

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Blida 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'étude
En vue d'obtention du diplôme de Master
Option : Microbiologie

Etude des Entérobactéries et leurs profils d'antibiorésistance
(Service de Réanimation w de Tipaza)

Présenté par :

Date de soutenance : 26/06/2023

- Mlle MESBAH Ferial
- Mlle MAMMERINE Yousra

Devant le jury :

Mme EDDAIKRA A.	MCB/USDB1	Présidente
Mme BENHOUNA I.	MCB/USDB1	Examinatrice
Mme MOUHAMED MAHMOUD F.	MCA/USDB1	Promotrice
Mr LETLOUT H.	Docteur/UC3	Co-promoteur

Promotion: 2022-2023

Remerciements

*Nous tenons à remercier tout d'abord **Allah** le très grand, le Clément, l'Omniscient, l'Omnipotent, le Tout-puissant d'avoir permis à ce modeste travail d'aboutir à son terme.*

*Nous adressons le grand remerciement à : Notre encadreuse madame **Mohamed Mahmoud F.** pour votre aide et précieuse attention, vos efforts fournis durant notre cursus. Votre encouragement inlassable, amabilité, gentillesse méritent toute admiration. Nous vous remercions de nous avoir guidées dans l'élaboration de ce travail. Nous saisissons cette occasion pour vous exprimer notre profonde gratitude tout en vous témoignant notre respect. Vos conseils pertinents ont permis d'améliorer la qualité de notre travail et de le perfectionner. Nous avons été très profitables pour finaliser ce mémoire de manière satisfaisante. Nous vous sommes et resterons infiniment reconnaissantes cher docteur. Veuillez recevoir ici les plus sincères remerciements.*

*Nous remercions beaucoup notre Co-promoteur le responsable de laboratoire d'hygiène de Tipaza Dr.**Letlout** pour son bon accueil, de l'honneur de participer au jury de cette mémoire. Pour sa gentillesse et sa disponibilité. Qu'il trouve ici l'expression de ma très grande reconnaissance et toute l'équipe de laboratoire pour son aide et son soutien.*

Nous tenons également à remercier mesdames les membres de jury pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de siéger notre soutenance :

*A madame **Eddaikrea** ; Présidente du jury : Nous vous remercions de l'honneur et le plaisir d'accepter la présidence du jury de cette mémoire. Pour ses compétences professionnelles, ses qualités humaines, et pour son enseignement. Qu'il trouve ici l'expression de notre reconnaissance et nos profonds respects.*

*A madame **Benhoua** membre du jury. Nous désirons vous remercier d'avoir aimablement accepté de faire partie de notre jury d'évaluation. Nous saisissons cette occasion pour vous exprimer notre haute estime, considération et gratitude. Vos qualités humaines et professionnelles seront pour nous un exemple à suivre dans l'exercice de notre métier. Trouver ici le témoignage de notre reconnaissance et de notre profond respect.*

Dédicaces

Je dédie ce travail à

Mes chers parents bien-aimés, je souhaite exprimer ma profonde reconnaissance envers-vous pour tous les sacrifices que vous avez consentis tout au long de mes années d'études. Vous avez fait de moi la personne que je suis aujourd'hui, et aucune dédicace, aucun mot ne saurait véritablement exprimer la valeur que vous avez dans ma vie, mon amour, mon respect et ma gratitude sincère. Votre confiance et votre soutien constants m'ont donné la force de persévérer et de continuer à avancer. Aujourd'hui, je vous remets le fruit de vos efforts et de vos sacrifices. Chaque ligne, chaque mot et chaque lettre de ce mémoire est une expression de ma reconnaissance, de mon respect, de mon estime et de ma gratitude pour votre présence à mes côtés. Je ne pourrai jamais vous rendre tout ce que vous avez fait pour moi.

À ma chère sœur Chaima et à mes chers frères Zakaria, Boubakeur et Ibrahim, je vous offre humblement ce travail en témoignage de mon amour et de ma profonde gratitude, ainsi que de mon affection sincère et de mon attachement profond. Je vous souhaite une belle vie et plein de succès dans vos études.

À mes grandes mères, À mes oncles et mes tantes, À mes cousins et cousines et À toute la famille qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail. Ils m'ont chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours.

À mon amie et ma binôme Feriel, le chemin que nous avons commencé ensemble s'est terminé, de nombreuses années, des situations, des souvenirs, nous resterons ensemble pour toujours. Nous sommes arrivés ici, épuisés mais avec nos efforts conjugués. Nous sommes tombées et nous sommes relevées ensemble, nous nous sommes soutenues et nous avons pleuré dans les bras l'une de l'autre. Maintenant, il est temps de lever la tête fièrement et de marcher vers le podium d'honneur. Notre rêve commence à se réaliser. Je t'aime

À mes chères amies Kaouther, Khawla, Samer, Naima, Raounak, Chahinez, Sihem, Meriem, Imane, Boutheina et Ines, je vous remercie du fond du cœur pour tout votre soutien, votre compréhension, votre patience, votre temps et vos efforts. Nous avons passés des bons moments ensemble, vous êtes une source de réconfort inestimable. Je vous souhaite plus de succès.

Yousra

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

Tout d'abord mes parents MESBAH Elaid et BOUCHNAFA Ratiba ;

Ma chère mère à ma source de soutien et tendresse qui n'a jamais cessé de m'encourager.

Toujours là à s'inquiéter pour moi et à veiller à ce que je réussisse dans tout ce que J'entreprends depuis mon tout jeune âge. Merci pour tes sacrifices tes mots d'encouragement et tes duas qui m'ont toujours donné la force afin de continuer ce long chemin, aucune dédicace ne sera suffisante pour exprimer ma gratitude envers tout ce que tu as fait pour moi. je t'aime mama.

Mon cher père à l'homme de ma vie qui m'a appris le courage et m'a rendu plus forte, qui n'a jamais hésité à m'aider par tous les moyens. Merci pour tes sacrifices tes appels quotidiens qui ont pu me booster quand j'en avais le plus besoin, merci pour tout ce que tu as fait et continue de faire pour moi. je t'aime papa.

Aucun mot ne pourra exprimer toute ma reconnaissance et mon éternel amour à votre égard.

Vous êtes pour moi le symbole de la loyauté et de l'honnêteté.

Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venus de votre part.

Qu'Allah le tout Puissant prête mon père et ma mère longue vie et santé.

A mes chères sœurs Baya, Ibtissem, Ibtihel et mon cher frère Sohaib, je ne saurais vous exprimer tout l'amour et la tendresse que j'ai pour vous, merci infiniment.

.A mes très chères amies Romaisa, Souad, Raounek, Meriem, Chahinez, Sihem et Imen avec lesquelles j'ai partagé des bons souvenirs, je vous remercie pour votre présence, votre amour, votre gentillesse et votre soutien.

À ma source de joie et mon soutien moral mon fiancé Ahmed Amine merci pour ton soutien et tout le bonheur que tu m'as donné depuis que tu es entré dans ma vie et spécial dédicace pour ma belle-famille ; ma deuxième famille.

Spécial dédicace pour Aicha et Assma qui m'ont vraiment aidé par ses conseils son aide précieuse et pour Naila, Fatima, Amina et Imene qui m'ont aidé à la pratique et bien apprendre. Merci exceptionnellement.

Je remercie énormément ma binôme Yousra pour les moments qu'on a passés ensemble, pour le soutien que j'ai reçu de ta part, pour m'aider à tout moment difficile pendant nos études et notre amitié, je vous remercie pour votre compréhension et compatibilité durant cette année je vous souhaite que du bonheur et réussite.

Dieu seul sait à quel point ce chemin était dur pour moi. Si maintenant j'atteins la fin dont je rêvais et que j'ai l'honneur de se graduer, c'est grâce à Dieu avant tout.

Ferial

Résumé

L'isolement et l'identification des entérobactéries au niveau du service de réanimation de l'hôpital Tagzit Abdelkader situé au niveau de la Willaya de Tipaza, a fait l'objet de ce modeste travail à fin de les collecter et déterminer leurs profils d'antibiorésistance. 52 prélèvements ont été réalisés à partir des surfaces environnantes des patients tel que les lits, les tables, les surfaces, ainsi que l'air ambiant.

Les sites les plus contaminés dans un environnement médical sont ceux en contact direct avec les patients, notamment les lavabos, les écrans de scope, les lits, les tables et l'air ambiant des chambres malades.

Les résultats ont révélé un taux de positivité des échantillons de 84,62% et un taux de négativité de 15,38%. Au total, 13 souches bactériennes ont été isolées à partir de l'environnement hospitalier, comprenant 5 souches de *Pantoea* spp (38,5%), 4 souches d'*Enterobacter cloacae* (30,8%), et 2 (15,3%) pour chacune de *Rahnella aqualitis* et *Proteus* spp.

L'étude de leurs résistances aux antibiotiques a révélé que toutes les souches de *Pantoea* spp. présentent une résistance de 100% aux Céftriaxone (CTR), une résistance de 60% aux Amoxicilline + Acide clavulanique (AMC), et une résistance de 40% aux Céfoxitine (FOX), Aztréonam (AZT), Amoxicilline (AX), Ampicilline (AM), et Céfazoline (CZ). De plus, une résistance de 20% est observée pour les Imipénème (IPM), Céfotaxime (CTX), Céfalotine (KF), Céfazoline (CAZ) et Acide nalidixique (NA). Pour *Enterobacter cloacae* 100% sont résistantes aux Imipénème (IPM), Chloramphénicol (C), Céfazoline (CZ), Céfoxitine (FOX), Amoxicilline + Acide clavulanique (AMC), Céfotaxime (CTX), Céftriaxone (CTR), Aztréonam (AZT), Céfalotine (KF), Amoxicilline (AX), Ampicilline (AM) et une résistance de 50% pour Céfazoline (CAZ) et 25% vis-à-vis la Nitrofurantoin (NIT). Quant à *Rahnella aqualitis*, toutes les souches montrent une résistance totale (100%) aux Céfalexine (CN) et une résistance de 50% vis-à-vis de l'Ampicilline (AM). Concernant la sensibilité des bactéries aux antibiotiques, la totalité des souches *Pantoea* spp. et *Rahnella aqualitis* étaient sensible à Chloramphénicol (C).

Des tests complémentaires ont permis de détecter que toutes les souches d'*Enterobacter cloacae* et *Pantoea* spp produisant des β -lactamases à spectre élargi (BLSE).

Concernant le test de formation de biofilm, aucune des souches d'entérobactéries isolées n'a démontré la capacité de former un biofilm.

Mots clés : Entérobactéries, antibiorésistance, service de réanimation, BLSE, biofilm.

Abstract

The isolation and identification of *Enterobacteriaceae* in the intensive care unit of the Tagzit Abdelkader hospital in the Willaya of Tipaza, was the subject of this modest study, in order to collect them and determine their antibiotic resistance profiles. 52 samples were taken from patients' surrounding surfaces, including beds, tables, surfaces and ambient air.

The most contaminated sites in a medical environment are those in direct contact with patients, in particular sinks, scope screens, beds, tables and the ambient air of sick rooms.

The results revealed a sample positivity rate of 84.62% and a negativity rate of 15.38%. A total of 13 bacterial strains were isolated from the hospital environment, including 5 strains of *Pantoea* spp (38.5%), 4 strains of *Enterobacter cloacae* (30.8%), and 2 (15.3%) each of *Rahnella aqualitis* and *Proteus* spp.

A study of their antibiotic resistance revealed that all *Pantoea* spp strains showed 100% resistance to Céftriaxone CTR, 60% resistance to Amoxicilline + Acide clavulanique AMC, and 40% resistance to Céfoxitine FOX, Aztréonam AZT, Amoxiciline AX, Ampicilline AM, and Céfazoline CZ. In addition, 20% resistance is observed to Imipenème IPM, Céfotaxime CTX, Céfalogine KF, Céfazoline CAZ and Acide nalidixique NA. For *Enterobacter cloacae*, 100% are resistant to Imipenème IPM, Chloramphénicol C, Céfazoline CZ, Céfoxitine FOX, Amoxicilline + Acide clavulanique AMC, Céfotaxime CTX, Céftriaxone CTR, Aztréonam AZT, Céfalogine KF, Amoxiciline AX, Ampicilline AM and 50% to Céfazoline CAZ and 25% to Nitrofurantoin NIT. As for *Rahnella aqualitis*, all strains show total resistance (100%) to Céfalexine CN and 50% resistance to Ampicilline AM. In terms of antibiotic sensitivity, all *Pantoea* spp. and *Rahnella aqualitis* strains were sensitive to C Chloramphénicol.

Additional tests showed that all *Enterobacter cloacae* and *Pantoea* spp. strains produced extended-spectrum β -lactamases (ESBL).

With regard to the biofilm formation test, none of the bacterial strains isolated demonstrated the ability to form a biofilm.

Key words: Enterobacteriaceae, antibiotic resistance, intensive care unit, ESBL, biofilm.

ملخص

تمت دراسة عزل وتحديد مكونات الجراثيم المعوية في وحدة العناية المركزة بمستشفى تاغزيت عبد القادر في ولاية تيبازة، وذلك بهدف جمعها وتحديد ملفات مقاومتها للمضادات الحيوية. تم أخذ 52 عينة من الأسطح المحيطة بمرضى، بما في ذلك الأسرة والطاولات والأسطح والهواء المحيط.

أكثر المواقع تلوثاً في البيئة الطبية هي تلك التي تكون على اتصال مباشر مع المرضى ، ولا سيما الأحواض وشاشات المنظار والأسرة والطاولات والهواء المحيط بغرف المرضى.

كشفت النتائج عن معدل إيجابية العينات بنسبة 84.62% ومعدل سلبية العينات بنسبة 15.38%. تم عزل مجموعة من 13 سلالة بكتيرية من بيئة المستشفى، بما في ذلك 5 سلالات من *Pantoea spp* (38.5%) و 4 سلالات من *Enterobacter cloacae* (30.8%) و 2 سلالة (15.3%) لكل من *Rahnella aqualitis* و *Proteus spp*.

