



République algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Abbès Laghrou – Khenchela
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de la biologie moléculaire et cellulaire

Mémoire
Soutenu en vue de l'obtention du diplôme
de master en microbiologie appliquée

THEME

**Etude de la résistance aux antibiotiques des
bactéries à gram négatif Dans le milieu
hospitalier**

Présenté par :

HADJADJ Aïmed

MEDAREGNAROU Sabah

BOUCHERIT Charif

Encadré par

Mr. BOUSSAA Abdelhalim

ANNEE UNIVERSITAIRE 2020 – 2021

Remerciements

Avant tout nous remercions "Allah" tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Au terme de ce modeste travail, nous tenons à remercier :

Notre respecté encadreur BOUSSAA Abdelhalime, pour son encadrement, ses nombreux conseils et ses compétences scientifiques qui nous ont aidés tout au long de ce travail. Merci pour son soutien, ses nombreux encouragements et sa confiance.

Les membres de jury, Que chacun d'entre eux soit vivement remercié de nous avoir fait l'honneur d'accepter, de participer à ce jury, et le plaisir d'assister à notre soutenance.

Recevez, l'expression de notre respectueuse gratitude pour l'attention et l'intérêt qui a été porté à ce travail.

Nous tenons à remercier aussi, Le personnel de l'établissement Public Hospitalier Ahmed Ben Bella.

Nos enseignants de la faculté des sciences de la nature et de la vie.

Enfin, nous n'oublions pas de dire merci à nos familles car sans eux ce travail n'aurait pas vu le jour, et à tout ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail, soient assurés de notre profonde gratitude.

Table des matières	
Liste d'abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	

Introduction	1
--------------------	---

I. Généralités sur les antibiotiques

1. Historique	4
2. Définition et origine des antibiotiques	5
2.1. Définition des antibiotiques	5
2.2. Origine des antibiotiques	5
2.2.1. Origine naturelle	6
2.2.2. Origine synthétique	6
3. Critères d'efficacité d'un antibiotique	6
4. Modes d'action des antibiotiques	7
5. La classification des antibiotiques	8
5.1. Les grandes familles des antibiotiques	8
5.2. Les bêtalactamines	9
5.2.1. Les pénicillines	10
5.2.2. Les céphalosporines	10
5.2.3. Les carbapénèmes	11
5.2.4. Les monobactames	12
5.3. Mécanisme d'action des β -lactamines	12

II. Résistance bactérienne

1. Définition	16
2. Notions générales de résistance	16
3. Émergence et propagation de souches résistantes	17
4. Les principaux facteurs contribuant à l'émergence de la résistance bactérienne.	19
5. Type de résistance	20
5.1. Résistance innée ou naturelle	20
5.2. Résistance acquise	22
5.3. Mécanismes de résistance	22
5.3.1. Diminution de la quantité d'antibiotique atteignant la cible	23

5.3.2. Modification ou protection de la cible de l'antibiotique	23
5.3.3. Inactivation enzymatiques de l'antibiotique	24

III. Resistance aux β - lactamines

1. Mécanismes de résistance des bacilles à Gram négatif aux β -lactamines	27
1.1. Destruction enzymatique	27
1.2. Modification de la cible	28
1.3. Perméabilité de la paroi	29
1.4. Pompe à efflux	30
2. β -Lactamases à spectre étendu BLSE	31
2.1. Diversité d'enzymes	32
2.1.1. Type TEM	32
2.1.2. Type SHV	32
2.1.3. Type OXA	32
2.1.4. Type CTX-M.....	33
2.1.5. Autres types de BLSE.....	33
3. Inhibiteurs de la β -lactamase	36

VI. Matériel et méthodes

1. Lieu de l'étude	39
2. Étude bactériologique	39
2.1. Isolement	40
2.2. Identification	40
2.2.1. Aspect macroscopique des colonies	41
2.2.2. Examen microscopique des bactéries	42
2.2.3. Identification biochimique	43
3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques	48
3.1. Technique de diffusion des disques en milieu gélose	48
3.2. Tests complémentaires	50
3.2.1. Recherche de la β -lactamase à spectre élargi (BLSE) chez les entérobactéries, <i>pseudomonas aeruginosa</i> et <i>acinetobacter spp.</i>	51
3.2.2. Méthodes de détection de la BLSE	51

V. Résultats

1. Souches bactérienne	54
1.1. Répartition des souches selon le sexe des patients	54
1.2. Répartition des souches selon l'âge des patients	55
1.3. Répartition des souches selon la nature du prélèvement	56
2. Identification des souches	57
2.1. Examen macroscopique	57
2.2. Examen microscopique	58
2.3. Résultats de l'identification par la galerie Api20E	60
3. Etude de sensibilité aux antibiotiques	61
3.1. Étude de la sensibilité aux β -lactamines	61
3.2. Étude de la sensibilité aux autres familles d'antibiotiques	62
4. Analyse des souches résistantes aux carbapénèmes	63
4.1. Caractéristiques des souches résistantes aux carbapénèmes	63
4.2. Résistance des souches aux β -lactamines	63
4.3. Étude de la sensibilité aux autres familles d'antibiotiques	64
Discussion générale	68
Conclusion	71

