Manuel. V, Lito. L, Ramirez. M, Melo-Cristino. J**, mars 2015. Epidemiological survey of the first case of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infection in Europe. Epidemiology and Infection, vol : 143, p: 745-748.

-G-

- **Gauzit. R, Lepape. A, Guillou. Y-M, Boninot. N, Veber. B, Dupont. H, Montravers. P, 2002.** Utilisation des glycopeptides en réanimation : résultats d'une enquête de pratique. *Réanimation*, vol : 11, P : 19-23.
- **Gholizadeh. Y, Courvalin. P, 2000.** Acquired and intrinsic glycopeptide resistance in enterococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol : 16, P: 11-14.
- **Giske. C-G, Gezelius. L, Warner. M, Sundsfjord. A, Woodford. N. 2012.** A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Journal of clinical microbiology*, vol: 17, P: 552-556.
- **Godreuil. S, Marchandin. H, Boulier. A, Boumzebr. A, campos. J, Jean-Pierre. H, Octobre 2007,** Dépistage des entérocoques résistants aux glycopeptides : six ans d'étude dans trois services de réanimation au CHU de Montpellier. *Pathologie Biologie*, vol : 55, p : 418-423.
- **Grall. N, Andremont. A, Armand-Lefèvre. L, 2011.** Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ? *journal des Anti-infectieux*, vol : 13, P : 87-102.
- **Gupta. N, Limbago. B-M, Patel. J-B, Kallen. A-J, 2011.** Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: *Epidemiology and prevention. Clin Infect Dis*, v: 53, p:60-67.

-H-

- **Hachem. R, Raad. I, 2002.** Failure of oral antimicrobial agents in eradicating gastrointestinal colonization with vancomycin-resistant enterococci. *Infect Control Hosp Epidemiol*, vol : 23, p : 43-44.
- **Hamidi. M, Ammari. H, Ghaffor. M, Benamrouche. N, Tali-Maamar. H, Tala-Khir. F, Younsi. M, Rahal. K, 2013.** Emergence d'*Enterococcus faecium* résistant aux glycopeptides en Algérie : à propos d'un cas. *Annales des biologies cliniques*, vol : 71, P : 104-106.
- **Hrabak. J, Walkova. R, Studentova. V, Chudackova. E, Bergerova. T, September 2011.** Carbapenemase Activity Detection by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of clinical microbiology*, vol: 49, P: 3222–3227.

-I-

- **Isakow. W, Morrow. K-E, Kollef. M-H, Juillet 2007.** Probiotics for preventing and treating nosocomial infections. *Chest journal* ; vol : 132, P : 286-294.

-J-

- **Jaureguy. F, Wolff. M, Montravers. P, Salmon. D, Cordonnier. C, Brun-Buisson. C, Fantin. B, 2012.** Recommandations de bon usage des glycopeptides et lipoglycopeptides, *Journal des Anti-infectieux*, vol : 14, p : 11-19.
- **Jehl. C, Vogel. T, Lavigne. T, Hitti. A, Berthel. M, Kaltenbach. G, 2011.** Suivi prospectif de patients excréteurs d'entérocoques résistants aux glycopeptides en unité de soins de longue durée et efficacité des mesures de précaution « contact » *Presse Med*, vol : 40, P : 320-326.

-K-

- **Kramer. A, Schwebke. I, Kampf. G**, 2006. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Inf Dis*. P:130-137.

-L-

- **Land. M-H, Rouster-Stevens. K, Woods. C-R**, 2005. *Lactobacillus* sepsis associated with probiotic therapy. *Pediatrics*, vol : 115, P : 178-181.
- **Lavigne. J-P**, janvier 2007. Effets des antibiotiques et mécanismes de résistance. *Bactériologie, Faculté de Médecine Montélier-Nimes*. P: 1-3.
- **Leclercq. R, Cattoir. V**, juillet 2012. Bactéries à Gram positif et glycopeptides, revue francophone des laboratoires, vol : 445, P : 43-46.
- **Lee .K, Kim .Y-A, Park .Y-J, Lee .H-S, Kim .M-Y, Kim .E-C**, 2002. Korean Nationwide Surveillance of Antimicrobial Resistance Group. Increasing prevalence of vancomycin-resistant enterococci, and ceftazidime-, imipenem- and fluoroquinolone-resistant Gram-negative bacilli: a KONSAR study in 2002. *Yonsei Med J*, vol: 45, p: 598-608.
- **Legeay. C., Bourigault. C., Lepelletier. D, Zahar. J-R**. 2015. Prevention of healthcare-associated infections in neonates: room for improvement. *Journal of Hospital Infection*, vol : 89, p : 319-323.
- **Leone. M, Ayem. M-L, Martin. C**, 2000. Les glycopeptides. *Réanimation*, vol : 19, P : 177, 187.
- **Lepelletier. D, Batard. E, Berthelot. P, Zahar. J-R, Lucet. J-C., Fournier. S, Jarlier. V, Grandbastien. B**, 2015. Maîtrise de la diffusion des Entérobactéries productrices de carbapénémases : épidémiologie, stratégies de prévention et enjeux. *La Revue de médecine interne*, vol : 4887, P : 1-6.
- **Lesens. O**, Juin 2009. L'entérocoque résistant à la vancomycine (ERV). *Néphrologie et Thérapeutique*, vol : 5, P : 261-264.
- **Levy Hara. G, Gould. I, Endimiani. A, Pardo. PR, Daikos. G, Hsueh. PR et al.** 2013. Detection, treatment, and prevention of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: recommendations from an International Working Group. *J Chemother* , vol: 25, P:129-40.
- **Livermore D-M**, 2012. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med*, vol : 27, P : 128-142.
- **López-cerero. L et Almirante. B**. 2014. Epidemiology of infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: reservoirs and transmission mechanisms. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, vol: 32, P: 10-16.
- **Lucet. J-C, Andermont. A, Coignard. B**, Novembre 2008. Les entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG) : situation épidémiologiques, mesure de contrôle actuelles et enjeux à venir. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire (BEH)*, n° : 41-42, P : 386-390.
- **Lucet. J-C, Birgand. G**, 2016. Organisation de la prise en charge des patients porteurs de bactéries hautement résistantes émergentes. *Journal des anti-infectieux*, vol : 142, p : 1-5.

- **Luchi. F, Berthelot. P, Fresard. A**, 1994. Le traitement des infections à entérocoques. Médecine et maladies infectieuses, vol : 24, p : 207-217.

-M-

- **Mainardi. J-L**, 2011. Les glycopeptides : stop ou encore ? La Revue de médecine interne, vol : 32, P: 139-141.
- **Makinson. A, Lemoing. V**, Avril 2008. Nouveaux antibiotiques anti-gram + dans l'endocardite infectieuse, une place encore difficile à préciser. Annales de Cardiologie et d'Angéiologie, vol : 57, P : 88-92.
- **Manley. K-J, Frankel. M-B, Mayall. B-C, Power. D-A**, Mai 2007. Probiotics treatment of vancomycin resistant enterococci a randomised controlled trial. Medical journal of Australia, vol : 186, N° : 9, P : 454-457.
- **Martin .ET, Tansek. R, Collins. V, Hayakawa. K, Abreu-Lanfranco.O, Chopra. T**. 2013. The carbapenem-resistant Enterobacteriaceae score: a bedside score to rule out infection with carbapenem resistant Enterobacteriaceae among hospitalized patients. AmJ Infect Control, vol: 41, P: 180-182.
- **Miriagou. V, Cornaglia. G, Edelstein. M, Galani. I, Giske C-G, Gniadkowski. M, Malamou-lada. E, Martínez-martínez. L, Navarro. F, Nordmann. P, Peixe. L, Pournaras. S, Rossolini. G. M, Tsakris. A, Vatopoulos. A**, 2010. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. Journal of clinical microbiology, vol: 16, P: 112-122.
- **Miro J-M, Garcia-de-la-Maria C, Armero Y, Soy D, Moreno A, del Rio A**, 2009. Addition of gentamicin or rifampin does not enhance the effectiveness of daptomycin in treatment of experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, vol : 53, P :4172-4177.
- **Mondy. K-E, Shannon. W, Mundy. L-M**, 2001. Evaluation of zinc bacitracin capsules versus placebo for enteric eradication of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. Clin Infect Dis, vol : 33, p : 473-476.

-N-

- **Naas. T, Lermít. L, Vaux. S, Maurice. S**, juin 2012. Epidémiologie mondiale et française XXIIIe. Congrès national de la SF2H, p : 44-47.
- **Nicolas-Chanoine. M-H, Rober. J**, 2012. La résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif. La résistance des entérobactéries aux carbapénèmes, P : 1-5.
- **Nordmann. P, Carrer. A**, 2010. Les carbapénémases des entérobactéries. Archives de pédiatrie, vol : 17, P : S154-S162.
- **Nordmann. P, Cuzon. G, Naas. T**, April 2009. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing, bacteria Lancet Infect Dis, vol: 9, P: 228-236.
- **Nordmann. P, Poirel. L, Dortet. L**, 2012. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis., 2012, vol : 18, P: 1503-1507.

-O-

- **Oren. I, Sprecher. H, Finkelstein.R, Hadad. S, Neuberger. A, Hussein. K et al.**2013. Eradication of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae gastrointestinal

colonization with nonabsorbable oral antibiotic treatment: A prospective controlled trial. *Am J Infect Control*, vol : 41, P: 1167-1172.