أظهرت دراسة مقاومتها للمضادات الحيوية أن جميع سلالات *Pantoea spp* تظهر مقاومة بنسبة 100% لـ Ceftriaxone (CTR)، ومقاومة بنسبة 60% لـ Amoxiciline +Acide clavulanique (AMC)، ومقاومة بنسبة 40% لـ Cefazoline (CZ)، و Ampicilline (AM)، Amoxiciline (AX)، Aztreonam (AZT)، Cefoxitine (FOX)، بالإضافة إلى ذلك، يُلاحظ وجود مقاومة بنسبة 20% لـ Imipenem (IPM)، Cefotaxime (CTX)، Cefalotine (KF)، و CAZ. و NA. بالنسبة لـ *Enterobacter cloacae*، تكون 100% منها مقاومة لـ IPM و C و CZ و Cefoxitine (FOX) و Amoxiciline +Acide clavulanique (AMC) و Ceftriaxone (CTR) و Cefotaxime (CTX) و Aztreonam (AZT) و Cefazoline (CAZ) و Cefalotine (KF) و Amoxiciline (AX) و Ampicilline (AM) و 50% مقاومة لـ Cefazoline (CAZ) و 25% مقاومة لـ Nitrofurantoin (NIT). أما بالنسبة لـ *Rahnella aqualitis*، فجميع السلالات تظهر مقاومة كاملة (100%) لـ Cefalexine (CN) ومقاومة بنسبة 50% لـ AM. وفيما يتعلق بالحساسية للمضادات الحيوية، فإن جميع سلالات *Pantoea spp* و *Rahnella aqualitis* حساسة لـ Chloramphenicol (C).

أظهرت الاختبارات الإضافية أن جميع سلالات *Enterobacter cloacae* و *Pantoea spp* تنتج مثبطات بيتالاكتاماز الموسعة (ESBL).

فيما يتعلق باختبار تشكيل الغشاء الحيوي، لم تظهر أي من سلالات البكتيريا المعزولة القدرة على تشكيل غشاء حيوي.

الكلمات المفتاحية: *Enterobacteriaceae*، مقاومة المضادات الحيوية، وحدة العناية المركزة، ESBL، الغشاء الحيوي.

Liste des figures

Figure 01 : Les différentes étapes de la partie expérimentale.....	10
Figure 02 : Répartition des résultats selon les prélèvements effectués.....	18
Figure 03 : Aspect macroscopique de premier groupe	19
Figure 04 :Aspect macroscopique de deuxième groupe	19
Figure 05 : Aspect macroscopique de troisième groupe	20
Figure 06 : Aspect macroscopique de quatrième groupe sur milieu Gélose nutritive.....	20
Figure 07 : Répartition des bactéries selon la coloration de Gram.....	20
Figure 08 : Test d'oxydase négative et test de catalase positive.....	21
Figure 09 : Coloration de Gram de souches isolées.....	21
Figure 10 : Galerie Api 20 ^E de <i>Pantoea</i> spp.....	22
Figure 11 : Galerie Api 20 ^E d' <i>Enterobacter cloacae</i>	22
Figure 12 : Galerie Api 20 ^E de <i>Rahnella aqualitis</i>	22
Figure 13 : Taux de résistance des <i>Pantoea</i> spp. vis-à-vis des ATB testés.....	27
Figure 14 : Zone d'inhibition des antibiotiques testés contre <i>Pantoea</i> spp.....	28
Figure 15 : Pourcentage de résistance des <i>Enterobacter cloacae</i> vis-à-vis des ATB testés.....	29
Figure 16 : Zone d'inhibition des antibiotiques testés chez <i>Enterobacter cloacae</i>	29
Figure 17 : Pourcentage de résistance des <i>Rahnella aqualitis</i> vis-à-vis des ATB testés.....	30
Figure 18 : Zone d'inhibition des antibiotiques testés chez <i>Rahnella aqualitis</i>	30
Figure 19 : Test double disque.....	31
Figure 20 : Répartition des entérobactéries BLSE selon le test double disque.....	31
Figure 21 : Absence de la formation de biofilm chez les bactéries isolées.....	32
Figure 22 : Image de synergie (BLSE) observée chez <i>Pantoea</i> spp.....	33
Figure 23 : Verreries utilisées dans les protocoles.....	43
Figure 24 : Appareilles utilisées dans les protocoles.....	43
Figure 25 : Colorants utilisés dans la coloration de Gram.....	46
Figure 26 : Disques d'oxydase et eau oxygénée.....	47
Figure 27 : Réactifs utilisés dans la galerie API20E.....	47

Liste des tableaux

Tableau I : Lieu et nombre de prélèvement pour chaque site.....	9
Tableau II : Les antibiotiques testés contre les bactéries.....	15
Tableau III : Résultats des galeries API20E des bactéries isolées.....	23
Tableau IV : Fréquence des Bacilles à Gram négatifs bactéries isolées.....	24
Tableau V : Répartition des bactéries isolées à partir des surfaces selon les sites.....	25

Liste des abréviations

ADH	Arginine DésHydrogénase	URE	Urée
AMY	Amygdaline	VP	Voges-Proskauer
API	Analytical Profil Index.	TRP	Tryptophane
ARA	Arabinose.		
BGN	Bacilles à Gram Négatif.		
BHIB	Brain Heart Infusion Broth.		
BLSE	β-lactamases à spectre élargi.		
BMR	Bactéries Multi- Résistantes.		
C3G	Céphalosporines de troisième generation.		
CIT	Citrate		
EBLSE	Entérobactéries productrices de β- lactamases à spectre élargi.		
ESC	Esculine citrate de fer		
GEL	Gélatinase.		
GLU	Glucose.		
H₂S	Thiosulfate de sodium		
IND	Indole		
INO	Inositol		
LDC	Lysine décarboxylase		
LPS	Lipo-Poly-Saccharides		
MAN	Mannose		
McF	Mac Farland		
ODC	Ornithine DéCarboxylase		
ONPG	Orthonitrophényl-β-galactoside .		
RHA	Rhamnose.		
SAC	Saccharose.		
SOR	Sorbitol.		
TDA	Tryptophane DésAminase.		

Table des matières

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction.....1

Partie bibliographique

I.1.Généralités sur les entérobactéries.....3

I.1.1. Taxonomie3

I.1.2. Entérobactéries pathogènes4

I.1.2.1. Pathogènes opportunistes4

I.1.2.2. Pathogènes spécifiques4

I.1.3. Etudes de quelques genres et espèces particuliers4

I.1.3.1.*Enterobacter*4

I.1.3.2.*Pantoea*5

I.1.3.3. *Proteus*5

I.1.3.4. *Rahnella*.....5

I.2.Antibiotiques et antibiorésistance6

I.2.1. Type de résistance bactérienne.....6

I.2.1.1. Résistance naturelle.....6

I.2.1.2. Résistance acquise.....6

I.2.1.3. Résistance croisée.....6

I.2.2. Mécanisme de résistance enzymatique	7
I.2.3. Mécanisme de résistance non enzymatique.....	7
I.2.3.1. Modification de la cible.....	7
I.2.3.2. Diminution de la perméabilité.....	7
I.2.3.3. Efflux actif.....	7

MATERIELET METHODES

II.1. Matériel.....	8
II.1.1. Matériel biologique.....	8
II.1.2. Matériel non biologique.....	9
II.2. Méthodes	9
II.2.1. Prélèvement des échantillons	9
II.2.2. Etude bactériologique.....	11
II.2.2.1. Examen macroscopique, microscopique et culture.....	11
II.2.2.2. Identification des germes isolés.....	11
II.2.3. Antibiogramme par diffusion des disques.....	13
II.2.4. Tests complémentaires	15
II.2.4.1. Test de synergie.....	15
II.2.4.2. Test de double disque.....	16
II.2.4.3. Test de biofilm... ..	16

RESULTATS ET DISSCUSSION

III.1. Etude Bactériologique.....	18
III.1.1. Répartition des résultats selon les prélèvements effectués	18
III.1.2.Examen macroscopique	19
III.1.3. La coloration de Gram.....	20
III.1.4. Identification biochimique	21
III.1.5. Répartition des bactéries Gram négatif isolées	24
III.1.6. Répartition des souches bactériennes isolées selon les sites de prélèvements.....	25
III.2. Antibiorésistance chez les bactéries isolées	27
III.2.1. Antibiorésistance chez <i>Pantoea</i> spp	27
III.2.2. Antibiorésistance chez <i>Enterobacter cloacae</i>	28
III.2.3. Antibiorésistance chez <i>Rahnella aqualitis</i>	30
III.3. Test complémentaires	31

III.3.1.Répartition des entérobactéries productrices de BLSE selon le test	
double disque.....	31
III.3.2. Test de biofilm	32
III.3.3. Test de synergie.....	33
Conclusion.....	34
Références bibliographiques.....	36
Annexe.....	43

INTRODUCTION

Introduction

L'environnement hospitalier représente une source d'infection potentielle pour les patients hospitalisés. Différentes zones autour du patient doivent être prises en considération, telles que l'eau des toilettes qui entre en contact avec le patient, les dispositifs médicaux, les surfaces et les instruments en contact avec la peau et les muqueuses du patient. Traditionnellement, chaque mode de transmission et réservoir environnemental est associé à des agents pathogènes spécifiques. Cependant, il a été constaté que des microorganismes multirésistants peuvent être acquis à partir de l'environnement hospitalier (infections nosocomiales) (**Lopez, 2013**).

Les infections nosocomiales représentent un problème majeur en matière de santé publique en raison de leur impact financier, de la morbidité et de la mortalité qu'elles entraînent chez les patients. En particulier, elles sont fréquentes dans les unités de réanimation en raison de la diminution des défenses immunitaires des patients et de l'augmentation des procédures invasives. Ces infections posent ainsi des problèmes tant sur le plan économique que sur le plan thérapeutique (**Randriamizao et al., 2022**).

Les bacilles à Gram négatif occupent une place très importante parmi les microorganismes responsables d'infections nosocomiales. Ces pathogènes appartiennent à différentes familles bactériennes représentées majoritairement par les entérobactéries (**Liassine, 2000**).

Les entérobactéries, une famille importante de bactéries à Gram négatif, aéro ou anaérobies facultatifs. Ils ont un intérêt médical majeur en raison de leur implication dans la plupart des maladies infectieuses humaines, telles que les infections urinaires, respiratoires, digestives et cutanées. Ces microorganismes sont fréquemment associés aux infections hospitalières et communautaires. La diversité des espèces au sein de l'ordre des *Enterobacteriales* qui englobe la famille des *Enterobacteriaceae* comprend *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, et d'autres genres anciennement étaient des entérobactéries et actuellement appartiennent à la famille des *Morganellaceae* (*Proteus*), *Erwiniaceae* (*Pantoea*), et *Yersiniaceae* (*Rahnella*). Cette diversité s'accompagne d'une variété de réponses aux antibiotiques, ce qui pose principalement des problèmes de gestion en raison de leur résistance à ces derniers (**Aweille, 2017**).

Ces bactéries développent des mécanismes de résistance qui rendent les médicaments autrefois efficaces inefficaces dans le traitement des infections. Cette augmentation de la résistance aux antibiotiques est le résultat de divers facteurs, tels que l'utilisation excessive et inappropriée d'antibiotiques chez les humains (**Tani et al., 2014**).

L'émergence et la propagation de la résistance aux antibiotiques augmentent considérablement le risque d'échec thérapeutique, ce qui se traduit par des hospitalisations prolongées, une augmentation des coûts de traitement et une morbidité et mortalité plus élevée. Cette situation compromet sérieusement la lutte contre les maladies infectieuses (**Salah et al., 2021**).

Introduction

Les bactéries ont développé différents mécanismes afin de neutraliser l'action de la grande famille des β -lactamines, Parmi les mécanismes les plus couramment observés, l'inactivation enzymatique de l'antibiotique, la modification ou le remplacement de la cible de l'agent antimicrobien, l'efflux active du composé ou encore la réduction de la pénétration de la molécule (**Muylaert et Mainil, 2013**).

En vue d'améliorer la prise en charge, prévenir un échec thérapeutique et diminuer le risque de mortalité, l'objectif principal de cette étude était de rechercher des genres d'entérobactéries ou anciennement étaient des entérobactéries, associées aux infections nosocomiales présent dans les échantillons provenant de différents sites de prélèvement de surface dans le service de réanimation de l'hôpital de Tipaza. Les étapes suivantes ont été respectées :

- Purification et identification biochimique des bactéries isolées.
- Etablir un profil de résistance des bactéries isolées vis-à-vis de quelques antibiotiques testés.

Chapitre I.

Partie Bibliographique

I.1.Généralités sur les entérobactéries

Les entérobactéries constituent un grand groupe de bactéries ayant une forte similitude. La création de ce groupe a été proposée par **Otto Rahn** en 1937 qu'il dénomme *Enterobacteriaceae* et proposa le genre *Enterobacter* pour regrouper des micro-organismes présentant des propriétés biochimiques et morphologiques communes et parmi lesquelles on trouvait déjà des noms tels qu'*Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, ou *Shigella*. Deux années après cette description qui concernait 112 espèces, ce nombre fut ramené à 67. Les entérobactéries sont une famille bactérienne hétérogène qui est couramment présentes dans l'intestin humain et animal, elles comprennent de nombreuses espèces différentes (**Pilly, 2013**).

Ce sont des bacilles à Gram négatifs non-exigeantes, aéro ou anaérobie facultatifs, fermentent le glucose avec ou sans production de gaz, mobiles par une ciliature péritriche ou immobiles, non sporulé, oxydase négatif et catalase positive (**Delarras, 2007**).

Les Entérobactéries sont ubiquitaires avec un habitat très diversifié. On les trouve dans le sol, dans l'eau, dans certaines denrées alimentaires et aussi dans la cavité buccale, au niveau des voies aériennes supérieures et sur les organes génitaux. Ce sont des hôtes normaux ou pathogènes du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux (**Moussa et Moussaoui, 2016**). Dans l'intestin terminal, ces bactéries représentent plus de 10% de la flore totale (**Guiraud, 2012**).

I.1.1. Taxonomie

La classification est basée sur l'étude de leurs profils phénotypiques (fermentation de différents sucres, production ou non de sulfures, présence ou absence de certains enzymes du métabolisme) ou génotypiques (ribotypage, hybridation ADN/ADN) (**Denis, 2007**).