Références bibliographiques

Annexes

Résumés

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

AAC : Acétyltransférases.
ADH : Arginine Dihydrolase.
ADN : Acide Désoxyribonucléique.
AK: Amikacine.
AMC /AUG: Amoxicilline/Acide clavulanique.
AMP: Ampiciline.
AmpC: Chromosomal located Cephalosporinase.
ANT : Nucléotidyltransférases.
APA : l'Acide AminoPénicillanique.
APH : Aminosides-Phosphotransférases.
API20E : Analytical Profile Index 20E (E= Entérobacéries).
ARG : Acquisition de Gènes de Résistance.
ATCC : American Type Culture Collection.
ATM: Aztréonam.
BGN : Bacille à Gram Négatif.
BLA: Beta-Lactamase.
BLSE : β -Lactamase à Spectre Etendu.
BN : Bouillon Nutritif.
C: Chloramphénicol.
C1G: Céphalosporine de 1^{ère} Génération.
C2G: Céphalosporine de 2^{ème} Génération.
C3G : Céphalosporine de 3^{ème} Génération.
C4G: Céphalosporine de 4^{ème} Génération.
CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
CAZ: Céfotaxime.
CIP: Ciprofloxacine.
CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute.
Cm :Centimètre.
CMI: Concentration Minimale Inhibitrice.
CN: Gentamicine.
CT : Colistine.
CTX: Céfotaxime.
CTX-M : Cefotaximase, first isolated at Munich.
CZ: Cefazoline.
DD-test : Double Disque Test.
DNase : Désoxyribonucléase.
ECBU : Examen Cytobactériologique des Urines.
EDTA: EthyleneDiamine Tetra -acetic -Acid.
EGM : Eléments Génétiques Mobiles.
EMA : Enzymes Modifiant les Aminosides.
EMB: Eosine Bleu de Méthylène.
EPC : Entérobactéries Productrices de Carbapénémases.
EPH : Etablissement Publique Hospitaliers.
ETP: Ertapénème.
F: Nitofurane.
FF: Fosfomycine.
FOX: Céfoxitine.
G+C : Guanine+Cytosine.
Glu : Glutamate ou acide Glutamique

Gly : Glycine.
GN : Gélose Nutritive.
GP : Gram Positif.
H : Heure.
I : Intermédiaire.
Im : Voie Intramusculaire
IMP : Imipenemase.
IMP: Imipénéme.
IND: Indole.
IS : Insertion Sequence (séquence d'insertion).
Iv : Voie Intraveineuse
KES : Klebsiella, Enterobacter, Serratia.
KF :Céfalotine.
LCR : Liquide Céphalo-Rachidien.
LDC : Lysine Décarboxylase.
LEV: Levofloxacin.
LM-EHP-ABB : laboratoire central de l'Etablissement Public Hospitalier Ahmed Ben Bella
Lys : Lysine.
MBL : Métallo β -Lactamases.
MDR : Multidrug Resistance.
Mex : Multiple efflux.
MH : Mueller Hinton.
MRSA: *Staphylococcus aureus* Méthicillino-Résistant.
M_r : Masse Moléculaire Relative
M β L : Métallo-bêta-Lactamase.
NA: Acide Nalidixique.
NAG: N-Acétyleglucosamine.
NAM: Acide N-acétylmuramique.
NDM : New Dehli metallo- β -lactamase.
NET: Netilmicine.
ODC : Ornithine décarboxylase.
OXA : Oxacillinase.
PBP : Penicillin Binding Protein.
PDP : Prélèvement Distal Protégé.
pH : Potentiel Hydrogène.
PLP (PBP): Protéine liant les pénicillines.
PRL: Pipracilline.
R : Résistante.
RND : Resistance Nodulation cell Division.
S : Sensible.
Ser : Sérine.
SHV: Sulfhydryl Variable.
Sp : Espèce.
SPP : Abréviation de species au pluriel représente l'ensemble des espèces du genre.
Subsp : Sous espèce.
SXT: Cotrimoxazole (Triméthoprime-sulfaméthoxazole).
TC: Ticarcillin.
TDA: Tryptophane Désaminase.
TEM : Temoniera.

TIM: Ticarcilline + Acide clavulanique.
TOB: Tobramycine.
TRI : TEM Résistantes aux Inhibiteurs.
TSI : Triple Sucre à Identifié.
UFC : unité formant colonie.
VIM : Verona Imipenamase.
VO : Voie Orale
VP : Vosges-Proskauer.

Liste des figures

Figure 1: a) Ernest Duchesne; b) Portrait d'Alexander Fleming.....	4
Figure 2. a) <i>Penicillium</i> , b) <i>Les Staphylocoques</i> ne se développent pas à proximité de <i>Penicillium notatum</i>	5
Figure 3. Structure membranaire des bactéries Gram positif et Gram négatif.....	7
Figure 4 : Les cibles attaquées par les différentes classes d'antibiotiques.....	8
Figure 5 : Squelette d'une bêta lactamine	9
Figure 6. Structure chimique des classes de β -lactamines.....	12
Figure 7. Mécanisme d'action des β -lactamines.....	14
Figure 8. Sélection de souches résistantes aux antimicrobiens.....	16
Figure 9. Émergence et propagation de souches résistantes.....	18
Figure 10. Cercle de la résistance bactérienne.....	18
Figure 11 : Mécanismes moléculaires de résistances aux antibiotiques chez les bactéries Gram-négatif.	25
Figure 12 :a) Inactivation enzymatique de l'antibiotique ; b): Ouverture du noyau β -lactame par des β -lactamases.....	28
Figure 13: Modification de la cible.....	29
Figure 14 : Imperméabilité chez les Gram – , nombre de porines/altération de porines...	30
Figure 15: Pompe à efflux.....	31
Figure 16: Phylogramme de 84 séquences peptidiques de bêta-lactamases appartenant à la classe A.....	34
Figure 17. Inhibiteurs des β -lactamases à mécanisme suicidaire.....	37
Figure 18 ; Figure18; a). Laboratoire de microbiologie, b) Microscope optique.....	39
Figures 19-20. Ensemencement à partir d'urine sur gélose nutritive LM-EPH-ABB.....	40
Figure 21: Principe de la coloration de Gram.....	42
Figure 22 . Coloration de Gram appliquée à un mélange de germes	43
Figure 23. Test oxydase	44
Figure 24. Test de coagulase.....	44
Figure 25. Galerie biochimique Api 20 E.....	45
Figure 26. Galerie Api 20 E Négative.....	47
Figure 27. Galerie Api 20 E Positive.....	47
Figures 28-29. Réalisation de l'antibiogramme.....	50
Figure 30. Fréquence des souches de BGN isolées.....	54
Figure 31. Répartition des souches de BGN par sexe de patients.....	55