-P-

- **Panesso. D, Abadi'a-Patin. L, Vanegas. N, Reynolds. P, Courvalin P, Cesar. A,** Mars 2005. Transcriptional Analysis of the *vanC* Cluster from *Enterococcus gallinarum* Strains with Constitutive and Inducible Vancomycin Resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol : 49, p : 1160-1161.
- **Patel. J-B, Rasheed. J-K, Kitchel. B,** 2009. Carbapenemases in enterobacteriaceae: activity, epidemiology, and laboratory detection. *Clinical Microbiology Newsletter*, vol : 31, No: 8, P: 55-62.
- **Perichon. B, Reynolds. P and Courvalin. P,** September 1997. VanD-Type Glycopeptide-Resistant *Enterococcus faecium* BM4339, *antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 41, P: 2016-2018.
- **Poirel. L, Dortet. L, Nordmann. P,** 2013. Epidémiologie des carbapénémases. *La lettre de l'Infectiologue*, vol : 4, p : 124-127.
- **Poulakou. G,** 2015 .Treatment of infections caused by carbapenemase-producing Gram-negative. *Pathogens Journal des Anti-infectieux*, vol: 112, P: 1-5.

-Q-

- **Quincampoix. J-C, Mainiardi. J-L,** Mai 2001. Mécanismes de résistances des cocci à Gram positif. *Réanimation*, vol : 10, P : 267-275.
- **Quintiliani. R, Stefan Evers. J-R, Courvalin. P,** Mai 1993. The *vanB* Gene Confers Various Levels of Self-Transferable Resistance to Vancomycin in Enterococci. *The Journal of Infectious Diseases*, vol : 167, P : 1220, 1223.

-R-

- **Rabaud. C, Henard. S, Jouzeau. N, Villaume. M,** 2008. Prise en charge d'une épidémie de colonisation digestive à entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG) dans la région Lorraine. *Médecine et maladies infectieuses*, vol : 38, P : 103.
- **Robert. J,** Avril 2007. Conduite à tenir devant un malade porteur d'un entérocoque résistant à la vancomycine. *Réanimation*, vol : 16, P : 259, 262.
- **Robin. F, Aggoune-Khinache. N, Delmas. J, Naim. M et Bonnet. R,** juin 2010. Novel VIM Metallo β Lactamase Variant from Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* from Algeria, *antimicrobial agents and chemotherapy*, vol : 54, P: 466-470.
- **Robin. F, Gibold. L, Bonnet. R,** 2012. Résistances naturelles et acquises aux β -lactamines chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quotidienne ? *Revue francophone des laboratoires*, vol : 54, P : 47-58.
- **Rossi. F, Diaz. L, Wollam. A, Panesso. D, Zhou. Y, Rincon. S, Narechania. A, Xing. G, Digioia. S-R et al,** avril 2014. Transferable Vancomycin Resistance in a community Associated MRSA Lineage. *The new England journal of medicine*, vol : 370, p : 1524-1531.

-S-

- **Saidel-Odes. L, Polachek .H, Peled. N et al,** 2012. Randomized, doubleblind, placebo-controlled trial of selective digestive decontamination using oral gentamicin

and oral polymyxin E for eradication of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* carriage. *Infect Control Hosp Epidemiol*, vol : 33, p ; 14-19.

- **Saurina. G, Landman. D, Quale. J-M.** 1997. Activity of disinfectants against vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect.Control.Hosp.Epidemiol*, vol : 18, p : 345-347.
- **Senn. L, Petignat. C, Chabanel. D, Zanetti. G,** 2013. Contrôle d'une épidémie d'entérocoques résistant à la vancomycine dans plusieurs hôpitaux de Suisse. *Rev Med Suisse*, vol : 9, P : 882-891.
- **Subiros. M, Bervas. C, Venier. A-G, Colomb-Cotinat. M, Soing-Altrach. S, Pontès. V, Blanchard. H, Simon. L, Bernet. C, Sénéchal. H, Vaux. S, Coignard. B,** Novembre 2016. Entérocoques résistants aux glycopeptides dans les établissements de santé en France : données épidémiologiques du signalement des infections nosocomiales, juillet 2001- juin 2015. *Bull Epidémiol Hebd*, vol : 24, P : 410-421.
- **Surcouf. C, Fabre. M, Enouf. V, Cade. S, Soler. C, Mac Nab. C, Samson. T, Foissaud. V,** 2011. Portage d'entérocoques résistants aux glycopeptides : les techniques d'isolement et d'identification actuelles sont-elles suffisantes ? *Pathologie Biologie*, vol : 59, P : 148-149.
- **Sylvie. C,** 2009. La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important. *Le parrainage des antimicrobiens*, vol : 42, p : 6-21.

-T-

- **Tamma P-D, Hsu A-J,** 2014. Optimizing therapy for vancomycin resistant enterococcal bacteremia in children. *Curr Opin Infect Dis*, vol : 27, P : 517-527.
- **Thibault. M,** 2011. Les infections nosocomiales: L'importance d'un suivi épidémiologique et de l'identification rapide des bactéries en cause: Exemple de quelques techniques de diagnostic permettant cette identification précoce, p :1-8.
- **Thiolet. J-M, Lacavé. L, Jarno. P,** 2007. Prévalence des infections nosocomiales, France. *Bull Epidemiol Hebd*, vol: 2006, P : 429-432.
- **Titze-de-Almeida .R, Van Belkum .A, Felipe .M-S, Zanella .R-C, Top .J, Willems .R-J,** 2006. Multilocus sequence typing of hospital-associated *Enterococcus faecium* from Brazil reveals their unique evolutionary history. *Microb Drug Resist*, vol : 12, P : 119-130.

-V-

- **Von Gottberg. A, Van Nierou. W, Duse .A, Kassel. M, McCarthv. K, Brink. A,** 2000. Epidemiology of glycopeptide resistant Enterococci colonizing high-risk patients in hospitals in Johannesburg, republic of South Africa. *J Clin Microbial*, vol : 38, P : 901-908.

-W-

- **Wolff. M, Joly-Guillou. M-L, Pajot. O,** mars 2008. Le point sur les carbapénèmes, *Réanimation*, vol : 17, P : 242-250.

-Y-

- **Yang. K-S, Fong. Y-T, Lee. H-Y, Kuruin Singafp. A, Koh. T-H, Koh. D, Lim. M-K,** juin 2007. Predictors of Vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) Carriage in the

First Major VRE Outbreak in Singapore. Annual Academic Medical Singaore, vol : 36, p : 379-383.

-Z-

- **Zahar. JR,Grall. I, Kouatchet. A.T,** 2011.Carbapénèmes : nouvelles molécules, différentes indications ? La Lettre du Pharmacologue, vol : 25, P : 16-20.

COMMUNICATIONS

LES COMMUNICATIONS

-A-

- Aggoune. N, Tali-Maamar. H, Assaous. F, Guettou. B, Laliem. R, Hasnaoui. S, Zerouki. A, Rahal. K, Naim. M, 2015. Sensibilité aux antibiotiques des souches d'entérobactéries productrices de carbapénèmases provenant d'isolats cliniques en Algérie. Communication affichée. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI).
- Aggoune. N, Tali-Maamar. H, Assaous. F, Guettou. B, Zerouki. A, Ouar-Korichi.M-N, Berouaken. S, Azrou. S, Khemissi. S, Hamidi. M, Ammari. H, Benamrouche. N, Naim.M, Rahal.K, 2014. OXA-48 En Algérie, vers la généralisation. Communication affichée. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI).
- Aggoune. N, Zerouki. Z, Tali-Maamar. H, Guettou. B, Ballout. I, Ladouari. A, Gouigah. R, Kasmi. C, Tiouit. D, Rahal. K, Naim. M, 2014. Portage d'entérobactéries productrices de carbapénèmases à l'Hôpital central de l'armée Mohammed Seghir Nekkache d'Alger : OXA-48 et NDM à l'honneur. Communication affichée. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI).

-B-

- Bouheraoua. S, Djedjig. F, Benamrouche. N, Tali Maamar. H, Rahal. K, Mai 2015. Evolution de la résistance aux antibiotiques des entérocoques : place de l'*E. faecium*. Communication affichée. 8^{ème} Journée Nationale d'Hygiène Hospitalière et de lutte contre les infections associées aux soins.
- Bouvier-Slekovec. C, 19 décembre 2013. Bactéries Hautement Résistantes aux Antibiotiques (BHRe) Situation épidémiologique. Communication affichée. Journée annuelle des EOH et présidents de CLIN.

-C-

- Cattoen. C, 2012. Techniques et limites des méthodes de détection des Entérobactéries Productrices de Carbapénèmase (EPC). Communication affichée. XXIIIème congrès SF2H

-H-

- HAMROUCHE. S, OUKID. S, BOUTABA. Y, SADAT. S, BELOUNI. R, OUAR-KORICHI. M-N, 2016. Dépistage du portage digestif d'entérobactéries productrices de carbapénèmases (EPC) dans l'Algérie durant l'année 2016. Communication affichée. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI).

-N-

- Natoubi. S, Barguigua. A, Amghar. S, Hilali. A, Baghdad. N, Timinouni. M, Zerouali. K, 2013. Emergence de *Klebsiella pneumoniae* productrice de carbapénèmase à l'Hôpital Régional Hassan II, Settat, Maroc. Communication affichée. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI).

-P-

- Patey. O, Dublanche. A, Mai 2015. Phagothérapie - place des bactériophages dans le traitement des infections bactériennes à bactéries multirésistantes (BMR). Communication

affichée. 8^{ème} Journée Nationale d'Hygiène Hospitalière et de lutte contre les infections associées aux soins.

-S-

- **Salhi. H, Salhi. K, Douahi. O, Riri. A, Benmekhbi. R, Benchouala. Ch, Laouar. H, Lezzar. A, Benladed. K,** Mai 2015. *Klebsiella pneumoniae* résistante aux carbapénèmes chez des patients hospitalisés en réanimation médicale du CHU Constantine. Communication affichée. 8^{ème} Journée Nationale d'Hygiène Hospitalière et de lutte contre les infections associées aux soins.