L'ordre des *Enterobacteriales* appartenant à la classe des *Gammaproteobacteria*, phylum *Pseudomonadota*, et le domain *Bacteria* (**Adeolu et al., 2016**). L'application de nouvelles technologies a entraîné de nombreux changements dans la classification des *Enterobacterales*. En 2021, De nombreux nouveaux genres et espèces ont été découverts, les *Enterobacteriales* compte 114 genres et plus de 464 espèces nommées et 7 familles valablement publiées (*Budviciaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae*, *Pectobacteriaceae* et *Yersiniaceae*) (**Janda et Abbott,2021**)

I.1.2. Entérobactéries pathogènes

- **Pathogènes opportunistes**

Ces bactéries résident normalement dans l'intestin, mais elles peuvent parfois causer des problèmes pour la santé humaine en agissant de manière agressive. On les appelle "pathogènes opportunistes". La fréquence de ces infections est en hausse, en grande partie à cause de la présence de plasmides de résistance aux antibiotiques chez ces bactéries, ce qui leur permet de prospérer et de perturber l'équilibre microbien dans le corps humain (**Brrehil et al., 2018**).

- **Pathogènes spécifiques**

Il s'agit de bactéries qui ne se trouvent normalement pas dans l'intestin, mais qui peuvent causer des infections plus ou moins sévères lorsqu'elles sont présentes dans l'organisme, telles que *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* et *Yersinia* (**Brrehil et al., 2018**).

I.1.3. Etudes de quelques genres et espèces particuliers :

Les genres de l'ordre *Enterobacteriales* sont en majorité pathogènes du tube digestif humain et d'autres sont des colonisateurs normaux, bien qu'ils soient également présents dans l'environnement. Dans le cadre de cette étude, les genres incriminés sont ; *Enterobacter*, *Pantoea*, *Rahnella* et *Proteus*.

- ***Enterobacter*:**

Les bactéries du genre *Enterobacter* ont été décrites pour la première fois par **Hormaeche** et **Edwards** en 1960, sont des souches Gram-négatives anaérobies facultatifs appartenant à l'ordre des *Enterobacterales* et la famille des *Enterobacteriaceae*, présentes dans la nature et faisant partie de la flore intestinale commensale (**Adeolu et al., 2016**). Au fil des années, les espèces d'*Enterobacter* ont gagné une importance clinique et sont devenues des agents pathogènes nosocomiaux chez les patients en soins intensifs.

Le genre *Enterobacter* a subi des modifications taxonomiques significatives au cours des 50 dernières années : il existe 22 espèces dans le genre *Enterobacter*, Six espèces de ce genre ; *E. cloacae*, *asburiae*, *hormaechei*, *kobei*, *ludwigii* et *nimipressuralis* sont regroupées dans le complexe *E. cloacae*, car la plupart d'entre elles partagent une parenté ADN avec *E. cloacae* allant de 61 à 67 % (**Mezzatesta et al., 2012**).

Enterobacter cloacae est un pathogène nosocomial qui a la capacité de contaminer divers dispositifs médicaux (**Cisse et al., 2019**). Il est considéré comme une bactérie opportuniste responsable d'infections variées, telles que la bactériémie, les infections des voies urinaires et

Chapitre I. Partie bibliographique

respiratoire, des voies biliaires, des cathéters intraveineux et du système nerveux central (**Dong et al., 2020**).

- *Pantoea*

Pantoea est un bacille Gram négatif, non capsulé, non sporulé et possède des flagelles péritriches. Il se caractérise par des colonies convexes, lisses et translucides sur gélose nutritive, avec ou sans pigmentation jaune. Cette bactérie est un anaérobie facultatif et dépourvu d'oxydase (**Srinivasan et Jayasree, 2021**).

Pantoea est un genre de bactéries appartenant à l'ordre des *Enterobacteriales* et à la famille des *Erwiniaceae* (**Gavini et al., 1989**). Avant 1989, ce genre était considéré comme faisant partie du genre *Enterobacter* (**Brady et al., 2009**).

Le genre *Pantoea* a été proposé en se basant sur des différences séquentielles dans le groupe d'hybridation de l'ADN qui sépare *Erwinia* (**Doni et al., 2021**). Il existe 25 espèces et deux sous-espèces décrites appartenant à ce genre, qui ont été isolées dans différents environnements (**Tambong, 2019**). *Pantoea agglomerans* est l'espèce la plus fréquemment isolée de ce genre dans le contexte des infections humaines. Elle est généralement considérée comme un agent pathogène opportuniste rare, principalement impliqué dans les infections nosocomiales (**Gajdacs, 2019**).

Pantoea peut causer diverses infections, notamment des infections de plaies, une synovite, une arthrite septique, des infections sanguines, oculaires, cardiaques, urinaires, une méningite et des voies respiratoires (**Barbara et al., 2019**).

- *Proteus*

Le genre *Proteus*, faisant partie de l'ordre des *Enterobacterales* et de la famille des *Morganellaceae*, a été introduit dans les années 1980 (**Skerman et al., 1980**). Actuellement, ce genre compte quatre espèces avec des noms valablement publiés : *Proteus vulgaris* (**Brenner et al., 1995**), *P. mirabilis* (**Skerman et al., 1980**), *P. penneri* (**Hickman et al., 1982**) et *P. hauseri* (**O'Hara et al., 2000**). Certaines espèces du genre *Proteus*, notamment *P. mirabilis*, sont considérées comme des agents pathogènes responsables d'infections inflammatoires des voies intestinales et urinaires, telles que la pyélonéphrite, l'urolithiase et les infections associées aux cathéters (**Hyun et al., 2016**).

- *Rahnella*

Les *Rahnella* sont des bactéries anaérobies facultatives à Gram négatif qui font partie de l'ordre des *Enterobacterales* et la famille des *Yersiniaceae*. Elles ont été proposées pour la première fois en 1979 (**Brady et al., 2014**). Ces bactéries sont présentes de manière limitée dans la nature. Le genre

Chapitre I. Partie bibliographique

Rahnella comprend différentes espèces, notamment *R. génomospécies*, *R. genomospecies* et *R. aquatilis*, cette dernière étant l'espèce la plus fréquemment isolée. (Martins et al., 2015).

Les infections causées par les *Rahnella* comprennent des infections des plaies, des bactériémies, des gastroentérites aiguës et des septicémies, en particulier chez les patients immunodéprimés (Kämpfer, 2015).

I.2. Antibiotiques et antibiorésistance

Les antibiotiques se définissent comme des molécules capables d'inhiber la croissance (bactériostatique) ou même de tuer des bactéries (bactéricides), sans affecter l'hôte (cellules eucaryotes). Les sources principales d'antibiotiques sont les champignons, mais parfois aussi les bactéries (Van et Tulkens, 2008).

La résistance bactérienne aux antibiotiques est apparue rapidement après leur introduction dans le traitement des maladies infectieuses. Cette résistance est un facteur majeur compliquant le traitement des infections bactériennes et la dissémination des souches multi-résistantes. La résistance bactérienne aux antibiotiques se caractérise par son caractère naturel ou acquis, son mécanisme et son support génétique (Yala et al., 2001)

I.2.1. Type de résistance bactérienne

Il existe trois types de résistance aux antibiotiques, la résistance naturelle, la résistance acquise et la résistance croisée :

I.2.1.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches de la même espèce d'une manière permanente et d'origine chromosomique, cette résistance est stable et transférable par la division cellulaire à la descendance (transmission verticale), mais elle n'est jamais transférable à une autre bactérie (transmission horizontal) (Carle, 2009).

I.2.1.2. Résistance acquise

La résistance acquise se produit lorsqu'il y a une modification dans l'ADN bactérien de sorte qu'un nouveau caractère phénotypique peut être exprimé. Les bactéries peuvent acquérir une résistance soit par mutations sur des gènes entraînant des modifications de cible, de perméabilité membranaire, modification cible. Ou par l'acquisition d'un nouvel ADN d'origine chromosomique ou extra-chromosomique, qui contient des informations sur la résistance (Marie, 2018).

I.2.1.3. Résistance croisée

La résistance croisée se produit lorsque la résistance à un antibiotique engendre une résistance à un autre composé par un seul et même mécanisme biochimique. Le phénomène de résistance

croisée peut survenir parmi tous les membres d'une classe d'antibiotiques (**Muylaert et Mainil, 2012**).

I.2.2. Mécanisme de résistance enzymatique :

La production d'enzymes inactivatrices appelées b-lactamases. Ceci est le principal mécanisme de résistance des entérobactéries vis-à-vis des b-lactamines. Il existe de nombreuses b-lactamases avec des structures et des spectres d'hydrolyse différents, ce qui leur permet de dégrader spécifiquement certains antibiotiques. Comme la plupart des bacilles à Gram négatif, les entérobactéries sont naturellement résistantes à plusieurs b-lactamines, comme les pénicillines G, V et M (**Vallée et al., 2018**).

I.2.3. Mécanisme de résistance non enzymatique

I.2.3.1. Modification de la cible

D'après **Nounci (2019)**, la cible de l'antibiotique peut être structurellement modifiée ou remplacée soit partiellement soit totalement, de telle sorte que le composé antibactérien ne puisse plus se lier et exercer son activité au niveau de la bactérie. Ce type de résistance est très rare chez les entérobactéries (**Vallée et al., 2018**).

I.2.3.2. Diminution de la perméabilité

La membrane externe des entérobactéries forme une barrière hydrophile compacte expliquant la résistance naturelle de toutes les entérobactéries aux antibiotiques hydrophobes et de haut poids moléculaire. De plus, elles utilisent des systèmes de "pompes" pour l'efflux actif, qui permet d'expulser activement les antibiotiques hors de la bactérie (**Vallée et al., 2018**).

I.2.3.3. Efflux actif

Les pompes à efflux multi-médicaments sont les premières barrières de défense des bactéries contre les antibiotiques, car elles réduisent la concentration des médicaments à l'intérieur de la cellule. Ces protéines transmembranaires, appelées "pompes", sont localisées sur la membrane cellulaire bactérienne et jouent un rôle essentiel dans la diminution de la concentration de substances internes et externes (**Huang et al., 2022**).

Il est important de souligner que l'efflux actif est souvent associé à une imperméabilité chez les entérobactéries, ces deux mécanismes agissant conjointement pour réduire la concentration intracellulaire des antibiotiques (**Vallée et al., 2018**).

Chapitre II.

Matériel et Méthodes

Chapitre II. Matériel et Méthodes

La présente étude est basée sur l'isolement des bactéries à partir des prélèvements provenant des surfaces du service de réanimation de l'établissement public hospitalier Tagzait Abdelkader (W.Tipaza). Cette partie expérimentale s'est déroulée au laboratoire d'hygiène de la Willaya de Tipaza durant une période de 3 mois allant du mois de février au mois d'avril.

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique

52 prélèvements constituent le matériel biologique. Le prélèvement a touché plusieurs sites (lit de malade, tube de respiration, seringue électrique, table de scope.....ect) présents dans les cinq chambres, le couloir et la chambre des médecins du service de réanimation, Les prélèvements sont répartis comme suit : 11 dans la chambre 1, 8 dans la chambre 2, 6 dans la chambre 3, 7 dans la chambre 4, 7 dans la chambre 5, 3 dans le couloir et 4 dans la chambre des médecins et 6 prélèvements de l'air (Tableau I).

Tableau I : Lieu et nombre de prélèvement pour chaque site.

Lieux de prélèvements	Sites de prélèvements	Nombre de prélèvements
Chambre 01	Lit de malade (1)	11 prélèvements
	Tube de respiration (1)	
	Seringue électrique (1)	
	Table de scope (1)	
	Interrupteur (1)	
	Lavabo (1)	
	Robinet (1)	
	Sache d'eau (1)	
	Robinet de toilette (1)	
	Siège de toilette (1)	
	Poignée de porte (1)	
Chambre 02	Lit mobile de malade (1)	8 prélèvements
	Télécommande (1)	
	Scope (1)	
	Table et Scope (1)	
	Lavabo (1)	
	Tactile (1)	
	Le tour de lit (1)	
Couvre de lit (1)		

Chapitre II. Matériel et Méthodes

Tableau I (suite) : Lieu et nombre de prélèvement pour chaque site

Chambre 03	Table (1)	06 prélèvements
	L'écran de scope (1)	
	Seringue électrique (1)	
	Air liquide (1)	
	Table de malade (1)	
	Lavabo (1)	
Chambre 04	Poignée de porte (1)	07 prélèvements
	Moniteur EDAN (1)	
	Poignet de lit (1)	
	Cadre de la porte (1)	
	Lit de malade (1)	
	Graine tête de lit horizontal (1)	
	Télécommande (1)	
Chambre 05	Lit de malade (3)	07 prélèvements
	Ecran moniteur (2)	
	Table (1)	
	Moulage par injection médicale (1)	
Couloir	Poignet de couloir (1)	03 prélèvements
	Lavabo humide (1)	
	Table des produits (1)	
Chambre des médecins	Table des médecines (1)	04 prélèvements
	Lavabo (1)	
	Télécommande (1)	
	Paillasse (1)	
Prélèvements de l'air	3 boîtes du milieu GN (Gélose Nutritive) et 3 de milieu Hektoen ont été exposés ouvert en contact avec l'air pendant 30 minutes	6 prélèvements

II.1.2. Matériel non biologique

Le matériel non biologique est représenté essentiellement par l'appareillage, les milieux de cultures, les réactifs et la verrerie (Voir annexe 01, 02, 03, 04).

II.2. Méthodes

II.2.1. Prélèvement des échantillons

Les prélèvements des surfaces ont été réalisés par la technique d'écouvillonnage afin de prélever les germes dans les zones planes, non planes et dans les zones à accessibilité difficile. Les écouvillons ont été plongés d'abord dans le bouillon BHIB (Brain Heart Infusion Broth) (bouillon de cœur-cerveille) et le coton pressé légèrement sur la paroi du tube. L'écouvillon a été frotté sur la surface verticalement, horizontalement et en diagonale pendant 20 secondes dans la même zone avec une pression aussi forte que possible. Les écouvillons ont été replacés délicatement dans les tubes BHIB. Les tubes ont été transportés rapidement au laboratoire pour incubation pendant 24 heures à 37°C. La figure 01 illustre les principales étapes du protocole expérimental réalisé dans cette étude.