Figure 32. Répartition des souches de BGN par catégorie d'âge.....	55
Figure 33. Répartition des souches de BGN selon la nature du prélèvement.....	56
Figure 34. Entérobactéries H₂S + sur Hektoen.....	57
Figure 35. <i>Pseudomonas</i> sur Hektoen.....	57
Figure 36. Examen à l'objectif x100 à l'état frais (urines).....	58
Figure 37 : Coloration au bleu de méthylène examen à l'objectif x100 (urines).....	58
Figure 38. Examen à l'objectif x100 (Cocci Gram +).....	59
Figure 39. Api 20 E d' <i>Enterobacter cloacae</i> (N° D 822).....	60
Figure 40. Api 20 E d' <i>E. coli</i> (N° U 820).....	60
Figure 41. Taux de résistance aux β -lactamines par espèces.....	61
Figure 42. Taux de résistance aux autres familles d'antibiotiques par espèces.....	62
Figure 43. Souche <i>E. cloacae</i> résistante aux β -lactamines (N° D 822).....	63
Figure 44-45. Souche <i>K. pneumoniae</i> résistante à (N° U 784).....	64
Figure 46. Image en bouchon de champagne entre AMC et ATM (N° U 774).....	65
Figure 47. Image en bouchon de champagne entre AMC – ATM et AMC – CAZ.....	65
Figure 48. a) Test de synergie entre AMC–CTX–ATM. b) Résultat <i>K. pneumoniae</i>	66
Figure 49. a) Test du double disque CTX et AMC puis CTX. b) Résultat <i>Klebsiella pneumoniae</i>	66

Liste des tableaux

Tableau I. Facteurs contribuant à la résistance aux antibiotiques.....	19
Tableau II. Résistances naturelles chez les entérobactéries	21
Tableau III. Résistances naturelles chez les bacilles à Gram négatif non fermentaires.....	21
Tableau IV : β -lactamines : comportement habituel en fonction du type de β -lactamase	35
Tableau V. Tableau récapitulatif des différentes recherches complémentaires	50
Tableau VI. Répartition des souches de BGN selon la nature du prélèvement.....	56
Tableau VII: Résultat de l'identification biochimique des bactéries par les galeries API 20 ^E	60
Tableau VIII. Taux de résistance aux β -lactamines par espèces.....	61
Tableau IX: Taux de résistance aux autres familles d'antibiotiques par espèces.....	62
Tableau X: Sensibilité des souches de BGN aux β -lactamines testées.....	63
Tableau XI: Sensibilité des souches de BGN aux autres familles d'antibiotiques.....	64

Introduction

Introduction

La résistance aux antibiotiques est depuis quelques années maintenue un sujet d'actualité qui touche, malgré les nombreuses recommandations et les nombreux moyens de communication, de plus en plus de personnes dans le monde entier. La résistance aux antibiotiques et plus largement aux anti-infectieux devient même une situation préoccupante mondialement car l'antibiorésistance pourrait devenir dans un futur proche l'une des causes principales de décès dans le monde.

Cependant, même si la découverte de nouveaux antibiotiques semble être au ralenti depuis de nombreuses années, de nouvelles stratégies et de nouvelles alternatives sont en train d'émerger et de fournir des réponses au fléau de la résistance bactérienne. (Veyssiere, 2019)

La situation apparaît particulièrement préoccupante en milieu hospitalier. La pression de sélection exercée par l'utilisation importante de l'antibiothérapie et la diffusion épidémique des souches résistantes sont les deux facteurs principaux conditionnant cette évolution.

Les bacilles à Gram négatif occupent une place très importante parmi les germes responsables d'infections nosocomiales. Ces bactéries ont un niveau de résistance naturel élevé, en relation avec différents mécanismes de résistance : sécrétion d'enzymes, imperméabilité membranaire, efflux. Elles peuvent acquérir des résistances qui peuvent être le fait d'une mutation chromosomique ou de l'acquisition de plasmides de résistance. Alors que la résistance par mutation chromosomique ne se transmet pas horizontalement, la résistance par acquisition de plasmides de résistance peut être transmise d'une bactérie à une autre, d'où son caractère épidémique.

L'exploitation de ces connaissances permettra :

- d'élaborer de nouvelles méthodes de diagnostic et d'identification des mécanismes de résistance ;
- d'entreprendre la recherche d'alternatives thérapeutiques face aux résistances,
- de prévenir et de ralentir la diffusion de souches mutirésistantes et d'optimiser le choix de l'antibiothérapie. (Pagès et Garnotel, 2003).

Ainsi cette étude a été menée au niveau de l'Etablissement Public Hospitalier (EPH) Ahmed Ben Bella de Khenchela (laboratoire de microbiologie) dans le but d'évaluer des niveaux de résistance aux antibiotiques les plus communément utilisés : β -lactamines plus particulièrement.

Introduction

La première partie de cette étude est consacrée à une synthèse bibliographique sur les antibiotiques plus précisément les β -lactamines ainsi qu'aux origines et mécanismes de résistances mis en jeu par les bactéries à Gram négatif.

La 2ème partie, décrit le matériel et méthodes pour l'analyse détaillée de nos souches cliniques isolées des patients hospitalisés aux différents services de l'hôpital de Khenchela.

Et enfin, la 3ème partie est réservée à la présentation et discussion de l'ensemble des résultats obtenus.

Résistance bactérienne

Résistance bactérienne

1. Définition

La résistance aux antibiotiques est un processus naturel qui a existé avant l'usage des antibiotiques par l'Homme. L'utilisation d'antibiotiques, d'antiseptiques et de désinfectants sur une bactérie entraîne la sélection de mutants résistants qui seront capables de se multiplier en présence de ces anti-infectieux (Inserm, 2020).