-Z-

- **Zerouki. A, Aggoune. N, Tali-Maamar. N, Guettou. B, Ghamri Doudane.Y, Bengriche. L, Ladouari. A, Balout I, Rahal. K, Naim. M,** 2015. Entérobactéries productrices de carbapénémases à l'hôpital central de l'armée d'Alger : bilan d'une année et demie de surveillance. Communication affichée. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI).

OUVRAGES

LES OUVRAGES**-A-**

- **Avril. J-L, Dabernat. H, Denis. F, Monteil. H, 1992.** Bactériologie clinique ; 2^{ème} édition : Ellipses, P : 37, 149-150,189-190.
- **Assous. M-V, Lise. A, Guérineau. B, Bourhy. H, Dhote. R, Pougam. A, 1999.** Microbiologie et pathologie infectieuse ; 2^{ème} édition : De boek, Paris, P : 199, 211.

-B-

- **Benslimani. A, Belouni. R, Seghier. M, Ramdani Bouguessa. A, 2001.** Manuel de microbiologie ; 3^{ème} édition : OPU, P : 91, 99, 119.
- **Berche. P, Gaillard. J-L, Simonet. M, 1988.** Bactériologie ; 1^{ère} édition : Flammarion Médecine Science, Paris, P : 592.
- **Bryskier. A, 1999.** Antibiotiques, agents antimicrobiens et antifongiques ; édition : Ellipses, Paris, P : 40-60.

-D-

- **Denis. F, Ploy. M-C, Martin. C, Cattoir. V, 2016.** Bactériologie médicale; 3^{ème} édition : Elsevier Masson, Paris, p : 302-321.

-F-

- **Fauchère. J-L, Avril. J-L, 2002.** Bactériologie générale et médicale ; 2^{ème} édition : Elipses, P : 141, 226-227, 237-238.
- **Frenay. J, Renaud. F, Hansen. W, Bollet. C, 2000.** Précis en bactériologie clinique ; édition : Eska, P : 835, 1107,1110.

-G-

- **Grosjean. J, Clavé. D, Archambaud. M, Pasquier. C, 2011.** Bactériologie et virologie clinique ; 2^{ème} édition : De boek, Paris, P : 95-97,126-128.
- **Gaudy. C, Buxeraud. J, 2005.** Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutique ; édition : Elsevier, Paris, P : 21,25.

-K-

- **Kayser. F-H, Bottger. E-C, Zinkernagel. R-M, Haller. O, Eckert. J, Deplazes. P, 2008.** Manuel du poche de bactériologie médicale ; traduction de la 11^{ème} édition allemande : Flammarion, Paris, P : 258, 292-293.

-L-

- **Le Minor. L, Veron.M, 1989.** Bactériologie médicale ; 2^{ème} édition : Flammarion, Paris. , P : 274, 389-391, 824-826.

-N-

- **Nauciel. C, 2000.** Bactériologie médicale ; 1^{ère} édition : Masson, Paris, P : 59-67,125-146.
- **Nauciel .C, Vildé. J-L, 2007.** Bactériologie médicale ; 2^{ème} édition : Elsevier Masson, Paris, P : 49,56-59.

-P-

- **Prescott. L-M, Harley. J-P, Klein. D-A, Willey. J-M, Sherwood. L-M, Woolverton. C-J, 2010.** Microbiologie ; 3^{ème} édition : De boeck, P : 339.

-R-

- **Rahal. K, Benslimani. A, Tali-Maamar. H, Missoum. M- F. K, Aboun. A, Ammari. H, 2014.** Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale, Médecine humaine et vétérinaire, 7^{ème} édition.
- **Regnault. J-P, 1990.** Microbiologie générale ; 3^{ème} trimestre : Décarie Montréal, P : 446.

SITES INTERNET

LES SITES INTERNET

-C-

- http://www.cclinparisnord.org/ACTU_DIVERS/actualite.html
CENTRE DE COORDINATION DE LA LUTTE CONTRE LES INFECTIONS NOSOCOMIALE C-CLIN, 2011.
- www.cclinparisnord.org/REGION/NPC/EPC190313/Grandbastien190313.pdf
CENTRE DE COORDINATION DE LA LUTTE CONTRE LES INFECTIONS NOSOCOMIALE (CCLIN), 2013. Les recommandations Françaises pour la gestion autour d'un patient porteur d'EPC pour prévenir la diffusion de cette Bactérie Hautement Résistante aux antibiotiques émergente (BHRe).
- www.cclin-arlin.fr/nosobase/recommandations/2016_DetectionEPC_CNR
CENTRE DE COORDINATION DE LA LUTTE CONTRE LES INFECTIONS NOSOCOMIALE ARLIN (CCLIN-ARLIN)
Bulletin Cclin-Arlin n°1, janvier 2016. Prise en charge des patients porteurs de BHRe en Ehpad.
- <http://www.sante.gouv.fr/cclinvest2008>
CENTRE DE COORDINATION DE LA LUTTE CONTRE LES INFECTIONS NOSOCOMIALES DE L'EST (CCLIN EST), 2008. Prise en charge d'une épidémie à ERG (Entérocoque résistant aux glycopeptides).
- <http://www.cclinouest.com/>
CENTRE DE COORDINATION DE LA LUTTE CONTRE LES INFECTIONS NOSOCOMIALE DE L'OUEST (CCLIN Ouest), 2011. Précautions complémentaires en cas de Bactéries hautement résistantes à portage digestif, P : 1-2.
- www.cdc.gov/hai/organisms/cre/index.html
CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2009. Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemaseproducing Enterobacteriaceae in acute care facilities. MMWR Morbidity and mortality weekly report, vol: 58, P: 256-260.
- <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>
CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2013. Us department of health and human service. Antibiotic resistance threats in the United States.
- <https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/index.html>
CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION CDC, 2014. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in Healthcare Settings.
- http://www.sfm-microbiologie.org/page/page/showpage/page_id/90.html
COMITE DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIETE FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE (CA-SFM), Janvier 2012. La detection de la production des Carbapénèmases chez les Entérobactéries, P : 56-57.

- <http://www.inspq.qc.ca/pdf/>
COMITE SUR LES INFECTIONS NOSOCOMIALES DU QUEBEC (CINQ), Octobre 2010. Prévention et contrôle de la transmission des entérobactéries productrices de carbapénémases dans les milieux de soins aigus du Québec, Institut national de santé publique du Québec.

-E-

- <http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-NE>
EUROPEAN ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE SYSTEM (EARSS), 2010.
- http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2009
EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC)/EMEA. Joint Technical Report. The bacterial challenge: time to react. 2009.
- http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf
EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST), décembre 2012. Giske.C-G, Martinez-Martinez. L, Cantón. F, Stefani. S, Skov. R, Glupczynski. Y, Nordmann. P, Wootton. M, Miriagou. V, SkovSimonsen. G, Zemlickova. H, Cohen-Stuart. J and Gniadkowski.M. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, P: 1-47.

-H-

- http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2581332/fr/sivextro-tedizolide-antibiotique-de-la-classe-des-oxazolidones
HAUTE AUTORITE DE SANTE (HAS), Novembre 2015. Orbactiv (oritavancine), antibiotique de la classe des glycopeptides.
- <http://www.has-sante.fr/explore.cgi/hcspr2010-bmrimport>
HAUT CONSEIL DE LA SANTE PUBLIQUE (HCSP), 2010. Commission spécialisée sécurité des patients : infections nosocomiales et autres événements indésirables liés aux soins et aux pratiques, 2010. Maîtrise de la diffusion des bactéries multirésistantes aux antibiotiques importées en France par des patients rapatriés ou ayant des antécédents d'hospitalisation à l'étranger.
- <http://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=372>
HAUT CONSEIL DE LA SANTE PUBLIQUE (HCSP), juillet 2013. Prévention de la transmission croisée des Bactéries Hautement Résistantes aux antibiotiques émergents (BHRe), p : 77.

-I-

- <http://www.inspq.qc.ca>
INSTITUT NATIONAL DE SANTÉ PUBLIQUE DU QUÉBEC (INSPQ), 2015. Mesures de prévention et contrôle de la transmission des bacilles Gram négatif multirésistants dans les milieux de soins aigus au Québec, Comité sur les infections nosocomiales du Québec (CINQ), p : 16.

- <http://www.inspq.qc.ca>
INSTITUT NATIONAL DE SANTÉ PUBLIQUE DU QUÉBEC (INSPQ), novembre 2016. Entérobactéries productrices de carbapénémases et autres bacilles Gram négatif multi résistants : mesures intérimaires de prévention et de contrôle pour les milieux d'hébergement et de soins de longue durée. Comité sur les infections nosocomiales du Québec.
 - <http://www.cclinparisnord.org/CLIN/jourCLIN2007/Veax.pdf>
INSITUT DE VEILLE SANITAIRE (InVS), 2007. Bactéries hautement résistantes émergentes (BHRe) état des lieux dans le monde et en France.
 - <http://www.invs.sante.fr>
INSITUT DE VEILLE SANITAIRE (InVS), 2012. Publications et outils/ Rapports Publications et outils/ Rapports et synthèses/ Maladies infectieuses/ Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti infectieux en établissements de sante France, mai-juin 2012.
 - <http://invs.santepubliquefrance.fr/fr>
INSTITUT DE VEILLE SANITAIRE (InVS), novembre 2013. Alerte sur la résistance aux antibiotiques des entérobactéries en France : diffusion des entérobactéries productrices de bêtalactamases à spectre étendu (BLSE) et émergence des entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC), P : 1-5.
 - <http://www.cclinparisnord.org/CLIN/jourCLIN2014/Veax.pdf>
INSITUT DE VEILLE SANITAIRE (InVS), 2014. Bactéries hautement résistantes émergentes (BHRe) état des lieux dans le monde et en France.
 - <http://invs.santepubliquefrance.fr/fr/>
INSTITUT DE VEILLE SANITAIRE (InVS), mars 2015. Situation épidémiologique épisodes impliquant des entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC) en France.
- P-
- <http://canadienssante.gc.ca/publications/drugs-products-medicaments-produits/antibiotic-resistance-antibiotique/antimicrobial-surveillance-antimicrobioresistance-fra-php>
PROGRAMME CANADIEN DE SURVEILLANCE DES INFECTIONS NOSOCOMIALES (PCSIN), 2015. Surveillance des entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) chez les patients hospitalisés dans les hôpitaux canadiens de soins de courtes durée participants au PCSIN-Résultats pour l'année 2015.
- R-
- <http://www.sante.dz/aarn>
RESEAU ALGERIEN DE SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES BACTERIS AUS ANTIBIOTIQUES (AARN), 2009. Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 10^{ème} rapport d'évaluation (septembre 2007à décembre 2008).