Chapitre II. Matériel et Méthodes

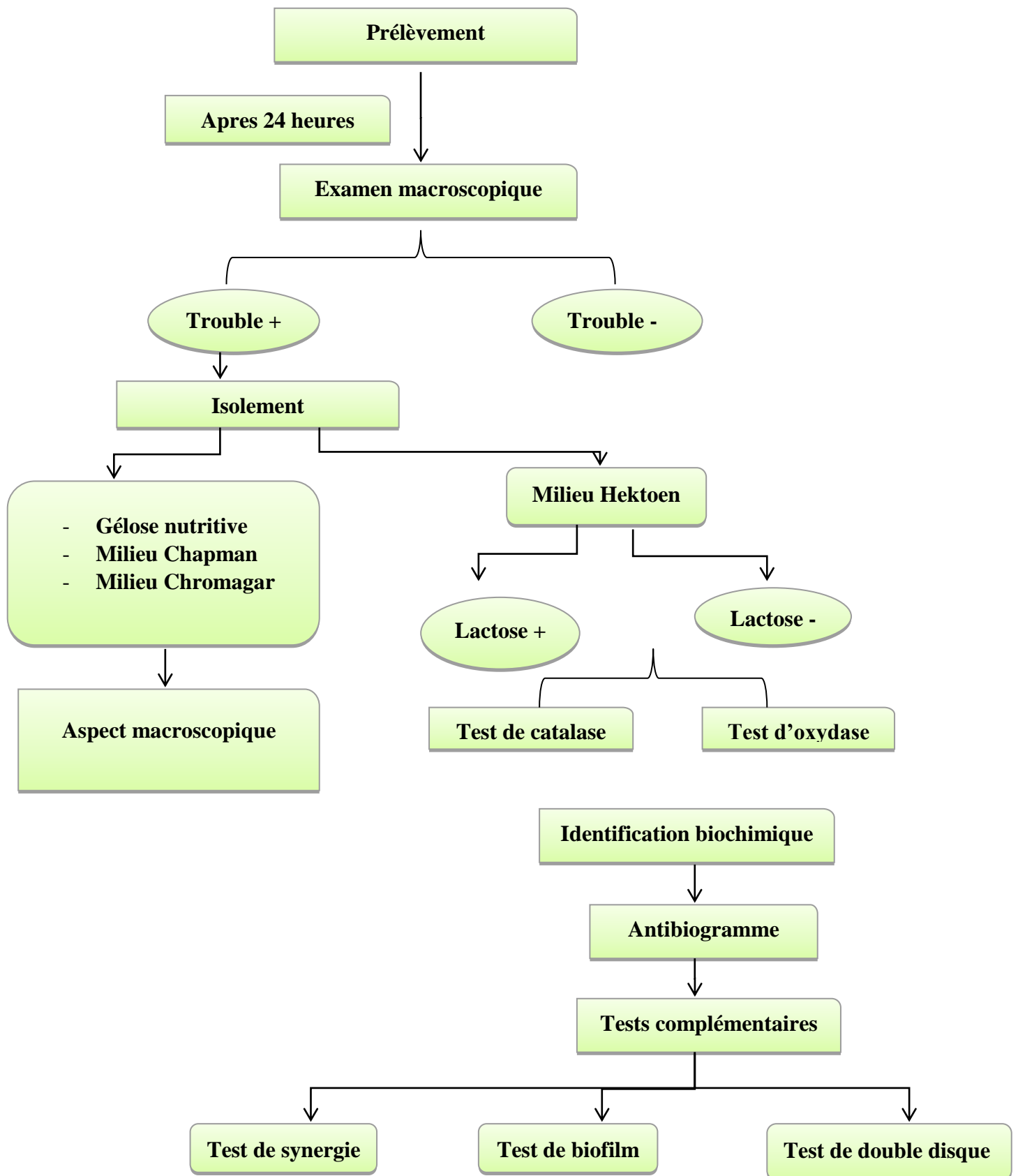


Figure 1 : Les différentes étapes de la partie expérimentale

II.2.2. Etude bactériologique

L'étude bactériologique consiste à réaliser l'examen macroscopique, microscopique, la culture et l'identification du germe.

II.2.2.1. Examen macroscopique, microscopique et culture

Examen macroscopique est basé sur l'aspect, la couleur, la consistance et d'autres éléments visibles ont été détectés pour chaque type de prélèvement biologique. L'observation macroscopique des tubes a été réalisée après incubation des tubes et des boîtes. L'absence ou la présence de trouble indique qu'il y'a une croissance bactérienne. L'isolement a été réalisé, à partir des tubes présentant un trouble, sur quatre milieux de cultures ; la gélose nutritive (GN), la gélose Hektoen (HK), la gélose Chapman et Chromagar.

L'ensemencement a été effectué à l'aide de pipettes Pasteur stériles boutonnées après avoir prélevé une goutte, en faisant dans la première partie de la boîte de Pétri des stries serrées puis des stries éloignées dans l'autre partie de la boîte. Les boîtes ont été incubées pendant 24 heures à 37°C. La purification a été faite par le repiquage sur le même milieu jusqu'à l'obtention d'une culture pure. L'examen microscopique concerne l'état frais et l'observation des germes vivants. Ce type d'observation permet d'apprécier par le biais du microscope optique la mobilité des bactéries et leurs morphologies. La technique est réalisée selon les étapes suivantes :

- Déposer une gouttelette d'eau stérile sur la lame.
- Prélever à l'aide d'une anse de platine, une fraction de la colonie et la déposer sur la lame.
- Recouvrir par la suite avec une lamelle.
- Observer au microscope optique à l'objectif x40.

II.2.2.2. Identification des germes isolés

-Coloration de Gram

La coloration de Gram est la coloration différentielle microbiologique, elle permet de différencier les bactéries selon deux critères principaux : leur forme et leur affinité pour les colorants. C'est la coloration qui permet de déterminer les caractéristiques de la paroi bactérienne, afin de distinguer entre les bactéries Gram négatifs et Gram positifs. Les parois des bactéries à Gram négatifs ont un taux élevé de lipides (à cause de la membrane externe) et une fine couche de peptidoglycane. Alors que les bactéries Gram positif sont pauvres en lipides et ont une couche plus épaisse de peptidoglycane. Après coloration, les bactéries Gram+ sont colorées en violet alors que les bactéries Gram- sont colorées en rose.

-Technique de la coloration de Gram

- Préparer un frottis bactérien à la chaleur du bec Bunsen.
- Recouvrir le frottis au violet de Gentiane (cristal violet) pendant 1min, puis éliminer l'excès par l'eau courante.
- Ajouter du Lugol (mordant) et laisser agir pendant 1min, jeter l'excès par l'eau courante.
- Ajouter l'alcool 95° pendant quelques secondes (10-15 secondes), puis rincer à l'eau.
- Recolorer le frottis à la fuschine (ou safranine) pendant 60 à 75 secondes, rincer à l'eau puis sécher à l'air libre.

-Tests biochimiques

❖ Test de catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le test consiste à mettre les bactéries en nombre suffisant en contact avec du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Si elles possèdent la catalase, elles transforment le peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène visible par la formation de bulles. Déposer sur une lame, une goutte d'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) à l'aide d'une pipette Pasteur. Prélever une colonie à l'aide d'une anse. Dissocier la colonie dans la goutte. S'il y'a un dégagement de bulles gazeuses (Catalase+) et s'il y'a pas de dégagement de bulles gazeuses (Catalase-).

❖ Test d'oxydase

Le test d'oxydase est un test de détection de l'enzyme cytochrome oxydase chez les bactéries Gram négatives qui produisent cette enzyme, Le test consiste à mettre en évidence la capacité que possède la bactérie à oxyder un réactif incolore (la N, N-diméthyle p-paraphénylènediamine) en un dérivé rose violacé. Placer un disque non imprégné sur une lame à l'aide d'une pince flambée. Déposer une goutte de réactif sur le disque non imprégné. A l'aide d'une pipette Pasteur prélever une colonie et la déposer doucement sur le disque. S'il y'a l'apparition d'une coloration violette dans un délai de 30 secondes (Oxydase +) et s'il y'a pas apparition d'une coloration violette dans un délai de 30 secondes (Oxydase -).

❖ Galeries de tests biochimiques miniaturisées (Galerie Api) :

Chapitre II. Matériel et Méthodes

Galerie API (Analytical Profile Index) est une galerie miniaturisée et standardisée de tests biochimiques, exploitables avec des bases de données d'identification complètes, dans la présente étude on a utilisé la galerie Api 20E (20 caractères pour les entérobactéries).

Api 20E : est un système standardisé pour l'identification des entérobactéries et les bacilles à Gram négatives et non fastidieux. Remplir le fond de la boîte d'incubation (alvéoles) par l'eau pour créer une atmosphère humide, puis déposer stérilement la galerie dans la boîte. A partir d'une culture pure de 18 à 24 heures, quelques colonies isolées et identiques ont été prélevées à partir du milieu gélosé et déposer dans 5 ml d'eau physiologique stérile afin de réaliser une suspension bactérienne de 0,5 Mc Farland. A l'aide d'une pipette Pasteur stérile et une poire, inoculer la suspension bactérienne dans les microtubes et placer la pointe de la pipette sur le côté de microtube et incliner la galerie vers l'avant pour éviter l'apparition des bulles d'air.

Pour les tests dont le nom est encadré : CIT, VP et GEL remplir le tube et la cupule. Pour les tests dont le nom est souligné ADH, ODC, LDC, H₂S et Urée, remplir leurs cupules par l'huile de paraffine pour la création de l'anaérobiose. Pour les autres tests remplir les cupules seulement. Refermer la boîte d'incubation, et marquer le plateau avec le numéro d'identification et la date. Incuber le plateau à 37° C pendant 18 à 24 heures. Après incubation ajouter les réactifs, TDA : Une goutte de réactif TDA, IND : Une goutte de réactif de James ou Kovacs, VP : Une goutte de réactif de VP1 puis VP2. La lecture de ces réactions (positives ou négatives) se fait en fonction des variations des couleurs (**annexes N 01**).

II.2.3. Antibiogramme par diffusion des disques

L'antibiogramme est un ensemble de technique explorant l'interaction entre la bactérie et les antibactériens (détermination de la sensibilité d'une bactérie vis-à-vis des antibiotiques). Ces tests sont largement utilisés en médecine humaine et animale mais aussi dans de nombreux autres domaines comme l'industrie pharmaceutique.

L'objectif de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'une souche bactérienne pure à un ou plusieurs antibiotiques *in vitro* dans une optique essentiellement thérapeutique.

- Préparer le milieu de culture, gélose Muller Hinton (MH) avec une épaisseur de 4 mm, il doit être séché avant l'emploi.
- Utiliser des colonies pures et jeunes.
- Le respect des conditions d'inoculum, de milieu, de temps et d'atmosphère d'incubation est recommandé pour chaque bactérie.

Chapitre II. Matériel et Méthodes

-Préparation de l'inoculum

- A partir d'une culture pure de 18 à 24 heures, préparer une suspension bactérienne à 0,5 MF (Mac Farland).
- A l'aide d'une anse de platine prendre quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Bien décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne.
- Inoculum permettant d'obtenir des colonies adjacentes mais non confluentes.

-Ensemencement

- Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum,
- L'essorer et le presser fermement (et le tourner) 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 stries serrées. Répéter l'opération deux fois, et tourner la boîte 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.

-Application des disques d'antibiotiques

Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90 mm. Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de pinces bactériologiques stériles avec une distance de 3 cm entre chaque deux disques et ne pas déplacer les disques après application. Après incubation de 24 heures à 37° C, diffusion des antibiotiques dans la gélose, chaque disque est entouré d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne qui signifie une réaction positive (**Tableau II**).

-Lecteur

Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse, à l'extérieur de la boîte fermée. Comparer les résultats obtenus aux valeurs critiques des zones d'inhibitions figurant dans les tables (Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale). Classer les bactéries dans l'une des catégories Résistantes (R), Sensibles (S) ou Intermédiaires (I).

Chapitre II. Matériel et Méthodes

Tableau II : Les antibiotiques testés contre les bactéries.

Antibiotiques	Abréviations	Charge (μm)	Familles
Céfotaxime	CTX	30	β - lactamine
Céfazoline	CZ	30	Céphalosporine
Ciprofloxacine	CIP	10	Fluoroquinolones
Chloramphénicol	C	30	Phénicolés
Aztréonam	AZT	30	Monobactame
Acidenalidixique	NA	30	Quinolones
Céftazidime	CAZ	30	Céphalosporine
Céfoxitine	FOX	30	Céphalosporines 2 ^{ème} generation
Amoxicilline+acide clavulanique	AMC	30	Aminopénicilline
Imipenem	IMP	30	Carbapénème
Ampicilline	AM	10	Aminopénicilline
Rifampicine	RIF	30	Others
Céfazoline	CAZ	10	Céphalosporine de 1 ^{ère} generation
Ceftriaxone	CTR	30	Céphalosporine de 3 ^{ème} generation
Colistine	CL	30	Aminopénicilline
Trimitoprim	TR	5	Sulfamides-Triméthoprim
Cefalotine	KF	30	Céphalosporine 1 ^{ère} generation
Amoxicilline	AX	25	Aminopénicilline
Nitrofurantoin	NIT	300	Nitrofurane
Co-trimoxazole	COT	25	Sulfonamides et Triméthroprim

II.2.4. Tests complémentaires

II.2.4.1. Test de synergie

-Principe

Il consiste à rechercher une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de β -lactamase (Acide clavulanique, Sulbactam et Tazobactam) et un disque de C3G (Céfotaxime, Cefotaxime et Céfepime), cette image est dite en « bouchon de champagne ».

-Technique

- La recherche de la BLSE se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme en déposant un disque d'amoxicilline + acide clavulanique (AMC 20/10 μg) à 30 mm centre à centre d'un disque de CTX (30 μg) ou CRO (30 μg) ou CPO (10 μg) ou CAZ (30 μg) ou ATM (30 μg) .
- Incuber pendant 16 à 18 heures à 35 C°.