2. Notions générales de résistance

On considère qu'un **micro-organisme** est « **résistant** » lorsque sa CMI (concentration minimale inhibitrice) est plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce.

En fait, la **souche** est « **résistante** » quand la concentration d'antibiotique à laquelle elle peut résister est plus élevée que la concentration atteinte in vivo suite à un traitement (Carle, 2009).

Une **résistance** à un antibiotique peut conférer une **résistance à un autre antibiotique** «**résistance croisée**».

Après accumulation de **résistances naturelles** et **acquises**, une bactérie n'est sensible qu'à un petit nombre d'antibiotiques, elle est donc «**multirésistante**». Elle résiste donc à plusieurs antibiotiques ou classes d'antibiotiques à la fois. (Carle, 2009).

Pression de sélection: Processus conduisant à l'évolution des espèces vivantes sous la contrainte environnementale d'un facteur (biotique ou abiotiques) aboutissant à l'émergence de populations plus adaptées à la contrainte environnementale (ANSES, 2020) (Ola Sköld, 2011).

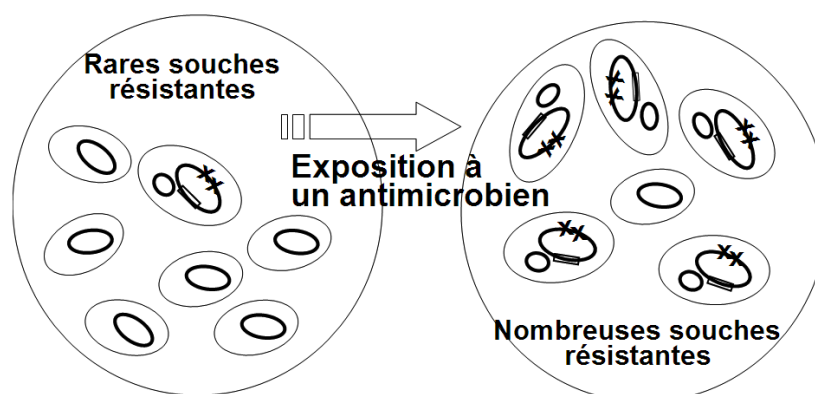


Figure 8. Sélection de souches résistantes aux antimicrobiens (ANSES, 2020)

3. Émergence et propagation de souches résistantes

La pression sélective exercée par les agents antimicrobiens et la transmission de micro-organismes résistants favorisent l'émergence et la propagation de la résistance aux antibiotiques.

La survie de souches bactériennes résistantes est favorisée par l'exposition à un antimicrobien. Réduire la pression sélective des antibiotiques est primordial pour empêcher l'émergence de résistance microbienne et garder longtemps l'efficacité des antibiotiques disponibles.

La figure 9 illustre la pression sélective de la résistance. Elle décrit également les étapes qui succèdent à une mutation spontanée dans une population bactérienne. Si la mutation favorise l'émergence de résistance à un antibiotique, celui-ci va éliminer les autres souches et sélectionner la souche mutante. Les mutants se multiplient et deviennent alors prédominants **(Carle, 2009) (Ola Sköld, 2011)**.

Cependant, la sélection et la transmission de l'antibiorésistance ont deux particularités qui complexent leur dynamique:

D'abord, les traitements affectent parallèlement les microbiotes de l'Homme, des animaux et les communautés environnementales, par la modification de leur composition et la sélection de souches résistantes qui vont se transmettre à d'autres hôtes.

Aussi, une autre particularité de la résistance vient de l'acquisition de gènes de résistance (ARG) qui codent pour la synthèse de pompes d'efflux ou d'enzymes modifiant la cible d'antibiotiques ou les inactivant.

Les gènes de résistance se trouvent souvent sur des éléments génétiques mobiles (EGM) plasmidiques ou intégratifs, qui peuvent se transmettre d'une bactérie de la même espèce à l'autre ou même entre espèces phylogénétiquement différentes. Sélection (émergence), transmission et dissémination de la l'antibiorésistance ne sont pas basées uniquement sur la circulation de souches, mais aussi sur celle des EGM dans de multiples réservoirs que représentent l'homme, l'animal et l'environnement sous de multiples pressions évolutives **(Inserm, 2020)**.

Quand les mesures de lutte anti-infectieuse sont défectueuses, à l'image du lavage des mains, les clones résistants se propagent d'un individu à l'autre et donnent une éclosion monoclonale ou oligoclonale, donc toutes les bactéries résistantes sont identiques à la souche originale mutante ou peuvent présenter peu de clones. A l'inverse, la pression de sélection aux antibiotiques donne une épidémiologie polyclonale, donc la présence de clones multiples. La figure 10 explique l'interaction entre ces deux facteurs sur l'apparition et la dissémination de souches bactériennes résistantes (Carle, 2009).

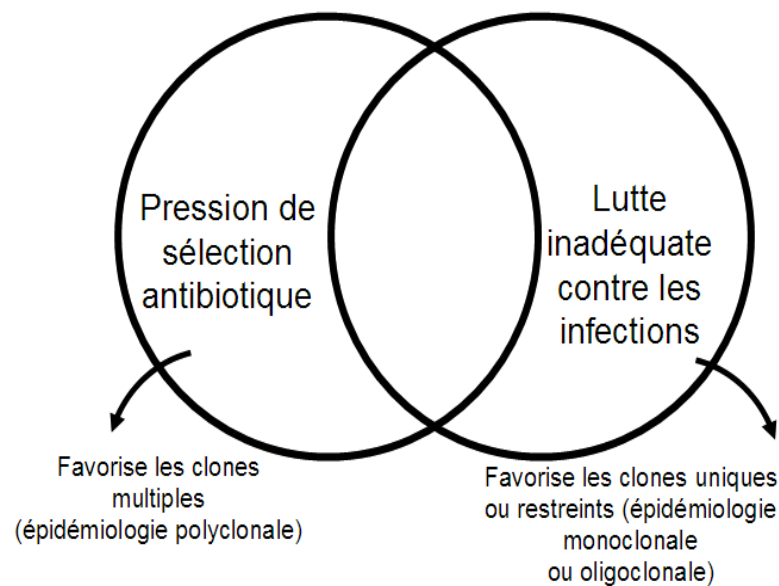


Figure 9. Émergence et propagation de souches résistantes.(Carle, 2009).