- <http://www.sante.dz/aarn>
RESEAU ALGERIEN DE SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES BACTERIS AUS ANTIBIOTIQUES (AARN), 2010. Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 11^{ème} rapport d'évaluation (janvier à décembre 2009).
 - <http://www.sante.dz/aarn>
RESEAU ALGERIEN DE SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES BACTERIS AUS ANTIBIOTIQUES (AARN), 2011. Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 12^{ème} rapport d'évaluation (janvier à décembre 2010).
 - <http://www.sante.dz/aarn>
RESEAU ALGERIEN DE SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES BACTERIS AUS ANTIBIOTIQUES (AARN), 2012. Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 13^{ème} rapport d'évaluation (janvier à décembre 2011).
 - <http://www.sante.dz/aarn>
RESEAU ALGERIEN DE SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES BACTERIS AUS ANTIBIOTIQUES (AARN), 2015. Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 16^{ème} rapport d'évaluation (janvier à décembre 2014).
 - <http://www.sante.dz/aarn>
RESEAU ALGERIEN DE SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES BACTERIS AUS ANTIBIOTIQUES (AARN), 2016. Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 17^{ème} rapport d'évaluation (janvier à décembre 2015).
 - <http://www.sante.dz/aarn>
RESEAU ALGERIEN DE SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES BACTERIS AUS ANTIBIOTIQUES (AARN), 2017. Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 18^{ème} rapport d'évaluation (janvier à décembre 2016).
- V-
- <http://www.vidal.fr/fiches-medicaments>
VIDAL : fiches des médicaments, 2013.

ANNEXES

PLAN DES ANNEXES

ANNEXE I : Précautions.....	I
ANNEXE II : Appareillage.....	II
ANNEXE III : Matériel non biologique	III
ANNEXE IV : Examens réalisés et préparation des milieux.....	VIII
ANNEXE V: Galeries d'identification : classique, API 20 E et API 20 Strep.....	XII
ANNEXE VI : Recherche de la résistance aux antibiotiques.....	XIX
ANNEXE VII: Prélèvements effectués au niveau de l'environnement.....	XXIV
ANNEXE VIII : Entérocoques et antibiorésistance.....	XXV

ANNEXE I : PRECAUTIONS

Principes généraux de la prévention de la transmission croisée et du risque épidémique :

Les précautions à appliquer pour minimiser le risque de diffusion des micro-organismes doivent être pragmatiques et adaptées à la situation épidémiologique. Ainsi trois niveaux de recommandations sont définis pour maîtriser ce risque représenté dans le graphe suivant :

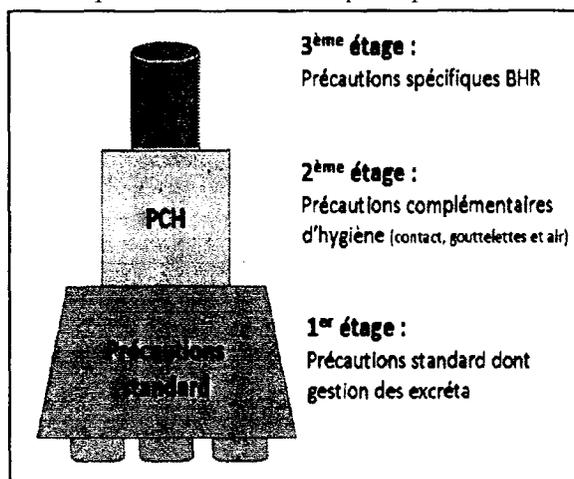


Figure : Représentation graphique des différents niveaux de mesures à appliquer pour maîtriser la diffusion de la transmission croisée

*Précautions standard (PS) en routine :

- Hygiène des mains.
- Occasions du port des gants, changés entre chaque soin, Hygiène des mains au retrait.
- Protection de la tenue professionnelle.
- Gestion des excréta.

Importance de ces mesures en :

- Unité de soins.
- Mais aussi :
 - Sur les plateaux techniques (imagerie, bloc, soins continus post-opératoires...)
 - Lieux de croisement des patients à forte densité de soins.
 - Pour tous les intervenants transversaux (médecins, kinésithérapeutes, brancardiers, ambulanciers...).

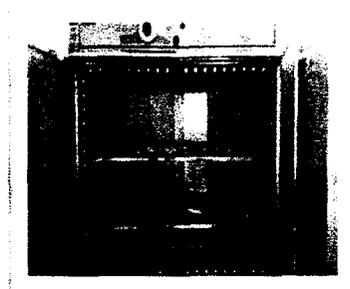
*Précautions complémentaires d'hygiène :

- Chambre individuelle.
- Signalement pour tous les intervenants (porte de la chambre et dossier médical)
- Soins personnalisés et regroupés.
- Petit matériel dédié dans la chambre.
- Selon le cas, renforcement de la maîtrise de l'environnement.

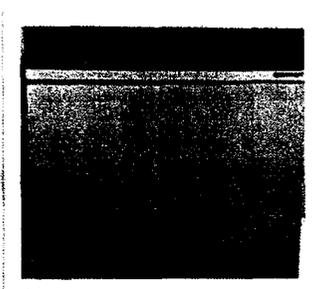
*Précautions spécifiques BHR :

- Identification des patients à risque et dépistage à la recherche du portage de BHR.
- Application des PCH avec un très haut niveau de respect.
- Organisation spécifique des soins (allant jusqu'à la mise en place d'équipe dédiées).
- Contrôle de la prescription des antibiotiques : recours systématique au référent antibiotique.

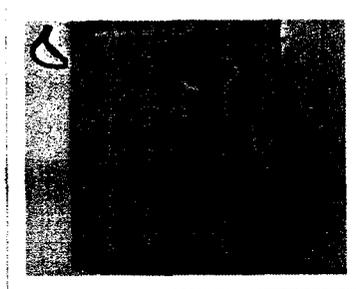
ANNEXE II : APPAREILLAGE



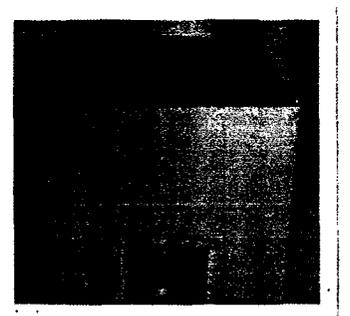
Séchoir



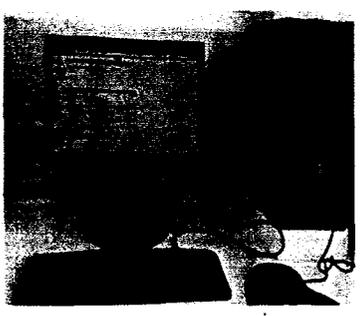
Etuve à 35-37°C



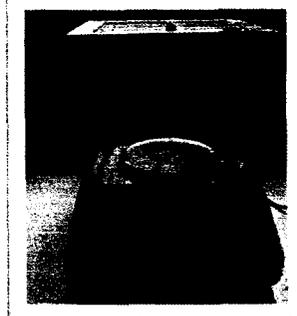
Densitomètre



Bain-Marie



Ordinateur



Balance



Réfrigérateur



Microscope optique



Bec bunsen

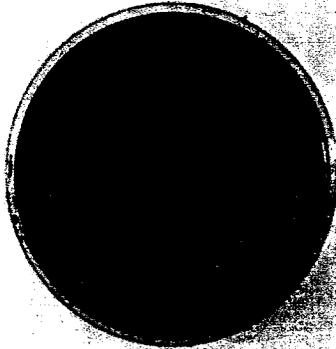
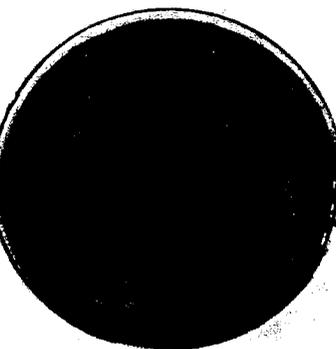
ANNEXE III : MATERIEL NON BIOLOGIQUE

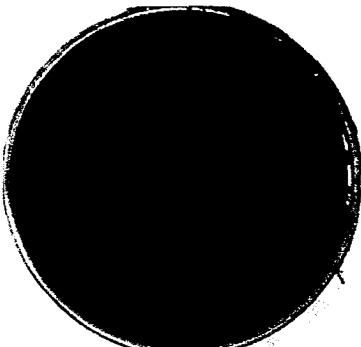
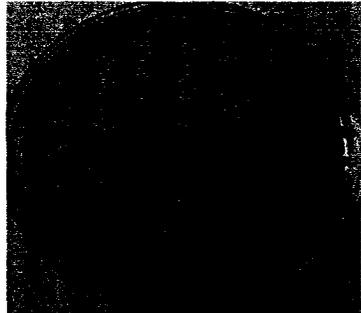
Fournitures	
Blouse de laboratoire	Huile de vaseline stérile
Bocal	Liquide désinfectant
Bougie	Marqueurs
Briquet	Pied à coulisse métallique
Distributeur de disques d'antibiotique	Pinces
Eau physiologique stérile	Poires
Eau distillée stérile	Portoirs pour tubes
Eau oxygénée	Seringues stériles
Ecouvillons sec stériles	Solution hydro-alcoolique
Gants	Huile à l'immersion