Chapitre II. Matériel et Méthodes

-Lecture

La production d'enzymes peut se traduire par l'apparition d'une image de synergie en « Bouchon de champagne » entre le disque AMC et CTX, AMC et CAZ, AMC et ATM, AMC et CRO, AMC et CPO.

L'image de synergie, résultat de l'inhibition des BLSE par acide clavulanique et par l'augmentation de l'activité des céphalosporines de troisième génération et céphalosporines de quatrième génération en présence de l'acide clavulanique.

II.2.4.2 Test double disque

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

-Technique

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

- Ensemencer sur le milieu gélose Muller Hinton de la même façon qu'un antibiogramme standard.
- Déposer un disque d'AMC et un disque de C3G (CTX ou CRO) à une distance de 30 mm (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.
- Après une heure d'incubation, ôter le disque d'AMC et le remplacer par un disque de CTX ou CRO (ou CAZ).

-Lecture

Le test du double disque est positif quand le diamètre d'inhibition autour de C3G, appliqué après diffusion du disque AMC est supérieur ou égal à 5mm par rapport au diamètre d'inhibition autour du disque de C3G.

II.2.4.3 Test de biofilm

-Principe

Ce test consiste à utiliser la méthode gélose Rouge Congo pour indiquer la production de biofilm grâce à une réaction qui se fait entre les exopolysaccharides formés par les bactéries et le Rouge Congo.

Chapitre II. Matériel et Méthodes

-Technique

A partir d'une culture jeune, prélever quelques colonies isolées et identiques à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. Ensemencer les colonies par 3 stries (du plus serré vers l'éloigné). Incuber pendant 24 heures à 37°C.

-Lecture

Colonie noire avec cristallin de consistance sèche : il y a production de biofilm. Colonie rouge : absence de formation de biofilm.

Chapitre III.

RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Etude Bactériologique

III.1.1. Répartition des résultats selon les prélèvements effectués

Sur un total de 52 échantillons provenant de l'environnement des différentes unités composant le service de réanimation, 44 échantillons présentaient un trouble étaient positifs avec un pourcentage de 84,62%. Tandis que, 8 prélèvements étaient négatifs avec un pourcentage de 15,38% (**Figure2**).

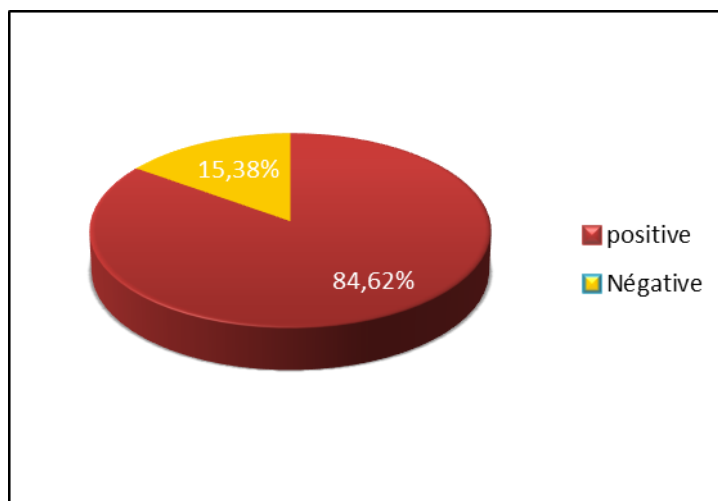


Figure 02 : Répartition des résultats selon les prélèvements effectués.

La pertinence de ce taux positif a été mise en évidence, particulièrement lorsqu'il s'agit des services de réanimation à haut risque traitant des patients affaiblis.

Dans cette étude, nous avons rapporté un taux de 84,62% de cas positifs. Alors que les travaux de **Berrada et al., (2017)**, se rapportant à une étude prospective menée au laboratoire régional de diagnostic épidémiologique et d'hygiène du milieu (LRDEHM) de Fès, à partir d'échantillons prélevés au Centre d'hémodialyse de l'hôpital Al Ghassani, dont les prélèvements ont touché les zones de traitement des patients, en privilégiant les endroits les plus proches d'eux (les générateurs, les tables et les matelas). De plus, des prélèvements ont été effectués sur les objets fréquemment manipulés par les patients, tels que les télécommandes. Le taux de contamination par les microorganismes était relativement élevé de l'ordre de 96 %.

Tandis que les travaux de **Siddo et al., (2020)** à Niger, ont rapporté un taux positif de 58,10% plus faible que celui trouvé dans cette étude. Par contre d'autres auteurs avaient rapporté des taux de contamination beaucoup plus élevés grâce à des techniques d'isolement plus sensibles. C'est le cas de **Meunier et al., (2005)** à Strasbourg en France qui avait retrouvé un taux de contamination de 87%.

Chapitre III. Résultats et discussion

III.1.2. Résultats selon l'examen macroscopique

Quatre groupes de bactéries ont été obtenus, pour le premier groupe, nous avons constaté la présence des colonies de taille (2 – 3mm), de couleur jaune orangé, sur le milieu Hektoen. En revanche, sur la gélose nutritive, les colonies étaient de couleur blanche et crémeuse, et quelques colonies mauves et crémeuses étaient présentes sur le milieu Chrom agar (**Figure 03**). Le deuxième groupe présente des colonies jaune orangé, leur diamètre est compris entre 0,6 et 1 um sur le milieu Hektoen, tandis que sur la gélose nutritive, les colonies étaient blanchâtres bombées et muqueuses, alors que, sur le milieu Chrom agar les colonies étaient petites muqueuses et bleues (**Figure 04**). Pour le troisième groupe, des colonies de 2-3 mm jaune orangé ont été observées sur le milieu Hektoen, tandis que sur la gélose nutritive, des colonies transparentes ont été remarquées. (**Figure 05**). Une nappe a été observée sur la gélose nutritive dans le quatrième groupe et aucune croissance n'a été observée sur les autres milieux de culture utilisés (**Figure06**).



Figure 03 : Aspect macroscopique de premier groupe : A. milieu Hektoen , B. milieu Nutritive. C. milieu chromagar.

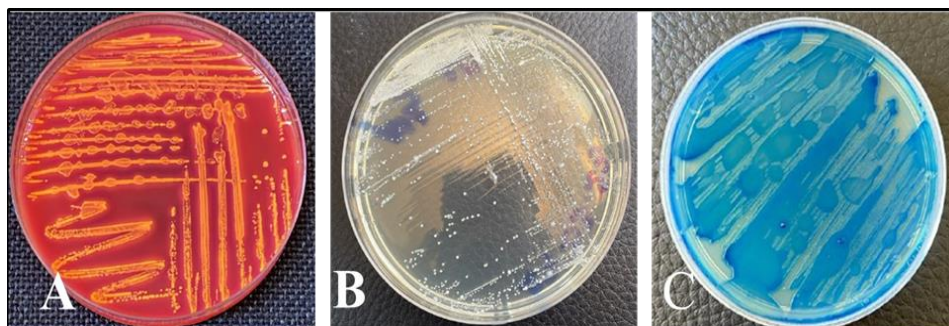


Figure 04:Aspect macroscopique de deuxième groupe : A. milieu Hektoen, B. milieu Gélose nutritive. C. milieu Chrom agar.

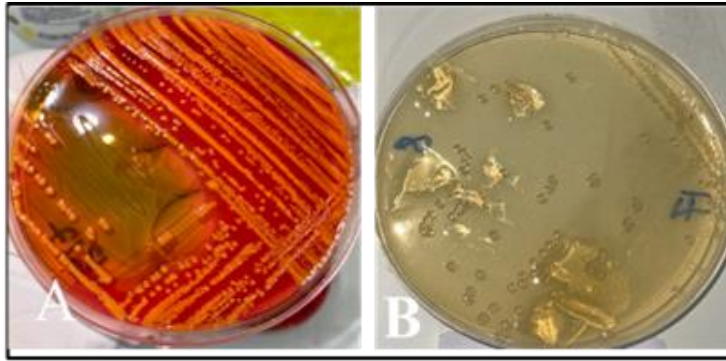


Figure 05: Aspect macroscopique de troisième groupe : A. milieu Hektoen, B. milieu Gélose nutritive. C. milieu Chrom agar.



Figure 06 : Aspect macroscopique de quatrième groupe sur milieu Gélose nutritive.

III.1.3. Répartition selon la coloration de Gram

A partir des cultures bactériennes provenant des prélèvements positifs (44). Nous avons obtenu un nombre de 24 bactéries à Gram négatif avec un pourcentage de 54,5% et 20 bactéries à Gram positif avec un pourcentage de 45,5% (**Figure 07**).

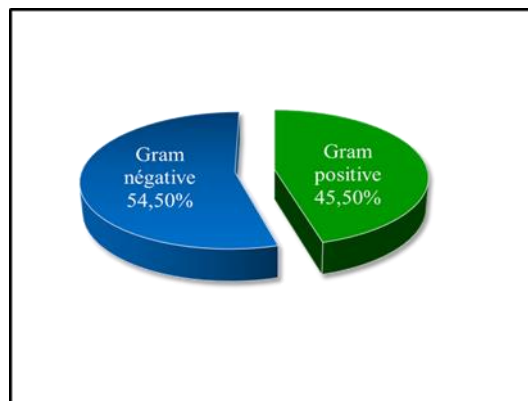


Figure 07 : Répartition des bactéries selon la coloration de Gram.

Chapitre III. Résultats et discussion

En revanche, une étude réalisée par **Berrada et al. (2017)** a trouvé des résultats légèrement différents. Leur recherche a montré que 84,9 % des bactéries étaient Gram positif, tandis que 15,1% étaient Gram négatif. Cela pourrait s'expliquer par le manque d'hygiène.

D'autre part, l'étude de **Ben Lahlou et al., (2020)** au Maroc, l'étude épidémiologique a montré la prédominance des bactéries à Gram négatif par rapport aux bactéries à Gram positif. Cette divergence peut être attribuée à des variations dans des conditions climatiques et des conditions d'hygiène.

III.1.4. Résultats de l'identification biochimique

Les résultats de l'identification biochimique par les tests d'oxydase, catalase et la galerie API 20E sont montrés dans les tableaux et les figures ci-dessous. Toutes les bactéries obtenues se présentent sous la forme des bacilles à Gram négatif et ont réagi positivement pour le test de catalase et négativement pour le test d'oxydase (**Figure 08 et 09**).

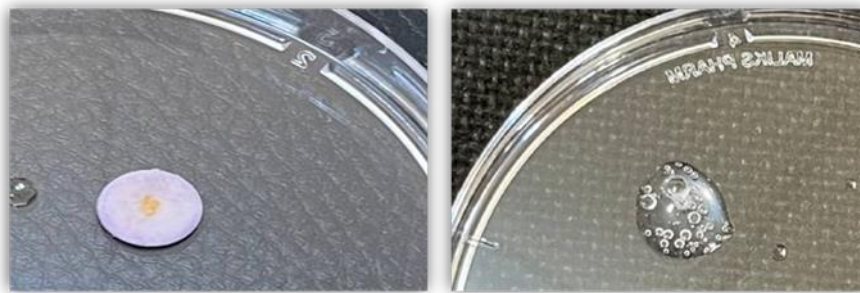


Figure 08 : Test d'oxydase négative et test de catalase positive

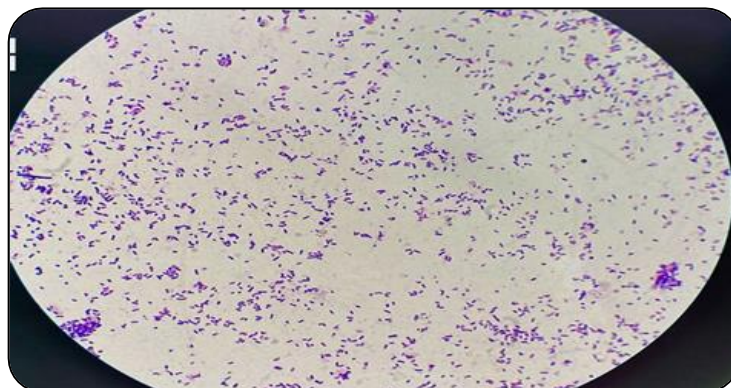


Figure 09 : Coloration de Gram de souches isolées G(x40)

Chapitre III. Résultats et discussion

Le groupe 1 réagit positivement pour les tests : ONPG, VP, GLU, MAN, INO, RHA, SAC, AMY, ARA. Et négativement pour les tests : ADH, LDC, ODC, CIT, H₂S, URE, TDA, IND, GEL, SOR, MEL. Le genre affilié est *Pantoea spp* (Figure 10).

Le groupe 2 réagit positivement pour les tests : ONPG, ADH, ODC, CIT, H₂S, VP, GLU, MAN, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA. Et négativement pour les tests : LDC, URE, TDA, IND, GEL, INO. L'espèce affiliée est *Enterobacter cloacae* (Figure 11).

Le groupe 3 réagit positivement pour les tests : ONPG, CIT, VP, GLU, MAN, SOR, RHA, SAC, MEL, ARA. Et négativement pour les tests : ADH, LDC, ODC, H₂S, URE, TDA, GEL, INO, AMY. L'espèce affiliée est *Rahnella aquatilis* (Figure 12).

Le groupe 4 d'après l'aspect macroscopique et microscopique le genre affilié est *Proteus spp*.



Figure 10 : Galerie Api 20^E de *Pantoea spp*



Figure 11 : Galerie Api 20^E d'*Enterobacter cloacae*.



Figure 12 : Galerie Api 20^E de *Rahnella aquatilis*.

Chapitre III. Résultats et discussion

Tableau III : Résultats des galeries API20E des bactéries isolées.

Les tests Groupes	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	Espèces et Genres affiliées
Groupe 01	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	<i>Pantoea spp</i>
Groupe 02	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter cloacae</i>
Groupe 03	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>Rahnella aquatilis</i>

Chapitre III. Résultats et discussion

III.1.5. Répartition des bactéries à Gram négatifs isolées

Les bactéries à Gram négatif (BGN) représentent 54,5% (24) de l'ensemble des bactéries isolées, parmi ces bactéries, 11 sont non entérobactéries avec un pourcentage de 45,8% et 13 entérobactéries avec un pourcentage de 54,2%.