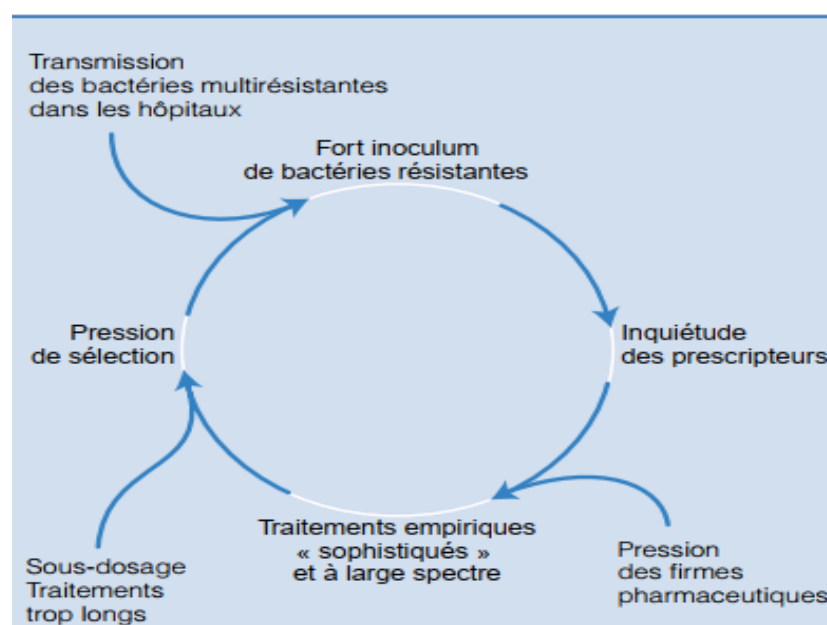


Figure 10. Cercle de la résistance bactérienne (Carlet et al., 1998)**4. Les principaux facteurs contribuant à l'émergence de la résistance bactérienne**

Les principaux facteurs contribuant à l'émergence et à la propagation de la résistance bactérienne sont présentés au tableau I.

Tableau I. Facteurs contribuant à la résistance aux antibiotiques (Carle, 2009).

Facteurs	Exemples (liste non exhaustive)
Emergence de la résistance	Usage abusive d'antibiotiques ; Gravité accrue de l'état des malades hospitalisés ; Manque de fidélité au traitement ; Durée trop courte ou dose sous-thérapeutique ; Diagnostique non confirmé d'infection bactérienne ; Utilisation inadéquate d'antibiotiques dans les pays en voie de développement.
Propagation des souches résistante	Mesures d'hygiène inadéquates dans les hôpitaux ; Non respect des directives de lutte contre les infections ; Promiscuité des patients hospitalisés ; Réduction du personnel infirmier et de soutien ; Déplacement accrus des patients (transferts de patients colonisés ou infectés entre hôpitaux et milieu communautaire) ; Voyages internationaux
Utilisation d'antibiotiques dans le secteur agro-alimentaire	Animaux destinés à la consommation ; Agriculture et aquaculture
Utilisation d'antiseptiques et de désinfectants	Agents antibactériens dans les produits d'entretiens ménager, le dentifrice, les pastilles contre le mal de gorge, les savons, etc.

5. Type de résistance

5.1. Résistance innée ou naturelle

On parle de résistance naturelle lorsque toutes les souches d'une même espèce bactérienne sont résistantes à un antibiotique donné. Il s'agit en fait de bactéries qui sont insensibles au mode d'action de l'antibiotique (**VIDAL, 2021b**).

Elle est toujours transmissible à la descendance (transmission verticale), car portée par le chromosome, alors que la transmission horizontale est très rare ou inexistante (**Jehel et al., 2011**). Exemple de bactéries résistantes naturellement à certains molécules d'antibiotique : *K. pneumoniae* est naturellement résistant aux pénicillines (amoxicilline, ticarcilline) par production d'une bêta-lactamase de classe A (type SHV-1).

Pour un antibiotique donné, l'ensemble des espèces bactériennes qui y sont sensibles représente son spectre d'activité. Ces notions de résistance naturelle et de spectre sont importantes : elles expliquent pourquoi certains antibiotiques sont incapables de combattre certaines bactéries. Celle-ci constitue également un marqueur d'identification de la bactérie.

La résistance naturelle n'est pas ou peu transmissible sur un mode horizontal c'est-à-dire d'une bactérie à l'autre au sein d'une même espèce ou entre espèces différentes. La résistance naturelle est connue et peut donc être contournée en élargissant le spectre des antibiotiques par modification de leur structure chimique car il s'agit en fait de bactéries qui sont insensibles au mode d'action de l'antibiotique (**Robin et al., 2011**).

Exemples

- **Bacilles à gram négatif non exigeants :**

Pénicilline G, oxacilline, macrolides (érythromycine), lincosamides (lincomycine), streptogramines (pristinamycine), acide fusidique, glycopeptides (vancomycine).

Tableau II. Résistances naturelles chez les entérobactéries (RASRBA, 2014).