Verrerie
Boîte de pétri (90mm de diamètre) en plastique
Lames et lamelles
Tubes à essais stériles
Tubes sec
Pipettes pasteurs stériles

MILIEUX DE CULTURE, COLORANTS ET REACTIFS D'IDENTIFICATION

MILIEUX DE CULTURE :

Milieu	Composition	Utilisation
<p>Gélose nutritive</p> 	<p>-Extrait de viande.....1 g -Extrait de levure.....2.5 g -Peptone.....5 g -Chlorure de sodium.....5 g -Agar.....15 g</p> <p>PH=7.0</p>	<p>Milieu d'isolement des bactéries non exigeantes</p>
<p>BCP (pourpre de bromocrésol)</p> 	<p>-Peptone.....5g -Extrait de viande de bœuf.....3g -Lactose.....10g -Pourpre de bromocrésol..... 25 mg -Agar.....15 g</p> <p>PH = 6,8</p>	<p>Milieu sélectif des BGN</p>
<p>Gélose au sang frais</p> 	<p>-Mélange spécial de peptone....23 g -Amidon.....1 g -NaCl.....5 g -Agar.....10 g -Sang de mouton.....50 ml</p> <p>PH=7.3</p>	<p>Milieu d'isolement des Streptocoques</p>

<p>Gélose au sang cuit</p> 	<ul style="list-style-type: none"> -Peptone trypsique de caséine.....7.5 g -Peptone pepsique de viande.....7.5 g -Amidon de maïs.....1 g -Hydrogénophosphate de potassium.4g -Dihydrogénophosphate de potassium1g - NaCl.....5 g -Hémoglobine10 g -Agar10 g <p style="text-align: center;">PH=7.2</p>	<p>Milieu d'isolement des bactéries exigeantes</p>
<p>Gélose Muller Hinton</p> 	<ul style="list-style-type: none"> -Infusion de viande de bœuf ...300 g -Amidon de maïs.....1 g -Peptone de caséine.....17.5 g -Agar.....17 g <p style="text-align: center;">PH=7.4</p>	<p>Milieu pour antibiogramme</p>
<p>Milieu de conservation</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Peptone.....10 g - Extrait de viande.....5 g - Chlorure de sodium.....5 g - Agar.....10 g <p style="text-align: center;">PH=7.3</p>	<p>Milieu de conservation des bactéries</p>
<p>Milieu TSI (triple sugar iron)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Peptones de caséine15g - Peptones de viande.....5g - Extraits de viande.....3g - Peptones de levure.....3g - NaCl.....5g - Lactose.....10g - Saccharose.....10g - Glucose.....1g - Citrate ammoniacal de Fer (III).. 0.5g - Thiosulfate de sodium.....0.5g - Rouge de phénol.....0.024g - Agar.....12g 	<p>l'identification des Entérobactéries (réduction de sulfate)</p>

<p>MEVAG (Milieu d'étude de la voie d'attaque des glucides)</p> 	<p>- Macération de viande (1 kg / l) 25ml - Chlorure de sodium.....5.2 - Agar.....3.12 - Rouge de phénol.....0.035</p>	<p>Mise en évidence de la voie d'attaque du glucose</p>
<p>Eau peptonée exempte d'indole</p> 	<p>-Peptone exempte d'indole10 g - Chlorure de sodium..... 5g PH = 7,2</p>	<p>Production d'indole par les Entérobactéries</p>
<p>Citrate de Simmons</p> 	<p>-Citrate de sodium.....1g -Bleu de bromothymol.....0.08g -Chlorure de sodium.....5.0g -Sulfate de magnésium.....0.2g -Hydrogénophosphate de potassium..1g -Dihydrogénophosphate d'ammonium1g -Agar-agar.....15g PH= 6.9</p>	<p>Mise en évidence des Entérobactéries possédantes une enzyme citrate perméase</p>
<p>Clark et lubs</p> 	<p>- Peptone..... 5 g - Glucose..... 5 g - Hydrogénophosphate de potassium 5 g - Eau distillée 1 l PH = 7.5</p>	<p>Mise en évidence des voies fermentaires des Entérobactéries</p>

***COLORANTS :**

- Violet de gentiane
- Lugol
- Fuschine
- Alcool éthylique 95°

REACTIFS D'IDENTIFICATION :

Réactif	Composition	Utilisation
KOVACS	-P-diméthylaminobenzaldéhyde... 5 g - Alcool iso-amylque.....75 ml - Acide chlorhydrique pur.....25 ml	Mise en évidence de la production d'indole
NIN	- Ninhydrine - 2-méthoxyéthanol	Mise en évidence de l'hydrolyse d'acide hippurique
VP I	-Naphtol.....60 g -Ethanol.....1 cm ³	Recherche de l'acétoïne
VP II	-Solution aqueuse d'hydroxyde de potassium 4 ml.cm ³ (10%)	Recherche de l'acétoïne
ZYM A	-Trisris Hydroxy-méthyl-amino-méthane -Lauryl sulfate -HCl	/
ZYM B	-Fast blue BB -2-méthoxy-éthanol	/

ANNEXE IV: EXAMENS REALISES ET PREPARATION DES MILIEUX***Examen microscopique à l'état frais****Technique :**

Déposer sur une lame propre, une petite goutte d'eau physiologique stérile, puis prélever une fraction de colonie sur gélose, et faire une suspension dans la goutte d'eau en incorporant progressivement l'inoculum et en remuant très délicatement.

Recouvrir la lame par une lamelle, puis observer à l'objectif X40.

Examen microscopique après coloration de Gram*Technique :**

- Réalisation du frottis : déposer sur une lame propre, une petite goutte d'eau physiologique stérile, puis prélever à l'aide d'une pipette pasteur une parcelle de la culture, mélanger afin d'obtenir une suspension homogène, étaler avec des mouvements circulaires du centre vers la périphérie. Sécher et fixer le frottis au-dessus de la flamme du bec bunsen.

- Coloration du frottis : par le violet de gentiane pendant une minute, rincer avec l'eau du robinet.

- Mordantage : recouvrir la lame par le réactif du lugol pendant 30 à 45 secondes, rincer avec l'eau du robinet.

- Décoloration : verser l'alcool goutte à goutte sur la lame inclinée puis rincer à l'eau du robinet immédiatement.

- Contre coloration : par la fuschine diluée pendant 30 secondes à une minute.

- Rincer à l'eau du robinet et sécher entre deux feuilles de papier buvard.

- Observer à l'objectif X100 à l'immersion, à pleine lumière.

Recherche de l'oxydase*Principe :**

Tous les germes aérobies et aérobies facultatifs possèdent un cytochrome oxydase, enzyme réagissant directement avec l'oxygène dans les derniers stades de la respiration cellulaire oxydative. Sa mise en évidence par la technique utilisée n'est possible que si le germe possède en même temps le cytochrome C.

L'indicateur employé est la N. diméthyl-para phénylène diamine qui est oxydée et donne une semi quinone colorée en rouge selon la réaction :

**Technique :**

Prendre un disque de papier buvard déjà imprégné du réactif, l'imbiber d'un peu d'eau physiologique et à l'aide d'une pipette pasteur fermée, prendre un peu de culture à partir d'une colonie, la déposer sur le disque.

Lecture :

- Si apparition immédiate d'une coloration rose violacée : oxydase (+)

- Si pas de coloration : oxydase (-)

Recherche de la catalase*Technique :**

- Déposer une goutte d'eau oxygénée sur une lame, y déposer, à l'aide d'une pipette pasteur stérile, une colonie isolée de la souche à tester.
- Observer l'apparition des bulles.

Lecture :

- Formation de bulles d'air (production d'oxygène O₂ provenant de la dégradation d'H₂O₂) : souche catalase positive (+).
- Absence de bulles d'air (absence de production d'oxygène O₂ provenant de la dégradation d'H₂O₂) : souche catalase négative (-).

Isolement sur gélose nutritive (ou GSC) additionnée de 6.5% de NaCl*Préparation du milieu :**

- Peser 3.8 g de poudre titrée de gélose nutritive ou de columbia (GSC). Diluer dans 100ml d'eau distillée stérile ;
- Ajouter à cette solution 6.5 g de poudre de NaCl pour obtenir une concentration de 6.5% NaCl, bien homogénéiser ;
- Ajouter de 10 ml de sang dans le cas de la préparation de la GSC.
- Verser dans une boîte de Pétri en respectant une épaisseur d'environ 4 mm soit 20 ml ;
- Laisser refroidir ;
- Sécher avant l'emploi.

Mode opératoire :Inoculation :

Inoculer sur chaque boîte :

- Un témoin positif (T+) : souche d'*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (pousse dans des conditions hostiles de 6.5% de NaCl).
 - Un témoin négatif (T-) : souche d'*E. coli* ATCC25922 (ne pousse pas dans des conditions hostiles de 6.5% de NaCl).
 - La souche à tester (diviser la boîte en portion de fromage s'il y a plusieurs souches à tester).
- Incuber à 35-37°C pendant 18 à 24 h.

Lecture et interprétation :

- Le test est valide, s'il y a poussé du (T+) et pas de poussé du (T-).
- Souche(s) testée(s) : la présence d'une culture est le signe de la présence d'un Entérocoque (un test positif), à confirmer par les tests d'identification biochimiques.

Chauffage 30 min à 60°C et à 10°C*Mode opératoire :**Préparation de l'inoculum :

- A partir d'une culture pure de 18 à 24 h, sur milieu d'isolement approprié, prélever à l'aide de deux écouvillons stériles quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger les deux écouvillons dans deux tubes contenant 5 à 10 ml du milieu d'enrichissement BHIB (Brain Heart Infusion Broth).
- Bien homogénéiser les suspensions bactériennes, elles doivent être riches (milieux troubles).