Le tableau ci-dessous représente la fréquence des entérobactéries avec prédominance de *Pantoea* spp. (38,5%), suivi par *Enterobacter cloacae* (30,8%), et *Rahnella aqualitis* et *Proteus* spp.(15,3% pour chaque espèce) (**Tableau IV**).

Tableau IV. Fréquence des Bacilles à Gram négatifs bactéries isolées.

Souches isolées	Nombre	Pourcentage
<i>Pantoea</i> spp.	5	38,46%
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	30,76%
<i>Rahnella aqualitis</i>	2	15,38%
<i>Proteus</i> spp.	2	15,38%
Total	13	100%

Dans une étude menée par **Méité et al., (2010)** à Abidjan, il a été constaté que *Klebsiella pneumoniae* était l'espèce d'entérobactéries prédominante sur les surfaces hospitalières.

D'après l'étude de **SiddoFarka et al., (2020)** à Niger, les entérobactéries les plus fréquemment retrouvées comprenaient *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*. Ces résultats pourraient être attribués à la fois aux conditions environnementales et aux milieux d'isolement utilisés. Lors d'une recherche similaire menée par **Gbessi et al., (2015)** à Cotonou, ainsi que par **Meité et al., (2010)** aucune bactérie du genre *Klebsiella*, *Salmonella* ou *Shigella* n'a été isolée, contrairement à ce qui a été observé par d'autres auteurs.

Chapitre III. Résultats et discussion

III.1.6. Répartition des souches bactériennes isolées selon les sites de prélèvements

Le tableau ci-dessous est récapitulatif de la répartition des souches selon les sites de prélèvements.

Tableau V: Répartition des bactéries isolées à partir des surfaces selon les sites.

Service de réanimation	Site de prélèvements	Nombre des souches bactériennes	Espèces et Genres trouvées
La chambre 01	Lit de malade	1	<i>Pantoeasp.</i>
	Tube de respiration	0	0
	Seringue électrique	0	0
	Table de scope	0	0
	Interrupteur	0	0
	Lavabo	0	0
	Robinet	0	0
	Sache d'eau	1	<i>Proteus spp.</i>
	Robinet de toilette	0	0
La chambre 02	Siège de toilette	1	<i>Proteus spp.</i>
	Poignée de porte	0	0
	Lit mobile de malade	0	
	Télécommande	0	
	Scope	0	
	Table et Scope	0	
	Lavabo	0	
	Tactile	0	
Le tour de lit	0		
La chambre 03	Couvre de lit	0	
	Table	0	0
	Ecran de scope	1	<i>Enterobacter cloacae</i>
	Seringue électrique	0	0
	Air liquide	0	0
	Table de malade	0	0
Lavabo	1	<i>Enterobacter cloacae</i>	

Chapitre III. Résultats et discussion

Tableau V (suite) : Répartition des bactéries isolées à partir des surfaces selon les sites.

La chambre 04	Poignée de porte	0	
	Moniteur EDAN	0	
	Poignet de lit	0	
	Cadre de la porte	0	
	Lit de malade	1	<i>Enterobacter cloacae</i>
	Graine tête de lit horizontal	0	
	Télécommande	0	
La chambre 05	Lit de malade	0	
	Ecran moniteur	0	
	Table	3	<i>2 Rahnella aqualitis + Pantoea spp.</i>
	Moulage par injection médicale	0	
Le couloir	Poignet de couloir	0	
	Lavabo humide	0	
	Table des produits	0	
La chambre des Médecins	Table des médecines	0	
	Lavabo	2	<i>Enterobacter cloacae+</i> <i>Pantoea spp</i>
	Télécommande	0	
	Paillasse	0	
Prélèvement de L'air	6 prélèvements	2	2 souches de <i>Pantoea spp.</i>

Chapitre III. Résultats et discussion

En ce qui concerne les prélèvements de l'environnement, l'air ambiant, le matériel (lavabos sèches et humide, écran des scopes, lit, tables) et les surfaces, 13 entérobactéries ont été trouvées, *Pantoea* spp. était le genre majoritairement isolé avec une fréquence de 38,46% suivi d'*Enterobactercloacae* 30,76% et 15,38% pour *Rahnella aqualitits* et *Proteus* spp. Une étude effectuée par **Siddo et al.(2020)** en Niger dans le bloc opératoire de l'Hôpital National de Zindera ont montré des résultats différents ; 9 entérobactéries, sur table d'opération, lavabo, deux faces des portes et le Sol, les espèces identifiées étaient *Serratia marcescens* 4,70%, *Enterobacter cloacae* 4,70%, *Enterobacter aerogenes* 4,70%, *Escherichia coli* 2,30% et *Klebsiella pneumoniae* 2,30%.

III.2. Antibiorésistance chez les bactéries isolées

III.2.1. Antibiorésistance chez *Pantoea* spp.

D'après le résultat illustré par la **figure (13)** les souches de *Pantoea* spp sont très sensibles à la C et NIT avec un taux de 100% (n=5), une sensibilité à la FOX, AX, AM, CZ avec un taux de 60% (n=3) et les IPM, AZT, AMC aux taux de 40% (n= 2), et une sensibilité à la CTX, KF, NA, CAZ aux taux de 80% (n=4).

Une résistance importante 100% était observée vis-à-vis de la CTR, et AMC avec un pourcentage 60% (n=3), une résistance de 40% (n=2) vis à vis de la FOX, AZT, AX, AM, CZ et une résistance de 20% (n=1) vis à vis de la IPM, CTX, KF, CAZ, NA.

Concernant les souches à sensibilité intermédiaire lié à la IPM un taux de 40% (n=2), a été noté, 20%(n=1) pour la AZT.

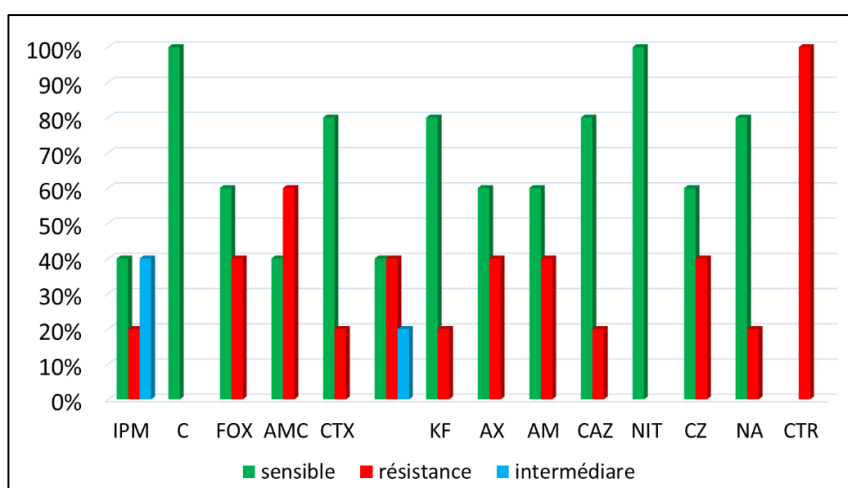


Figure 13: Taux de résistance des *Pantoea* spp. vis-à-vis des ATB testés.

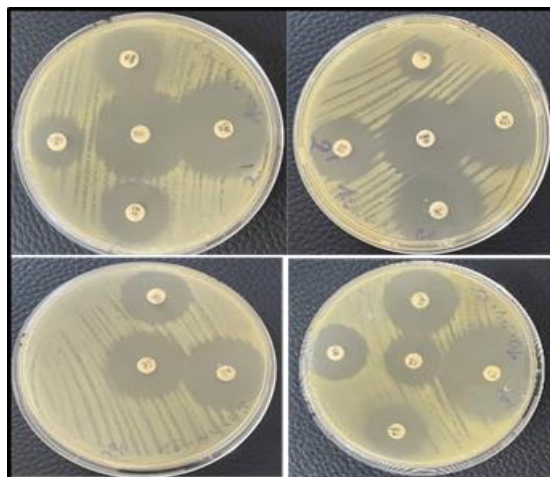


Figure 14 : Zone d'inhibition des antibiotiques testés contre *Pantoea* spp.

Une étude rétrospective similaire réalisée en Hongrie sur une période de 12 ans, du 1er janvier 2006 au 31 décembre 2017, a révélé des taux de résistance de 60% pour l'AMC et de 82,8% pour l'AM (Gajdacs, 2019). Parallèlement, Fazaa et al., (2020) en Irak ont observé une résistance élevée à l'aztréonam (81,8%), à la ticarcilline/acide clavulanique (89,09%) et à la carbapénème (83,6%).

Pantoea spp résiste naturellement aux céphalosporines de 1er génération et certaines aux céphalosporines de 2eme génération et aux aminopénicillines (l'amoxicilline associée ou non à l'acide clavulanique) par la production de céphalosporinase AmpC (Robin et al., 2012).

III.2.2. Antibiorésistance chez *Enterobacter cloacae* :

Selon les résultats de l'antibiogramme illustrés par la figure (15) nous avons remarqué que 100% des souches d'*Enterobacter cloacae* étaient résistantes à l'IPM, C, CL, CZ, FOX, AMC, CTX, CTR, AZT, KF, AX et AM. Concernant le CAZ, 50% des souches étaient résistantes, et pour le NIT 25% étaient résistantes. Tandis qu'une sensibilité était observée vis-à-vis à la NIT avec un taux de 50%.

De plus les souches à sensibilité intermédiaire liées à la CAZ un taux de 50% a été noté, 50% pour la NA, et 25% pour la NIT.

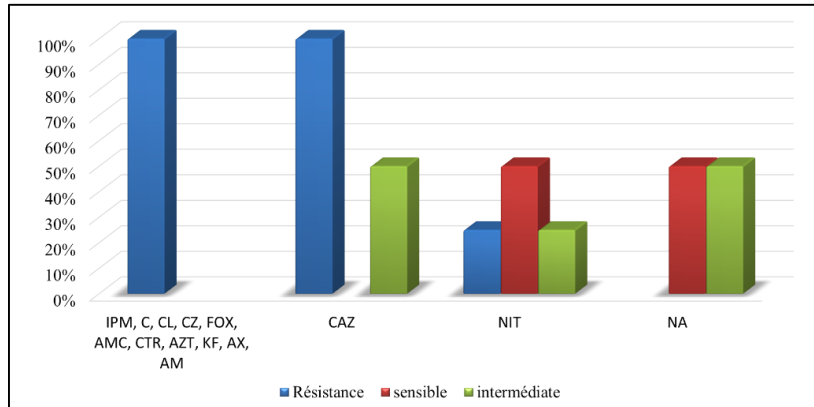


Figure 15: Pourcentage de résistance des *Enterobacter cloacae* vis-à-vis des ATB testés.

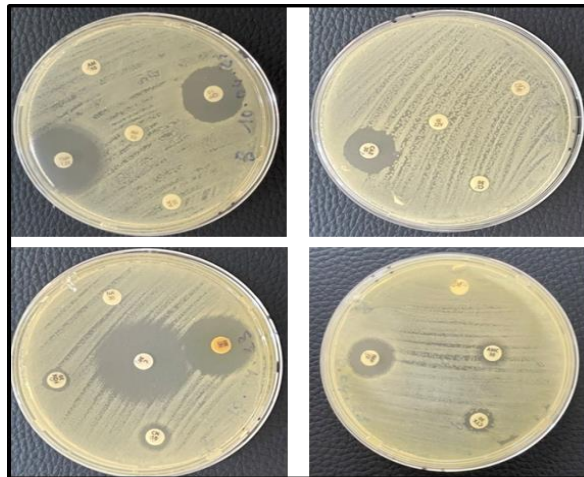


Figure 16 : Zone d'inhibition des antibiotiques testés chez *Enterobacter cloacae*.

D'après une étude qui vise à déterminer le profil de résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries uropathogènes en milieu pédiatrique au CHU de Marrakech réalisée par **Moutachakkir et al.,(2014)** , les résultats ont démontré que parmi 2258 échantillons urinaires, 406 souches d'entérobactéries ont été isolées, *E. coli* était le germe le plus fréquemment isolé (55 %), suivi de *Klebsiella pneumoniae* (30 %), *Enterobacter cloacae* (9 %), *Proteus mirabilis* (3,5%) et de diverses autres espèces (2,5 %) : *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Enterobacter aerogenes* et *Serratia marcescens*.

Malgré sa faible fréquence d'isolement, *E. cloacae* a présenté les taux de résistance les plus élevés pour la majorité des antibiotiques testés. 100 % des souches étaient résistantes aux AMX et AMC, alors que 68% des souches avaient exprimé une résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G).

III.2.3. Antibiorésistance chez *Rahnella aqualitis*:

D'après le résultat illustré par les figures (17 et 18), toutes les souches de *Rahnella aqualitis* étaient sensibles pour le CTX, COT, C, IPM, TR et RIF et résistantes pour CN, alors que 50% des souches étaient observées comme résistantes pour l'AM.

Des souches à sensibilité intermédiaire étaient observées vis-à-vis de l'AZT, CIP et NIT avec un taux de 100% et pour l'AM avec un taux de 50%.

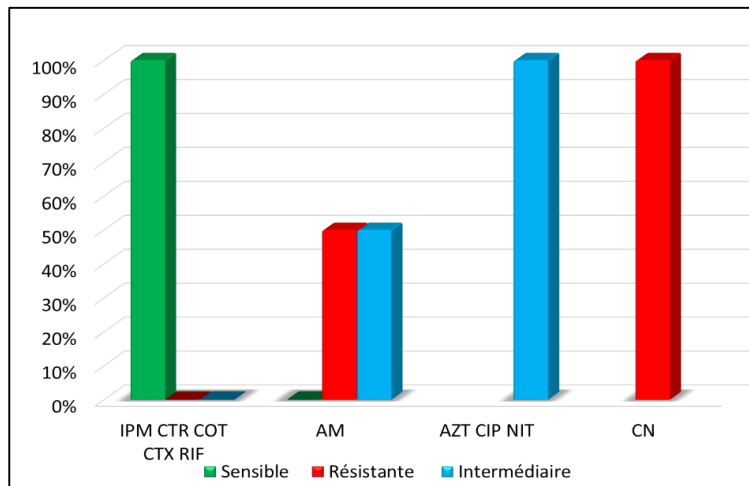


Figure 17 : Pourcentage de résistance des *Rahnella aqualitis* vis-à-vis des ATB testés.