Bactérie	AMP/AMX	AMP	TIC/PIP	C1G	FOX	GEN	TCY	COL	NIT
<i>Klebsiella spp</i>	R		R						
<i>C.koseri</i>	R		R						
<i>C. freundii</i>	R	R		R	R				
<i>E. cloacae</i>	R	R		R	R				
<i>E. aerogenes</i>	R	R		R	R				
<i>S. marcescens</i>	R	R		R				R	
<i>P. mirabilis</i>							R	R	R
<i>P. vulgaris</i>	R			R			R	R	R
<i>M. morganii</i>	R	R		R			R	R	R
<i>P.stuartii</i>	R	R		R		R	R	R	R
<i>Y. enterocolitica</i>	R	R	R	R	R				

R : résistance naturelle

- **Autres Bacilles à Gram négatif non exigeants :**

Pseudomonas aeruginosa : aminopénicillines, céphalosporines 1^{ère} et 2^{ème} génération, céfotaxime, céftriaxone, kanamycine, tétracyclines, chloramphénicol, triméthoprime, quinolones.

Acinetobacter baumannii, *Acinetobacter calcoaceticus* : aminopénicillines, céphalosporines

1^{ère} et 2^{ème} génération, fosfomycine, triméthoprime, furanes.

Autres BGN non fermentaires : aminopénicillines, céphalosporines 1^{ère} et 2^{ème} générations et ertapénème.

Tableau III. Résistances naturelles chez les bacilles à Gram négatif non fermentaires (RASRBA, 2014)

Bactérie	TIC	TCC	PIP	CTX	CAZ	IMP	QUI	CHL	TMP	FOS	COL
<i>S. maltophilia</i>	R		R	R		R			R	R	
<i>B. cepacia</i>	R	R				R	R	R	R	R	R
<i>A.dentrificans</i>				R							
<i>A.meningosepticum</i>	R	R	R	R	R	R	R				R
<i>O. antropi</i>	R	R	R	R	R						

R : résistance naturelle

Aeromonas: Aminopénicillines (sauf *Aeromonas trota*), céphalosporines de 1^{ère} et de 2^{ème} génération (sauf *Aeromonas veronii*), ertapénème.

- **Bacilles à gram négatif exigeants:**

Haemophilus : macrolides (cycle à 16 atomes : spiramycine, josamycine, midécamycine),
lincosamides.

- **Coques à gram négatif:**

Neisseria : triméthoprime, glycopeptides;

Neisseria meningitidis - *Neisseria gonorrhoeae* : lincosamides, colistine,

Branhamella catarrhalis : lincosamides, triméthoprime.

Moraxella : triméthoprime.

5.2. Résistance acquise

On parle de résistance acquise lorsqu'une ou plusieurs souches d'une espèce bactérienne naturellement sensible à un antibiotique y deviennent résistantes. La résistance acquise se caractérise donc par l'apparition subite d'une résistance à un ou plusieurs antibiotiques chez certaines bactéries qui étaient auparavant sensibles (**Prescott et al., 2007**).

La résistance acquise ne concerne, elle, qu'une proportion plus ou moins importante, variable dans le temps, de souches d'une espèce ou d'un genre, elle existe grâce à l'acquisition d'un (ou plusieurs) mécanisme (s) de résistance qui détermine (nt) un phénotype sauvage.

Ces mécanismes sont mieux connus que ceux de la résistance naturelle. La résistance acquise, souvent médiée par un support génétique faisant partie d'un élément mobile (plasmide, transposon) a la faculté d'être transmissible horizontalement, parfois entre espèces différentes. La transmission verticale est aussi possible (**Jehel et al., 2011**).

Une même souche bactérienne peut regrouper les mécanismes de résistance, mutation ou acquisition de gènes, c'est la multi résistance. Les bactéries multi résistantes sont qualifiées comme résistantes à plusieurs familles d'antibiotiques et les bactéries pan-résistantes sont celles qui conduisent à des impasses thérapeutiques (**Jehel et al., 2011**).

5.3. Mécanismes de résistance

Les bactéries deviennent résistantes aux de différentes manières. Il faudrait noter préalablement qu'un type particulier de résistance n'est pas réservé à une seule catégorie de

substance (Deux bactéries peuvent utiliser des mécanismes différents pour résister à un même antibiotique) (Prescott et al., 2007).

Trois mécanismes rendent compte de la résistance acquise des bactéries aux antibiotiques :

5.3.1. Diminution de la quantité d'antibiotique atteignant la cible

Par diminution de la perméabilité ou par acquisition ou surexpression de systèmes d'efflux actif.

La baisse de la perméabilité concerne essentiellement les bactéries à Gram négatif (membrane externe) dont les porines s'obturent partiellement ou totalement ou alors disparaissent.

Le passage peut ainsi être ralenti ou même aboli consécutivement à certaines mutations touchant le lipopolysaccharide (polymixines).

Des modifications de la membrane cytoplasmique peuvent aussi être en cause rarement (exemple : les mutants « respiratoires » résistants aux aminosides sont dues à une altération des systèmes de transport actif) (Jehel et al., 2011).

Les systèmes d'efflux actif comprennent toujours une protéine située au niveau de la membrane cytoplasmique qui joue le rôle de pompe à extrusion. Elle utilise comme source d'énergie le plus souvent la force proton motrice et expulse l'antibiotique dès qu'il apparaît dans la cellule bactérienne. Chez les bactéries à Gram négatif la pompe est couplée à deux autres protéines : une porine de la membrane externe et une protéine de liaison entre les deux membranes. La résistance par efflux a été décrite chez de très nombreuses espèces, *E. coli* et *P. aeruginosa* entre autres. Elle concerne des antibiotiques très variés, tels les fluoroquinolones, le chloramphénicol, les tétracyclines, les β -lactamines ; les aminosides. Souvent une même pompe d'efflux est capable d'effectuer des antibiotiques de plusieurs classes différentes. L'efflux est donc souvent responsable d'une multi résistance aux antibiotiques, principalement de bas niveau (Jehel et al., 2011).