- Mettre les suspensions dans un bain-marie pendant 30 min, ajuster le bain-marie à 60°C pour la 1^{ère}, et à 10°C pour la deuxième.

Ensemencement :

- Ensemencer chaque suspension, par la technique de trois cadrans à l'aide d'un écouvillon stérile, sur GN et sur un milieu à base de sang (GSC).
- Incuber à 37°C pendant 18 à 24 h.
- Incuber aussi les suspensions utilisées dans les mêmes conditions.

Lecture et interprétation :

- Suspension troubles : présence de bactéries.
- Une poussée sur les milieux de culture (GN ou GSC) est le signe d'un test positif (les souches testées ont résisté à un chauffage de 60°C et de 10°C pendant 30 min.

***Ré-isolement sur milieu tellurite de potassium**

Préparation du milieu :

- La gélose nutritive est liquéfiée par ébullition puis maintenue à la température de surfusion (45°C) jusqu'au moment de l'emploi.
- Verser une ampoule de tellurite de potassium dans un flacon de 180 ml de gélose nutritive, bien homogénéiser ;
- Verser ce mélange dans une boîte de Pétri en respectant une épaisseur d'environ 4 mm soit 20 ml ;
- Laisser refroidir ;
- Sécher avant l'emploi.

Mode opératoire :

Ensemencement :

Sur chaque boîte ensemencer :

- Un témoin positif : *E. faecalis* ATCC 29212 (résistant au tellurite).
- Un témoin négatif : *E. coli* ATCC 25922 (sensible au tellurite).
- La souche à tester (si on a plusieurs souches à tester, on peut diviser la boîte en portion de fromage).
- Incuber à 35-37°C pendant 18-24h.

Lecture et interprétation :

- T(+) : colonies noires.
 - T(-) : pas de colonies noires.
- } On peut valider le test
- Souche(s) testé(s) : l'apparition de colonies noires est le signe d'un test positif (présence d'*E. faecalis*) à confirmer par les tests d'identification biochimiques.

***Ré-isolement sur milieu MH additionné d'imipénème**

Préparation du milieu :

- Peser 4 mg de poudre titrée d'imipénème, la diluer dans 10 ml d'eau distillée stérile pour obtenir une concentration de 0.4 mg/ml (solution mère) ;
- A l'aide d'une seringue, prélever 1 ml de la solution mère et la diluer dans 9ml d'eau distillée stérile pour obtenir une concentration de 4 µg/ml ;
- Répartir 2 ml de la solution finale dans des boîte de Pétri ;

- Compléter chaque boîte avec 18 ml de gélose Mueller Hinton liquéfiée et homogénéiser délicatement, sans faire de bulles, le contenu des boîtes par des mouvements circulaires ;
- Laisser refroidir ;
- Sécher avant l'emploi.

Mode opératoire :

Ensemencement :

- Ensemencer par la technique de trois cadrans à l'aide d'un écouvillon sec stérile ou une pipette pasteur stérile.
- Incuber à 35-37°C pendant 18-24h.

Lecture et interprétation :

La présence d'une culture est en faveur d'*E. faecium* à confirmer par les tests d'identification biochimiques.

***Ré-isolement sur milieu MH additionné de vancomycine**

Préparation du milieu :

- Peser 8 mg de poudre titrée de vancomycine, la diluer dans 10 ml d'eau distillée stérile pour obtenir une concentration de 0.8 mg/ml (solution mère) ;
- A l'aide d'une seringue, prélever 1 ml de la solution mère et la diluer dans 9ml d'eau distillée stérile pour obtenir une concentration de 8 µg/ml ;
- Répartir 2 ml de la solution finale dans des boîtes de Pétri ;
- Compléter chaque boîte avec 18 ml de gélose Mueller Hinton liquéfiée et homogénéiser délicatement, sans faire de bulles, le contenu des boîtes par des mouvements circulaires ;
- Laisser refroidir ;
- Sécher avant l'emploi.

Mode opératoire :

Ensemencement :

- Ensemencer par la technique de trois cadrans à l'aide d'un écouvillon sec stérile ou une pipette Pasteur stérile.
- Incuber à 35-37°C pendant 18-24h.

Lecture et interprétation :

La présence d'une culture est en faveur d'ERG, à confirmer par les tests d'identification biochimiques.

ANNEXE V : GALERIES D'IDENTIFICATION

***Galerie classique :**

L'identification biochimique des Entérobactéries par les galeries classiques permet d'identifier les genres et les espèces en s'appuyant sur les caractères biochimiques.

Le tableau ci-dessous résume les différents tests réalisés par la galerie classique et leurs modes opératoires :

Tableau : Les différents tests biochimiques effectués dans la galerie classique avec leurs modes opératoires :

Tests réalisés	Principe	Mode opératoire avec les conditions de culture	Lecture
Test de TSI	Cette méthode permet de mettre en évidence d'une part la fermentation du glucose (avec ou sans dégagement de gaz), du lactose et du saccharose, et d'autre part la production d'hydrogène de sulfate H ₂ S. C'est un milieu rouge incliné dont le glucose présent dans le culot est attaqué par voie fermentaire entraînant une acidification du milieu avec ou sans production de gaz. Sur la pente, le lactose et le saccharose seront alors oxydés et fermentés. La production de gaz se manifeste par un noircissement du milieu.	Ensemencer quelques gouttes de la suspension bactérienne de la souche à tester par des stries serrées sur la pente et en réalisant une pique centrale dans le culot, remettre le bouchon du tube sans le revisser, incubation 24h à 35°C.	- Lactose saccharose+ : virage de la pente au jaune - Glucose + : culot jaune - H ₂ S+ : noircissement du milieu dans la zone joignant la pente et le culot - Production de gaz : décollement de la gélose.
Test de l'étude de la voie d'attaque des glucides	Les bactéries attaquent les glucides soit par voie oxydative ou fermentaire, soit les deux à la fois. Le milieu utilisé est le MEVAG-HUGS et LEIFSON qui contient le sucre étudié et le rouge de phénol.	Au moment de l'emploi, régénérer le milieu en plaçant les tubes 15 minutes au bain-marie. Laisser refroidir puis ensemer deux tubes par pique centrale à partir d'un bouillon. Mettre en évidence le rôle d'oxygène en recouvrant l'un des deux tubes avec la vaseline stérile, incubation 24h à 35°C.	- Si seule la partie supérieure de tube sans huile de vaseline est acidifiée : le germe est oxydatif. - S'il y a acidification des deux tubes : le germe est fermentaire.
Test de citrate de Simmons	Ce milieu ne contient que le citrate de sodium seul source de carbone. Seules les bactéries possédantes une enzyme citrate perméase seront capables de se développer sur ce milieu.	Ensemencer quelques gouttes de la suspension bactérienne à tester par stries sur la pente du milieu, incubation 24h à 35°C.	- Présence d'une coloration bleue : réaction positive - pas de virage (coloration verte) : réaction négative.
Test de l'ONPG	Ce test permet de mettre en évidence la bêta-galactosidase qui dégrade l'ONPG qui possède une structure analogue au lactose.	Préparer une suspension dense de la culture bactérienne à étudier dans un tube à essai stérile contenant 0.5 ml d'eau physiologique puis ajouter un disque d'ONPG, incubation 24h à 35°C.	- coloration jaune citron : ONPG+ - pas de coloration : ONPG-

Voie de fermentation de glucose	Ce test permet une différenciation entre la fermentation par voie des acides mixtes (RM) ou par voie de butylène glycolique (VP)	Ensemencer quelques gouttes de la suspension bactérienne de la souche à étudier sur le milieu Clark et Lubs puis incubé 24h à 35°C. Après incubation, verser quelques gouttes de VP I et de VPII dans le tube et laisser régir pendant 10 minutes.	-Coloration rouge : VP+ -Pas de coloration : VP-
Test de production d'indole	L'indole est le produit de la désamination puis l'hydrolyse du tryptophane.	Ensemencer la culture bactérienne dans de l'eau peptonée exempte d'indole, incubation 24h à 35°C.	-Après addition du réactif du Kovacs, s'il y'a formation d'un anneau rouge à la surface, la réaction est positive.
Recherche des décarboxylases (ODC, LDC, ADH)	Les décarboxylases scindent les acides aminés entraînant la formation de l'amine correspondant avec libération de CO ₂ il s'agit d'enzymes dont la synthèse est favorisée par un PH acide (3.5-5.5) et des conditions d'anaérobiose.	Ce test est réalisé avec le milieu Moeller réparti dans quatre tubes à hémolyse différents : -le 1 ^{er} tube constitue le témoin, il contient du glucose et du pourpre de bromocrésol comme indicateur de PH. -les autres tubes contiennent en plus du milieu témoin un des trois acides aminés suivants : Arginine, Lysine ou l'Ornithine. Après ensemencement, 1 ml de vaseline stérile est ajouté dans chaque tube incubé à 35°C pendant 24h.	- La réaction est positive lorsque le témoin vire au jaune (acidification du milieu due à l'utilisation du glucose). - Les tubes contenant les acides aminés restent violet (alcalinisation). - La réaction est négative lorsque les tubes contenant les acides aminés et le témoin virent au jaune.

***GALERIE API 20 E :**

API 20 E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 20 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

Principe

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

Mode opératoire**Préparation de l'inoculum**

Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85 % Medium (5 ml) ou une ampoule d'API Suspension Medium (5 ml), ou utiliser un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile ou d'eau distillée stérile, sans additif. A l'aide d'une pipette, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures). Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu. Cette suspension doit être utilisée extemporanément

Inoculation de la galerie

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

- pour les tests CIT, VP et GEL, remplir tube et cupule,
- pour les autres tests, remplir uniquement les tubes (et non les cupules),
- pour les tests : ADH, LDC, ODC, H₂S, URE créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.

*Refermer la boîte d'incubation.