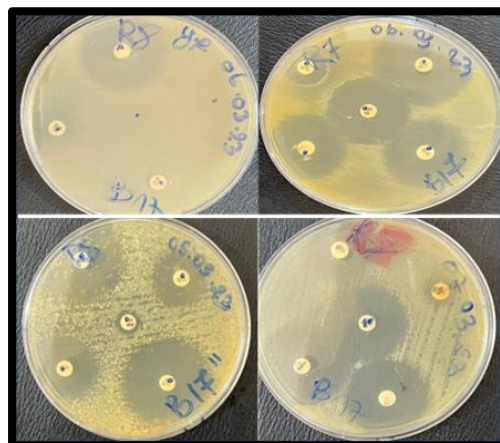


Figure 18: Zone d'inhibition des antibiotiques testés chez *Rahnella aqualitis*.

Des résultats ont été rapportés en France par **Ruimy et al., (2010)**, montrent que les souches de *Rahnella* étaient résistantes ou de sensibilité intermédiaire à toutes les b-lactamines testées à l'exception de la ceftazidime et de l'imipénème.

Chapitre III. Résultats et discussion

De plus, selon **Williames et al., (2015)** toutes les souches de *Rahnella* étaient sensibles aux levofloxacin, ciprofloxacine, gentamicine, amikacine, ampicilline, cefépime, ceftriaxone, aztreonam, imipénem, méropénem.

III.3. Test complémentaires

III.3.1. Répartition des entérobactéries productrices de BLSE selon le test double disque

Dans cette étude 69,23% (n=9) des bactéries sont des producteurs des BLSE ; 100% des souches d'*Enterobacter cloacae* (n=4) sont des BLSE, 100% des souches de *Pantoea* spp (n=5) sont des BLSE, alors que aucune souche de *Rahnella aqualitis* n'est BLSE.

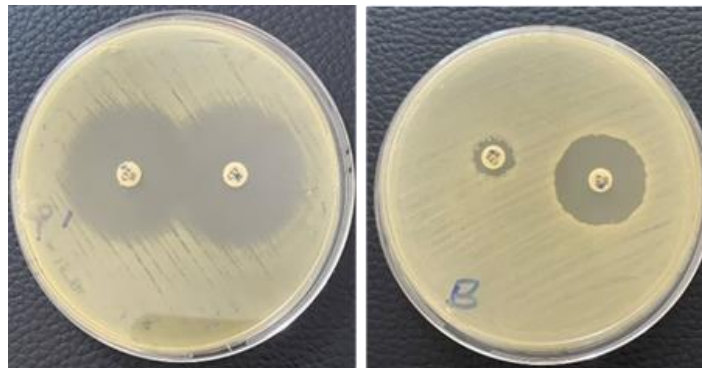


Figure 19 : Test double disque.

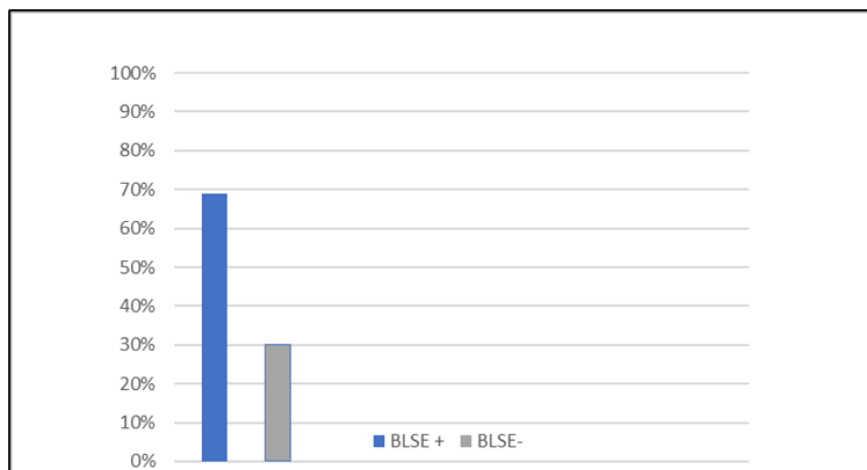


Figure 20 : Répartition des entérobactéries BLSE selon le test double disque

Chapitre III. Résultats et discussion

Ces résultats sont différents à ceux rapportés dans des travaux antérieurs menés par **Ango et al., (2019)** en Côte d'Ivoire, ils ont trouvé que 74,19% des entérobactéries (*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*) produisaient une bêta lactamase à spectre élargie EBLSE.

Dans tous les cas, il a été démontré que l'émergence et la diffusion des souches bactériennes multirésistantes dans l'environnement serait lié aux usages inappropriés des antibiotiques. En plus, les mesures de décontamination semblent inefficaces dans les services de soins, et cela contribuerait à l'émergence de ces Bactéries Multirésistantes dans l'environnement.

III.3.2. Test biofilm :

Une absence de formation de biofilm chez toutes les bactéries isolées (**Figure 21**).



Figure 21 : Absence de la formation de biofilm chez les bactéries isolées sur le milieu Rouge Congo.

Les biofilms sont reconnus comme des réservoirs de diversité génétique qui jouent un rôle crucial dans l'adaptation, l'évolution et la survie des bactéries dans des environnements hostiles. (**Hathroubi et al., 2017**)

La présence du biofilm et de sa matrice d'exopolysaccharides (EPS) crée une barrière solide qui restreint la diffusion des antibiotiques entre les cellules bactériennes. De plus, les polymères chargés de l'EPS peuvent également inactiver ou neutraliser l'action des antibiotiques (**Lebeaux et al., 2014**)

III.3.3. Test de synergie :

L'image de synergie « Bouchon de champagne » qui résulte d'une interaction positive entre les deux antibiotiques (CTX-AMC) a été observée chez les *Pantoea* spp aux taux de 60% (n=4) et est illustrée par la **figure (22)**.

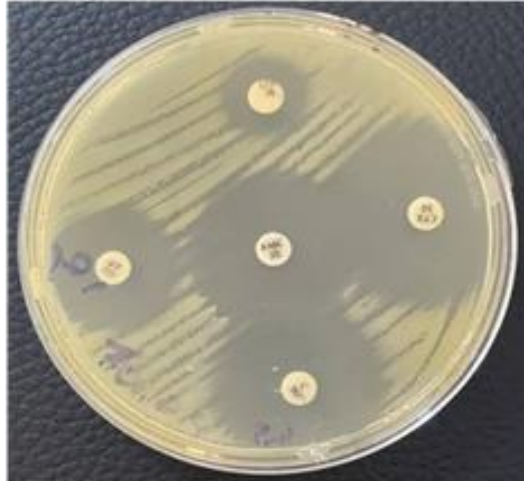


Figure 22 : Image de synergie (BLSE) observée chez *pantoea* spp.

Nos résultats se corroborent avec ceux du **Koné et al., (2016)**, sur l'ensemble des souches d'entérobactéries testées, 17,5% sont des souches productrices de β -lactamase à spectre étendu (BLSE).

Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) sont des enzymes produites par les bactéries qui ont la capacité de décomposer certains antibiotiques, notamment les pénicillines et les céphalosporines de diverses générations ainsi que l'aztréonam. Il s'agit d'un mécanisme de résistance de type plasmidique, ce qui signifie qu'il peut être transmis à d'autres bactéries. Par conséquent, la présence de BLSE dans des souches pathogènes présente un risque majeur d'inadéquation thérapeutique et d'échec du traitement. (**Schwaber et Carmeli, 2007**).

CONCLUSION

Conclusion

Les infections nosocomiales en réanimation, notamment celles dues aux entérobactéries, posent un défi majeur en raison de la gravité des patients, entraînant des complications graves, des hospitalisations prolongées, des coûts de soins élevés et des décès possibles.

Notre étude nous a permis de déterminer la prévalence des entérobactéries les plus retrouvés dans le service de réanimation avec un taux de 54,2% : *Enterobacter*, *Pantoea* et *Rahnella* ainsi que leur profil de résistance. Ces bactéries ont été isolées des différentes surfaces les plus proches des patients. Les résultats montrent que la fréquence d'isolement est importante pour les *Pantoea* spp. avec un taux de 38%, suivi par 30,76 % *Enterobacter cloacae* et 15,38% de *Rahnella aqualitis*.

Les sites les plus contaminés sont ceux qui se retrouvent en contact avec les patients, représentés essentiellement par le lavabo sèche et humide, écran scope, lits, les tables, et l'air ambiant des chambres malades.

D'après les résultats de l'antibiogramme des souches isolées, toutes les souches de *Pantoea* spp présentent une résistance de 100% aux CTR, une résistance de 60% aux AMC, et une résistance de 40% aux FOX, AZT, AX, AM, et CZ. De plus, une résistance de 20% est observée pour les IPM, CTX, KF, CAZ et NA. Pour *Enterobacter cloacae* 100% sont résistance aux IPM, C, CZ, FOX, AMC, CTX, CTR, AZT, KF, AX, AM et une résistance de 50% pour CAZ et 25% vis-à-vis la NIT. Quant à *Rahnella aqualitis*, toutes les souches montrent une résistance totale (100%) aux CN et une résistance de 50% vis-à-vis de la AM.

Concernent la sensibilité des bactéries aux antibiotiques, la totalité des souches *Pantoea* spp et *Rahnella aqualitis* étaient sensible à Chloramphénicol.

En ce qui concerne les tests complémentaires, toutes les souches d'*Enterobacter cloacae* et de *Pantoea* spp se révèlent productrices de BLSE, tandis qu'aucune souche de *Rahnella aqualitis* ne produit de BLSE.

Lors du test de formation de biofilm, aucune des souches d'entérobactéries isolées n'a démontré la capacité de former un biofilm.

L'antibiorésistance est un problème sérieux dans les services de réanimation. En mettant en place des mesures de prévention et de contrôle des infections strictes, en favorisant une utilisation prudente des antibiotiques et en soutenant la recherche de nouvelles thérapies, il est possible de réduire l'impact de l'antibiorésistance sur les patients en réanimation.

Compte tenu des limites de cette étude, notre recherche a révélé la présence des espèces qui sont relativement pathogènes dont les maladies causées par ces bactéries ne

Conclusion

sont pas vraiment graves ou mortelles de sorte que leur traitement par les antibiotiques est toujours disponible.

D'une façon générale, l'analyse a permis de constater que l'état du service de réanimation est bien contrôlé du côté prévention et stérilisation qui est pratiquement continue et soit des surfaces en utilisant les nettoyants désinfectants soit de l'air par l'inactivation des cellules vivantes en utilisant le rayonnement ultraviolet de courte longueur d'onde (une forte action bactéricide).

Pour faire face à ce problème, les services de réanimation doivent mettre en œuvre des mesures de prévention et de contrôle des infections plus rigoureuses. Cela peut inclure des pratiques telles que le lavage des mains régulier, l'utilisation appropriée des équipements de protection individuelle, la désinfection des surfaces et la mise en place de protocoles pour la prescription d'antibiotiques.

En perspective, nous nous proposons :

- ✓ Des études génotypiques sur les mécanismes de résistance bactérienne pour les souches isolées.
- ✓ Élargir et augmenter le nombre des prélèvements à d'autres services de l'hôpital.
- ✓ Améliorer les méthodes d'isolement en utilisant des milieux de culture plus sélectifs pour une meilleure identification des bactéries résistantes.
- ✓ Réaliser plusieurs tests complémentaires afin d'approfondir l'étude et la compréhension des mécanismes de résistance.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

A

Achkour Z. 2012 Emergence de la résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à gram négatif. Thèse de pharmacie. Rabat : Université Mohamed V, 7-8-9

Adeolu, M., Alnajar, S., Naushad, S., & S. Gupta, R. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(12), 5575-5599.

Ango, P., Konan, K., Kouamé, K., Sai, S., Tchimou, A., Adingra, S., Diomandé, S., & Boua, N. (2019). Écologie Microbienne des Surfaces et Dispositifs Médicaux au Service de Réanimation du Centre Hospitalier et Universitaire (CHU) de Treichville. *SCIENCES DE LA SANTÉ ET MALADIES*, 21 (1).

Auckenthaler A., (2009). Que signifie « bêta lactamases à spectre élargi » en pratique

Aweillel., (2017). Détection des carbapénemases chez les entérobactéries. Thèse de doctorat : sciences pharmaceutiques. Université Toulouse Paul Sabatier ,140 p.

B

Berrada S, Touimi G.B, Bennani L, Diarra A. S, Oumokhtar B, El Ouali Lalami A, Houssaini T.S., (2017), Exploration microbiologique des surfaces d'un centre d'hémodialyse de la ville de Fès : étude descriptive transversale. *Revue Francophone Internationale de Recherche Infirmière*, 3(2), 120–128.

Boivin S, Caux C, Soucy C, Allard A., (2016), Les entérobactéries productrices de carbapénémases. *Perspective infirmière*, 13(5), 53-56.

Boone D.R, et Garrity G. 2001, *Bergey's manual of systematic bacteriology. The archaea and the deeply branching and phototropic bacteria*. New york: Springer-verlag,

Brady C, Hunter G, Kirk S, Arnold D, Denman S., (2014). *Rahnella victoriana* sp. nov., *Rahnella bruchi* sp. nov., *Rahnella woolbedingensis* sp. nov., classification of *Rahnella*

*genomospecies 2 and 3 as *Rahnella variigena* sp. nov. and *Rahnella inusitata* sp. nov.*, respectively and emended description of the genus *Rahnella*. Systematic and applied microbiology, 37(8), 545-552.

Brehil H, Bouzeraa A, .Bacteriologie des entérobactéries isolées au niveau du service de réanimation de l'hôpital militaire régional universitaire de Constantine (HMRUC). Mémoire de master, 2018

C

Carle S, (2009). La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important ! Pharmactuel, 42

Cisse H, Vernet-Garnier V, Hentzien M, Bajolet O, Lebrun D, Bonnet M, Bani-Sadr F., (2019). Treatment of bone and joint infections caused by *Enterobacter cloacae* with a fluoroquinolone-cotrimoxazole combination. International Journal of Antimicrobial Agents.