5.3.2. Modification ou protection de la cible de l'antibiotique

On peut observer une modification partielle de la nature de la cible, une modification du nombre (hyperproduction) un changement total (nouvelle cible), parfois une association de plusieurs de ces mécanismes. Ces modifications se font soit par mutation(s) dans les gènes

mutant pour la cible de l'antibiotique, soit par acquisition de gènes étrangers (Jehel et al., 2011):

- **Mutation**

-Résistance acquise aux fluoroquinolones par modification de l'ADN gyrase ou de l'ADN topoisomérase IV.

-Résistance de mycobactéries à la streptomycine, à la rifampicine, aux macrolides par modification du ribosome ou de la sous-unité β de l'ARN polymérase

- **Acquisition de gènes ou de fragments de gènes exogènes**

- Résistance acquise de *S. aureus* à la méticilline (PLP2a)

- Résistance acquise des pneumocoques aux β -lactamines

- Résistance acquise des entérocoques aux glycopéptides.

Plus rarement, les bactéries expriment une protéine capable de protéger la cible de l'antibiotique, là encore grâce à l'acquisition des gènes exogènes. On peut citer la résistance aux tétracyclines par protection ribosomale (déterminants Tet (M) et Tet (O) notamment) et la résistance plasmidique aux fluoroquinolones liée à l'expression de déterminants appelés « Qnr » qui diminuent la fixation des quinolones sur la gyrase et la topoisomérase IV (Jehel et al., 2011).

5.3.3. Inactivation enzymatiques de l'antibiotique

C'est le mécanisme le plus fréquemment observé en bactériologie humaine. Il peut s'agir par exemple d'une destruction de l'antibiotique, telle l'hydrolyse des β -lactamines par les β -lactamases, ou par une modification de la molécule par ajout des radicaux telles les estérifications des aminosides par les aminosides-phosphotransférases (APH) nucléotidyltransférases (ANT) et acétyltransférases (AAC) (Jehel et al., 2011).

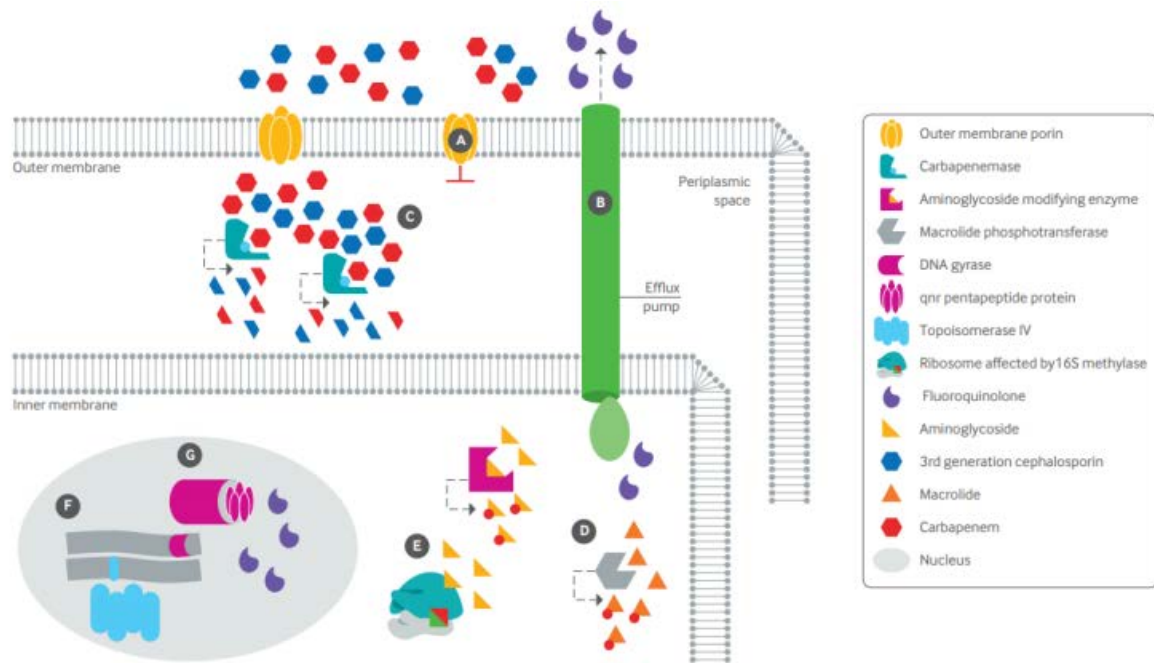


Figure 11 : Mécanismes moléculaires de résistances aux antibiotiques chez les bactéries Gram-négatif. (Salvador, 2018)

- A) Réduction de l'influx d'antibiotiques par diminution de la perméabilité membranaire.
 B) Efflux actif des drogues depuis le cytosol ou le périplasm par l'expression de pompes à efflux tripartites. C) Dégradation enzymatique des antibiotiques. D) Modification de l'antibiotique. E) Modification de la cible par attachement de groupement méthyle sur l'enzyme concernée. F) Mutation dans les gènes de la gyrase et la topoisomerase IV rend les fluoroquinolones inefficaces. G) Les pentapeptides Qnr piègent les fluoroquinolones et évitent leur interaction avec l'ADN. (Salvador, 2018).

**Resistance
aux
 β -lactamines**

Résistance aux β - lactamines

La famille d'antibiotiques la plus prescrite à l'échelle mondiale est constituée des β -lactamines (pénicillines, céphalosporines, monobactames et carbapénèmes). La résistance à cette famille est apparue précocement, parallèlement à leur grande utilisation. L'apparition de la résistance bactérienne est affrontée aux efforts incessants pour développer de nouvelles molécules d'antibiotiques (Grall et al., 2011) (Baba Ahmed-Kazi Tani et Arlet, 2014) (Giancarlo, 1995) (Marjolaine Brideau et al., 2015).