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

Lecture de la galerie

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

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

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

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

- Ré-incuber la galerie 24 heures (± 2 heures) de plus sans rajouter les réactifs.
- Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs

Tests	Réactions/Enzymes	Réactifs	Résultats	
			Négative	Positive
ONPG	β -galactosidase (Ortho nitrophényl- β d Galactopyranosidase)	/	incolore	jaune
ADH	Arginine deshydrogenase	/	jaune	Rouge/orangé
LDC	Lysine décarboxylase	/	jaune	Rouge/orangé
ODC	Ornithine décarboxylase	/	jaune	Rouge/orangé
CIT	Utilisation du citrate	/	vert pâle / jaune	bleu-vert / bleu
H₂S	Production d'H ₂ S	/	incolore / grisâtre	dépôt noir / fin liseré
URE	Uréase	/	jaune	Rouge/orangé
TDA	Tryptophane désaminase	réactif TDA	jaune	marron- rougeâtre
IND	Production d'indole	réactif JAMES	incolore vert pâle / jaune	rose
VP	Production d'acétoïne (voges proskauer)	VP I+VP II	incolore	Rose-rouge
GEL	Gélatinase (gelatine)	/	non diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	Fermentation / oxydation (glucose)	/	bleu / bleu-vert	jaune / jaune gris
MAN	Fermentation / oxydation (mannitol)	/	bleu / bleu-vert	jaune
INO	Fermentation / oxydation (inositol)	/		
SOR	Fermentation / oxydation (sorbitol)	/		
RHA	Fermentation / oxydation (rhamnose)	/		
SAC	Fermentation / oxydation (saccharose)	/		
MEL	Fermentation / oxydation (melibiose)	/		
AMY	Fermentation / oxydation (amygdaline)	/		
ARA	Fermentation / oxydation (arabinose)	/		

Interprétation

L'identification est obtenue à partir du profil numérique.

*Détermination du profil numérique : sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun.

La galerie API 20 E comportant 20 tests, en additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres.

*Identification : elle est réalisée à partir de la base de données (V4.1)

-à l'aide du catalogue analytique : rechercher le profil numérique dans la liste des profils.

-à l'aide du logiciel d'identification **apiweb TM** : entrer manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres.

***GALERIE API 20 STREP :**

API 20 Strep est un système standardisé associant 20 tests biochimiques qui présentent un grand pouvoir discriminant. Il permet de faire un diagnostic de groupe ou d'espèce pour la plupart des Streptocoques, Entérocoques et pour les germes apparentés les plus courants.

Principe

La galerie API 20 Strep comporte 20 microtubes contenant les substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activités enzymatiques ou de fermentation de sucres. Les tests enzymatiques sont inoculés avec une suspension dense, réalisée à partir d'une culture pure, qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests de fermentation sont inoculés avec un milieu enrichi (contenant un indicateur de pH) qui réhydrate les sucres.

La fermentation des carbohydrates entraîne une acidification se traduisant par un virage spontané de l'indicateur coloré. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

Mode opératoire

Préparation de l'inoculum

Ouvrir une ampoule d'API Suspension Medium (2 ml) ou utiliser un tube contenant 2 ml d'eau distillée sans additif. A l'aide d'un écouvillon, prélever toute la culture préalablement préparée. Réaliser une suspension très dense : opacité supérieure à 4 de Mc Farland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

Inoculation de la galerie

*Dans la première moitié de la galerie (tests VP à ADH) répartir la suspension précédente en évitant la formation de bulles (pour cela, incliner la boîte d'incubation vers l'avant et placer la pointe de la pipette sur le côté de la cupule) :

-pour les tests VP à LAP : environ 100 µl dans chaque cupule.- pour le test ADH : remplir uniquement le tube.

*Dans la deuxième moitié de la galerie (tests RIB à GLYG) :

- ouvrir une ampoule d'API GP Medium y transférer le reste de la suspension, soit 0,5 ml au minimum. Bien homogénéiser.

- répartir cette nouvelle suspension dans les tubes uniquement.

*Remplir les cupules des tests soulignés ADH à GLYG avec de l'huile de paraffine en formant un ménisque convexe.

*Refermer la boîte d'incubation.

*Incuber à 36°C ± 2°C en aérobiose pendant 4H00 - 4H30 pour une première lecture et 24 heures (± 2 heures) si nécessaire pour une deuxième lecture.

Lecture et interprétation

Lecture de la galerie

Après 4 heures d'incubation :

*Ajouter les réactifs :

- test VP : 1 goutte de VP 1 et VP 2.

- test HIP : 2 gouttes de NIN.

- tests PYRA, DGAL, β GUR, β GAL, PAL, LAP : 1 goutte de ZYM A et 1 goutte de ZYM B.

Attendre 10 minutes, puis lire toutes les réactions en se référant au tableau de lecture.

Tests	Réactions/Enzymes	Réactifs	Résultats	
			Négative	Positive
VP	production d'acétoïne (vogesproskauer)	VP I+VP II	incolore	Rose-rouge
HIP	hydrolyse (acide hippurique)	NIN	Incolore/bleu pâle gris-bleuté	Bleu foncé violet
ESC	hydrolyse β-glucosidase (esculine)	/	Incolore ou jaune pâle gris clair	noir
PYR A	pyrrolidonylarylamidase	ZYM A+ZYM B	Incolore ou orange très pâle	orange
αGAL	α-galactosidase	ZYM A+ZYM B	Incolore	violet
βGUR	β-glucuronidase	ZYM A+ZYM B	Incolore	bleu
βGAL	β-galactosidase	ZYM A+ZYM B	Incolore ou Violet très pâle	violet
PAL	phosphatase alcaline	ZYM A+ZYM B	Incolore ou Violet très pâle	Violet
LAP	leucine aminopeptidase	ZYM A+ZYM B	Incolore	Orange
<u>ADH</u>	arginine deshydrogenase	/	jaune	rouge
<u>RIB</u>	acidification (ribose)	/	Rouge / orange	jaune
<u>ARA</u>	acidification (arabinose)	/		
<u>MAN</u>	acidification (mannitol)	/		
<u>SOR</u>	acidification (sorbitol)	/		
<u>LAC</u>	acidification (lactose)	/		
<u>TRE</u>	acidification (trehalose)	/		
<u>INU</u>	acidification (inuline)	/		
<u>RAF</u>	acidification (raffinose)	/		
<u>AMD</u>	acidification (amidon)	/		
<u>GLYG</u>	acidification (glycogène)	/		

Une ré incubation est nécessaire dans les cas suivants :

- profil inacceptable ou profil douteux ;

- si, pour le profil obtenu, la note suivante est indiquée : identification non valide avant 24 h d'incubation. Alors, relire après 24 heures les réactions ESC, ADH et RIB à GLYG sans relire les réactions enzymatiques (HIP, PYRA, DGAL, β GUR, β GAL, PAL, LAP) et VP.
Noter toutes les réactions sur la fiche de résultats.

Interprétation

L'identification est obtenue à partir du profil numérique.

***Détermination du profil numérique** : sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres qui constituent le profil numérique.

***Identification** : Elle est réalisée à partir de la base de données (V7.0)

- à l'aide du Catalogue Analytique : rechercher le profil numérique dans la liste des profils.

-à l'aide du logiciel d'identification **apiweb TM**: entrer manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres.

ANNEXE VI : RECHERCHE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES***Antibiogramme par méthode de dilution en milieu gélosé:**

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique. Il sert également :

- À la surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne ;
- À l'identification bactérienne par la mise en évidence de résistances naturelles.

Mode opératoire:Préparation de gélose:

- La gélose Mueller-Hinton fondue au bain-marie a été versée en boîtes de Petri sur une épaisseur de 4 mm.
- Séchées avant l'emploi.

Préparation de l'inoculum:

- A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, prélever à l'aide d'un écouvillon sec stérile 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 McF ou à une D.O. de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm. L'utilisation d'un densitomètre est fortement souhaitable.

Ensemencement :

- Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum.
- L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Petri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

Application des disques d'antibiotiques :

- Les disques d'antibiotique à tester sont déposés sur la gélose à l'aide d'une pince flambée, en appuyant doucement sur chaque disque pour assurer un contact uniforme avec le milieu et ne pas déplacer les disques après application.
- Les disques d'antibiotique doivent être espacés de 24mm, centre à centre.
- Incuber à 35-37°C pendant 24h.

Lecture et interprétation:

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.
- Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes.
- Classer la bactérie dans l'une des catégories « sensible, intermédiaire ou résistante ».

Détermination de la CMI, technique de dilution en gélose*Mode opératoire :**Préparation de la gélose :

- Le milieu Mueller-Hinton est liquéfié par ébullition puis maintenu à la température de surfusion (45°C) jusqu'au moment de l'emploi.

Préparation des boîtes de dilutions d'antibiotique :

-Peser 51,20 mg de poudre titrée d'antibiotique. Diluer dans le volume de solvant approprié pour obtenir une concentration stock de 5120 µg/ml (solution-mère).

-Procéder aux dilutions semi-logarithmiques de raison 2 (de demi en demi), dans l'eau distillée, jusqu'à la concentration finale de 1,25 µg/ml.

Schéma pour la préparation des dilutions d'antibiotique (K. Rahal et al 2014)

Etape	Concentration (µg/ml)	ATB (ml)	Diluant (ml)	Concentration intermédiaire	Concentration finale dans la gélose (µg/ml)
Solution mère	5120	/	/	5120	512
1	5120	2	2	2560	256
2	5120	1	3	1280	128
3	5120	1	7	640	64
4	640	2	2	320	32
5	640	1	3	160	16
6	640	1	7	80	8
7	80	2	2	40	4
8	80	1	3	20	2
9	80	1	7	10	1
10	10	2	2	5	0,5
11	10	1	3	2,5	0,25
12	10	1	7	1,25	0,125

-Répartir 2 ml de chaque dilution d'antibiotique, dans la boîte correspondante en procédant de la plus faible concentration à la concentration la plus élevée. Ne pas changer de pipette.