D

Delarras C., (1998), Microbiologie, 90 heures de travaux pratiques : enseignement commun et préparatoire à Génie de l'environnement (p. 1). G. Morin Europe.

Delarras C., (2007), Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire.

Denis F, Ploy M.C, Martin C, Bingen E, et Quentin R., (2007), Bactériologie médicale : Technique usuelles. Ed Elsevier Masson SAS, 335-401

Dong J, Zhang L, Zhou S, Xu N, Yang Q, Liu Y, Ai X., (2020), Identification of a multi-resistant *Enterobacter cloacae* strain from diseased crayfish (*Procambarus clarkii*). Aquaculture Reports, 17, 100405.

Doni F, Suhaimi N, Irawan B, Mohamed Z, Mispan M.S., (2021), Associations of *Pantoea* with Rice Plants: As Friends or Foes? Agriculture, 11, 1278.

D.Yala A.S, Merad D, Mohamedi M.N, OuarKorich., (2001) Résistance bactérienne aux antibiotiques

E

F

Fazaa S.A, Darweesh M.F, Fazaa S. A., (2020). Prevalence of *Pantoea spp.* among recurrent UTI patients with emphasis on risk factors and antibiotic resistance patterns in Al-Qadisiyah hospitals, Iraq. *Ann. Trop. Med. Public Health*, 23, sp231202.

G

Gajdacs M., (2019) Epidemiology and antibiotic resistance trends of *Pantoea* species in a tertiary-care teaching hospital: A 12-year retrospective study.

Gbessi D.G , Aikou N, Hodonou M.A, Lawani I , Amemado M.K.S , Dossou F.M .,(2015). Profil bacteriologique des infections nosocomiales en chirurgie viscérale du CNHU-HKM DE COTONOU. *Journal de la Société de Biologie Clinique*, (022), 13-19.

Guiraud P J. (2012). *Microbiologie alimentaire*. Les presses ISBN; 22: 80- 171.

H

Hathroubi S., Mekni M.A, Domenico P, Nguyen D, Jacques M., (2017). Biofilms: microbial shelters against antibiotics. *Microbial Drug Resistance*, 23(2), 147-156

Huang L, Wu C, Gao H, Xu C, Dai M, Huang L, Hao H, Wang X, Cheng G., (2022) Bacterial Multidrug Efflux Pumps at the Frontline of Antimicrobial Resistance: An Overview. *Antibiotics* 11, 520.

Hyun D. W, Jung M.J, Kim M.S, Shin N.R, Kim P.S, Whon T.W, Bae J.W., (2016). *Proteus cibarius sp. nov.*, a swarming bacterium from Jeotgal, a traditional Korean fermented seafood, and emended description of the genus *Proteus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(6), 2158-2164.

I

J

Janda J.M, Abbott S.L., (2021). The changing face of the family *Enterobacteriaceae* (order:“*Enterobacterales*”): new members, taxonomic issues, geographic expansion, and new diseases and disease syndromes. *Clinical microbiology reviews*, 34(2), e00174-20.

K

Kayser F.H, Böttger E.C, Zinkernagel R.M, Haller O, Eckert J, Deplazes P., (20). Manuel de poche de microbiologie médicale. Flammarion Médecine Sciences.

Khayar Y. Comportement des entérobactéries isolées des urines vis-à-vis de l'amoxicilline acide clavulanique et l'ertapénème. Thèses de doctorat en pharmacie, Université Mohames V, RABAT, université mohammed v de rabat, 2011.

Koné J, Bellahcen B, Awab A, El Moussaoui R, Alilou M, El Hijri A, Azzouzi A., (2016). Extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* in urology at Hospital IbnSina of Rabat. 6(2)

Kämpfer P., (2015). *Rahnella*. Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria, 1-16.

L

Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., & Beloin, C. (2014). Tolérance des biofilms aux antibiotiques : comprendre pour mieux traiter. Journal Des Anti-Infectieux, 16(3), 112–121.

Lopez-Cerero L., (2013). Role of the hospital environment and equipment in the transmission of nosocomial infections. Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica, 32(7), 459-464.

Liassine N., (2000), Problème des pathogènes Gram négatif résistants aux antibiotiques en milieu hospitalier. Schweiz Med Wochenschr ; 130(50) : 1930-1936.

M

Marie-Cécile., (2018) Les antibiorésistances : comment éviter de les générer ?

Martins W, Carvalhaes C.G, Cayô R, Gales A.C, Pignatari A.C., (2015). Co-transmission of *Rahnella aquatilis* between hospitalized patients. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 19, 648-650.

Méité S, Boni-Cissé C, Monemo P, MlanTanoa AP, Faye-ketté H, Dosso H., (2010), Surveillance microbiologique des surfaces au niveau d'un établissement hospitalier de niveau tertiaire: exemple du chu de Yopougon, Abidjan, Cote d'ivoire. J SciPharm Biol; 11(1): 73-81.

Meunier O, Hernandez C, Piroird M, Heiligr, Steinbach D, Freyd A, (2005), Prélèvements bactériologiques des surfaces : importance de l'«étaped»enrichissement et du choix des milieux de culture. *Ann Biol Clin*; 63(5) : 481-6.

Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S., (2012), *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol.* Jul;7(7):887-902.

Moussa N, Moussaoui F., (2016). Recherche des Entérobactéries productrices de Beta-lactamases à spectre élargi dans les viandes de volaille. Mémoire de Master : Microbiologie appliquée à la santé et à l'environnement. Tébessa, Algérie : Université de Tébessa, 57p.

Moutachakkir M, Chinbo M, Elkhoudri N, Soraa N., (2015). La résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries uropathogènes en milieu pédiatrique au CHU de Marrakech. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*, 28(1), 16–22.

Muylaert A, Mainil J. 2012. Résistances bactériennes aux antibiotiques, les mécanismes et leur « contagiosité ». In *Annales de Médecine vétérinaire* (vol.156).Ulg-Université de Liège,Belgium.

N

Nounsi N., (2019). Pénurie en antibiotiques : Quelles alternatives ? (Doctoral dissertation).

O

P

Paitan Y., (2018) Current Trends in Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol* ; 416:181-211.

Q

R

Randriamizao H, Rakotofiringa D, Rakotondrainibe A, Rakotoarison R, Trajaonera A, Andriamanarivo M., (2022), Infections nosocomiales chez les enfants enrénanimationchirurgicale du CHU Joseph RavoahangyAndrianavalona, Antananarivo (Madagascar).

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,(445), 47-58.

Ruimy R, Meziane-Cherif D, Momcilovic S, Arlet G, Andremont A, Courvalin P., 2010 RAHN-2, a chromosomal extended-spectrum class A beta-lactamase from *Rahnella aquatilis*. J Antimicrob Chemother. Aug;65(8):1619-23.

S

Salah F.D, Sadji A.Y, Akolly K, Bidjada B, Awoussi K.S, Abaya A.M, Saka B., (2021). Increase in antibiotic resistance of Enterobacteriaceae isolated at the National Institute of Hygiene of Lomé from 2010 to 2017. J Interval Epidemiol Public Health.

SiddoFarka O, Abdoualye O, Douchi M, Biraima A, Amadou O, Amadou M.L.H., (2020). Détermination de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées de l'environnement du bloc opératoire de l'Hôpital National de Zinder, Niger.

Schwaber M.J, Carmeli Y., (2007). Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Chemother. 60: 913-920.

T

Tambong J.T., (2019) Taxogenomics and systematics of the genus *Pantoea*. Front. Microbiol 10, 2463.

Tani, Z. B. A. K, Arlet G., (2014), Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie. Pathologie Biologie, 62(3), 169-178.

V

Vallée M, Bey E, Le Goux C, Cattoir V, Gaborit B.J., (2018). Résistances bactériennes : que doit savoir l'urologue ? Progrès en Urologie-FMC, 28(4), F103-F106.

Van Bambeke F, Tulkens P, (2008). Pharmacologie et pharmacothérapie anti-infectieuse, Unité de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire, Université catholique de Louvain, 212 p.

W

Wang S, Xiao SZ, Gu FF, et al. (2017), Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of clinical *Enterobacter cloacae* bloodstream isolates in Shanghai, China. *PLoS One*;12(12):e0189713.

Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H., (2020). The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(17), 6278.

Willames M, Carvalhaes C.G, Cayô R, Gales A.C, Pignatari A.C., (2015), Co-transmission of *Rahnella aquatilis* between hospitalized patients, *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, Volume 19, Issue 6, Pages 648-650,

Y

Z

ANNEXES

Annexes

Annexe 01 : Verreries

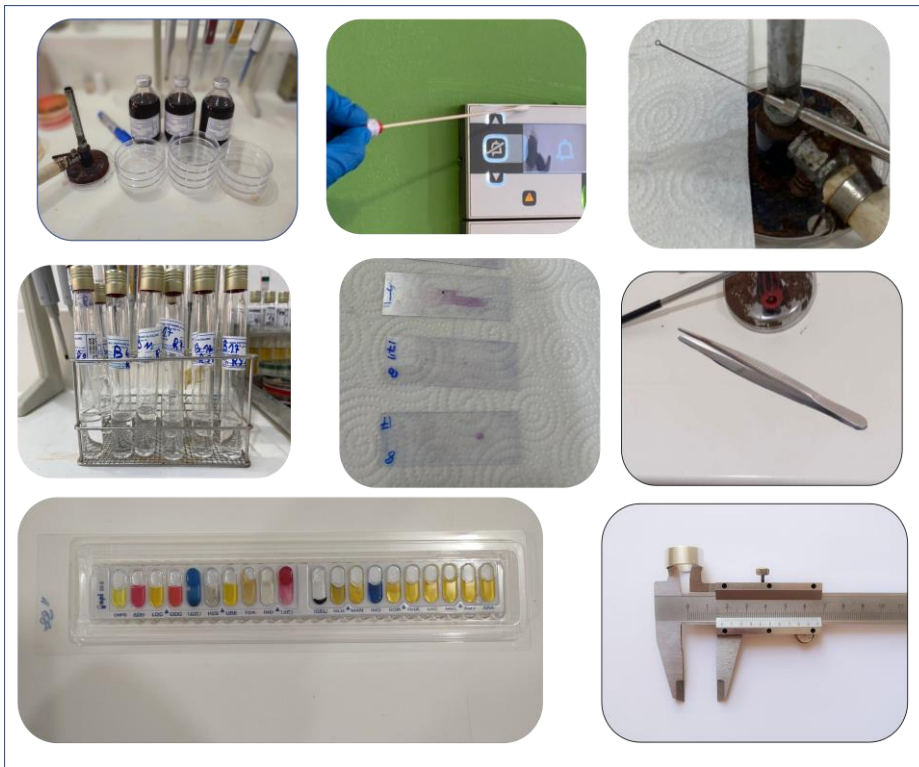


Figure 23 : Verreries utilisées dans les protocoles : Boîte pétrie, Ecouvillon, Anse en platine, Tubes à essai stérile, Lames et lamelles, Pince métallique, Api 20^E, Pied à coulisse, Pipette pasteur stérile.

Annexe 02 : Appareillage



Figure 24 : Appareils utilisés dans les protocoles : Etuve, Autoclave, Microscope optique, Agitateur, Bec Benzèn

Annexes 03: les milieux de culture

➤ **BHIB (Brain Heart Infusion) (bouillon cœur-cervelle) :**

Ingrédients	Gramme/litre
Digestion enzymatique de tissus animaux	10.0 g
Infusion De Cervele De Veau Déshydratée	12.5 g
Infusion de coeur de boeuf déshydraté	5.0 g
Glucose	2.0 g
Chlorure de sodium	5.0 g
Hydrogén ophosphate de sodium	2.5 g



➤ **Gélose nutritive :**

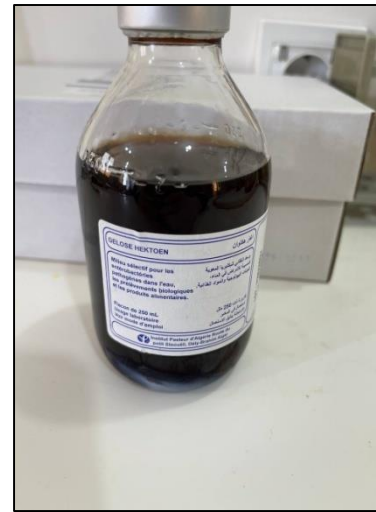
Compositions	g/l
Peptone	10
Extrait de viande	3
Extrait de levure	3
Chlorure de sodium	5
Agar	18
pH	7,3



Annexes

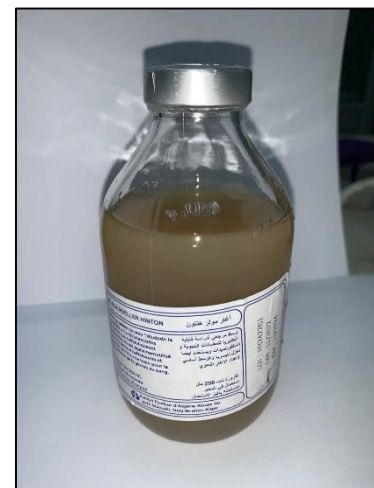
➤ Gélose Hektoen :

Composition	g/l
Peptone pepsique du viande	15
Extrait de viande	3
Extrait de levure	3
Chlorure de sodium	5
Sels biliaires	4
Lactose	12
Salicine	2
Saccharose	12
Fuchsine acide	0.1
Bleu de Bromothymol	0.065
Agar	18
Ph	7.3



➤ Gélose Muller Hinton :

Composition	g/l
Hydrolysate de Caséine	17
Extrait de viande	3
Amidon	1,5
Agar	16
pH	7,3



Annexes

➤ Milieu Rouge Congo :

Composition	g/l
BHIB	37
Saccharose	50
Gélose	10
Rouge congo	8



Annexe 04 : Colorants, solution et réactifs

- Les colorants : (pour coloration de gram)



Figure 25 : Colorants utilisés dans la coloration de Gram Violet de gentiane, Lugol, Alcool, Fuchsine

Annexes

- Les solutions et les disques utilisés :



Figure 26 : Disques d'oxydase et eau oxygénée

- Les réactifs d'Api 20E :



Figure 27: Réactifs utilisés dans la galerie TDA, VP1, VP2, Kovacs.