-Compléter chaque boîte avec 18 ml de milieu Mueller-Hinton liquéfié et homogénéiser délicatement, sans faire de bulle, le contenu des boîtes par des mouvements circulaires. La dilution obtenue (1/10ème) dans chaque boîte aboutit à une concentration finale allant de 512 µg/ml à 0,125 µg/ml. La gamme de dilution peut être étendue selon les valeurs souhaitées.

-Préparer une boîte témoin sans antibiotique en remplaçant le volume d'antibiotique par le même volume d'eau physiologique stérile.

-Après solidification, sécher les boîtes, couvercle en place, pendant 30 mn.

Préparation de l'inoculum bactérien:

-Préparer un inoculum standard à une turbidité de 0,5 MF, ce qui correspond à $1-2 \cdot 10^8$ CFU/ml en moyenne.

-Diluer l'inoculum au 1/10ème en eau physiologique.

Dépôt des spots bactériens:

-Déposer sous forme de spots à la surface de la gélose, 2µl par spot, de 5 à 8 mm.

-Déposer les spots dans les 15 mn suivant la préparation de l'inoculum.

-Pour chaque boîte ensemercer le témoin positif et le témoin négatif.

-Marquer la boîte de dilution d'antibiotique pour localiser et identifier chaque spot.

-Commencer par la boîte témoin, puis déposer les spots sur les différentes boîtes en allant de la plus faible concentration à la concentration la plus élevée. Terminer en appliquant les spots sur une 2^{ème} boîte témoin.

-Etaler une goutte de chaque souche testée, sur une gélose non sélective et incubé (détection des cultures mixtes, obtention d'une culture jeune).

Incubation:

-Laisser les boîtes à température ambiante, couvercle vers le haut, jusqu'à absorption de l'humidité (séchage des spots, pas plus de 30 mn).

-Renverser les boîtes et incubé à 35°C±2 pendant 16-20 heures.

Lecture des CMI:

-Placer les boîtes sur une surface sombre, non réfléchive

-Noter la CMI (la plus faible concentration d'antibiotique inhibant toute croissance bactérienne visible).

-Ne pas prendre en considération 2 colonies ou un léger film

-Si on note plus de 2 colonies persistantes ou si l'on constate une réapparition de la culture au-delà de la CMI, vérifier la pureté de l'inoculum et refaire le test.

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

-Classer la bactérie dans l'une des catégories « sensible, intermédiaire ou résistante ».

***Détermination de la CMI, technique de l'E-Test :**

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

Mode opératoire :

Préparation de la gélose :

-La gélose Mueller-Hinton fondue au bain-marie a été versée en boîtes de Petri sur une épaisseur de 4 mm, séchées avant l'emploi.

Préparation de l'inoculum :

Même méthode pour l'antibiogramme standard.

Ensemencement:

Même méthode pour l'antibiogramme standard.

Dépôt de la bandelette E-test:

-Prélever la bandelette à l'aide de pinces bactériologiques préalablement flambées au bec Bunsen ; le contact avec les pinces doit se faire au niveau de l'extrémité marquée E.

-Déposer la bandelette délicatement sur la surface gélosée, en commençant par l'extrémité correspondant aux concentrations les plus faibles de l'antibiotique testé puis en

progressant jusqu'aux concentrations les plus élevées. Eviter la formation de bulles d'air entre la gélose et la bandelette, une fois appliquée la bandelette ne peut être déplacée.

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

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

-Incuber à 35-37°C pendant 24h.

Lecture et interprétation:

-La CMI de l'antibiotique testé est lue à l'œil nu, boîte ouverte et bien éclairée.

-Elle correspond à la graduation, située à la jonction entre l'ellipse (dessinée par l'inhibition de la culture bactérienne) et la bandelette E-test.

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

-Classer la bactérie dans l'une des catégories « sensible, intermédiaire ou résistante ».

***Recherche de la bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE) chez les Entérobactéries:**

Technique :

La recherche de la BLSE se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme en déposant un disque d'amoxicilline+acide clavulanique (AMC 20/10µg) à 30mm centre à centre d'un disque de C3G (Céfotaxime : CTX 30µg ou Ceftriaxone : CRO 30µg). Incuber 18H à 35°C.

Lecture :

La production d'enzyme peut se traduire par l'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre les disques : AMC et C3G (CTX ou CRO)

En l'absence d'une image de synergie, la production de BLSE sera suspectée devant toute diminution du diamètre autour des disques de C3G à confirmer par le test de double disque.

Test de confirmation ou technique du double disque :

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).

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

Oter le disque d'AMC et le remplacer par un disque de C3G

Incuber la boîte 18 H à 35°C.

Lecture et interprétation :

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

NB : Un contrôle qualité est effectué pour chaque espèce bactérienne testée.

Ce contrôle 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.

Il est pratiqué en moyen d'une fois par semaine à chaque nouveau lot de Mueller Hinton et/ou d'antibiotique, réalisé pour les souches de références (ATCC *E. Coli* pour les EPC et *E. faecalis* pour les ERG) dans les mêmes conditions de l'antibiogramme standard.

ANNEXE VII : PRELEVEMENTS EFFECTUES AU NIVEAU DE L'ENVIRONNEMENT

	Site du prélèvement
Chambre « 1 »	Lit+Literie
	Commode
	Poignet de la porte
	Potence
	Poignet de la fenêtre
	Porte de la porte de sanitaire
	Poignet de robinet
	Interrupteur d'électricité
Chambre « 2 »	Poignet de la porte
	Porte de sanitaire+Poignet
	Lit+ Literie
	Murs
	Potence
Chambre « 3 »	Table
	Lit+Literie
	Potence
	Appareil d'oxygénothérapie
	Tuyaux + Appareil de respiration

ANNEXE VIII : ENTEROCOQUES ET ANTIBIORESISTANCE

Tableau : Entérocoques et antibiorésistance

Molécules	Nombres de souches		
	Résistantes	Sensibles	Non testées
Ampicilline (AMP)	13	0	7
Tétracycline (TCY)	4	3	13
Gentamycine haut niveau (GHN)	16	1	3
Streptomycine haut niveau (SHN)	14	0	6
Ciprofloxacine (CIP) ou Lévofloxacine (LVX)	8	0	12
Erythromycine (ERY)	16	0	4
Fosfomycine(FOS)	1	3	16
Chloramphénicol (CHL)	2	10	8
Quinupristine-Dalfopristine (QDF) ou Pristinamycine (PRI)	10	2	8
Rifampicine (RIF)	12	1	7
Vancomycine (VAN)	20	0	0
Teicoplanine (TEC)	19	1	0

Labri Nour El Houda

labripharmacie@gmail.com

Zerizer Fatma

fatima.zerizer@gmail.com

RESUME

Les bactéries hautement résistantes émergentes (BHRe) Entérobactéries productrices de carbapénèmases (EPC) et les Entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG) ont émergé rapidement dans le monde dès leur première apparition aux Etats-Unis, en effet, ces dix dernières années, nous avons constaté une prévalence croissante des BHRe en Algérie où les récentes données de résistance aux antibiotiques indiquent une situation inquiétante.

Dans le but de déterminer la situation des BHRe au niveau du CHU Blida, nous avons effectué une étude portant sur l'ensemble des BHRe isolées des différents types de prélèvements.

Ce travail a été réalisé au niveau de l'unité de microbiologie du laboratoire central du CHU de Blida, unité Frantz Fanon et s'est réparti en deux volets, une étude rétrospective étalée sur une période de six ans, allant de janvier 2011 à décembre 2016 et une étude prospective ayant duré 04 mois, de janvier 2017 à avril 2017.

La recherche et l'identification des BHRe ont été effectuées par les examens cyto bactériologiques des différents types de prélèvements. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée selon les recommandations de CLSI.

65 souches de BHRe ont été isolées des prélèvements des patients hospitalisés ou externes.

*Les BHRe ont été majoritairement isolées chez des patients hospitalisés dans les services du Centre Anti-Cancer avec une prédominance des espèces *Klebsiella pneumoniae* pour les EPC et *Enterococcus faecium* pour les ERG.*

Un taux de BHRe important au CHU Blida, cela impose une surveillance plus étroite des infections nosocomiales et des moyens de détection plus élaborés au laboratoire pour limiter la diffusion de ces bactéries.

Mots clé : BHRe, EPC, ERG, Carbapénèmes, Glycopeptides, Prévention.

ABSTRACT

Emerging Highly Resistant Bacteria (BHRe) Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) and Glycopeptide-resistant Enterococci (GRE) have emerged rapidly in the world from their first appearance in the United States. Indeed, over the past decade, we have found a growing prevalence of BHRe in Algeria where recent data on resistance to antibiotics indicate a worrying situation.

In order to determine the situation of the BHRe at the Blida hospital, we carried out a study of all the BHRe isolated from the different types of samples.

This work was carried out in the microbiology unit of the central laboratory of Blida University Hospital, unit Frantz Fanon and divided into two parts, a retrospective study spread over a period of six years, from January 2011 to December 2016 and a prospective study lasted 04 months, from January 2017 to April 2017.

Research and identification of BHRe were performed by cytobacteriological examinations of the different types of specimens. The study of antibiotic susceptibility was performed according to CLSI recommendations.

65 strains of BHRe were isolated from inpatient or outpatient samples.

*The BHRe were predominantly isolated from patients hospitalized in the services of the Anti-Cancer Center with a predominance of the species *Klebsiella pneumoniae* for the CPE and *Enterococcus faecium* for the GRE.*

A high rate BHRe at the Blida University Hospital requires closer surveillance of nosocomial infections and more laboratory detection means to limit the spread of these bacteria.

Key words: BHRe, CPE, GRE, Carbapenems, Glycopeptides, Prevention.