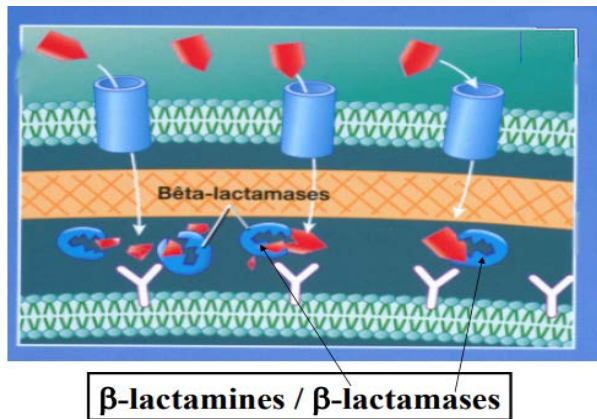
1. Mécanismes de résistance des bacilles à Gram négatif aux β -lactamines :

Les BGN (bacilles Gram négatif) manifestent la résistance aux antibiotiques de quatre façons: destruction enzymatique, modification de la cible, diminution de la perméabilité et les pompes à efflux. (Lesseur, 2019)(Ramdani-Bouguessa, 2021).

1.1. Destruction enzymatique:

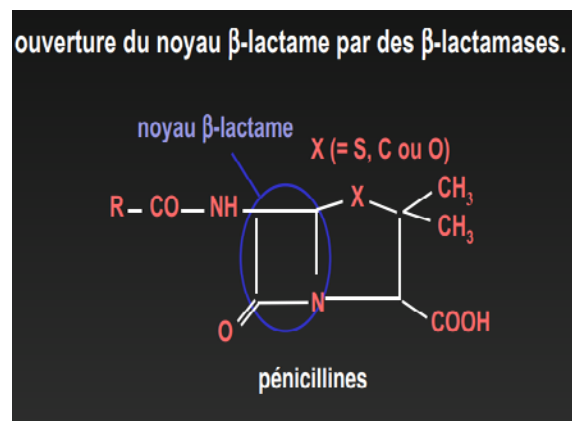
Les BGN produisent beaucoup d'enzymes qui altèrent ou détruisent les antibiotiques avant qu'ils n'agissent. Les enzymes les plus réputés sont les β -lactamases. Elles hydrolysent (brisent) le noyau β -lactame des β -lactamines irréversiblement, les rendant inefficaces (Marjolaine Brideau et al., 2015) (Noël Joffin et Leyral, 2006). Il y'a des centaines de β -lactamases différentes (exemple BLSE, AmpC, OXA, NDM, KPC, etc.). Chaque'une d'entre elles a son propre profil d'hydrolyse, donc chaque type de β -lactamase peut détruire une combinaison d'antibiotiques différente, comme exemple; les carbapénémases qui sont des β -lactamases dirigées contre les carbapénèmes. Par conséquent, les entérobactéries qui synthétisent ces β -lactamases sont appelées entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC) (Marjolaine Brideau et al., 2015) (Noël Joffin et Leyral, 2006).

Les β -lactamases ne sont pas les seules enzymes procurant aux BGN la résistance aux antibiotiques, il existe d'autres enzymes, par exemple les enzymes modifiant les aminosides (EMA). Comme leur nom du groupe l'indique, ces enzymes modifient les aminosides comme la gentamicine, la tobramycine et l'amikacine, et les empêchent de se lier à leur cible ce qui les rend inefficaces. Il existe quelques dizaines de ces enzymes mais elles ne sont pas toutes capables de neutraliser les mêmes antibiotiques à l'intérieur de cette classe des aminosides. L'exemple le plus fréquemment est une souche de BGN qui résiste à la gentamicine et à la tobramycine, mais qui est sensible à l'amikacine. (Marjolaine Brideau et al., 2015) (Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006) (Dubouix et Marty, 2004).



β -lactamines / β -lactamases

Figure 12 :a) Inactivation enzymatique de l'antibiotique (Simonet, 2012) (Simonet, 2012)



b): Ouverture du noyau β -lactame par des β -lactamases

1.2. Modification de la cible:

Le deuxième mécanisme de résistance chez les BGN est la modification de la cible, soit le site d'action de l'antibiotique. Ces modifications sont souvent causées par des mutations dans le gène codant pour la cible (Baba Ahmed-Kazi Tani et Arlet, 2014) (Marjolaine Brideau et al., 2015) (Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006) (Dubouix et Marty, 2004).

La modification d'affinité d'une ou plusieurs cibles touche beaucoup plus les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif (Philippon, 2008). Différents mécanismes existent: mutation dans les gènes structuraux; remplacement de certains fragments des gènes de PLP par des fragments correspondants provenant d'autres espèces, c'est le phénomène de «Gènes mosaïques»; intégration de gènes codant pour de nouvelles PLP dans les chromosomes (Jehel et al., 2011).

Exemples: *P. aeruginosa*: mécanisme exceptionnel. Altération ou surexpression de PLP associée à la résistance aux carbapénèmes.

H. influenza: modification de la PLP3, secondaire à une ou plusieurs mutations dans les gènes pouvant s'associer à la production de β -lactamases. Ce qui provoque une augmentation variable dans les CMI de l'amoxicilline.

N.meningitidis: altération du gène penA codant pour la PLP2, résultat de recombinaison génétique à partir de séquences correspondantes de *Neisseria* commensales (Gène mosaïque). Ce qui engendre la résistance croisée envers toutes les β -lactamines.

N. gonorrhoeae: résistance chromosomique fréquente. Il s'agit souvent d'association de mécanismes: altération d'une ou deux PLP (PLP-1 et PLP-2); défaut d'expression de la porine majeure et augmentation de l'efflux (système MtrCDE). Le niveau de résistance de ces

souches aux pénicillines peut devenir élevé (CMI pouvant aller jusqu'à 8 mg/L) (Jehel et al., 2011).

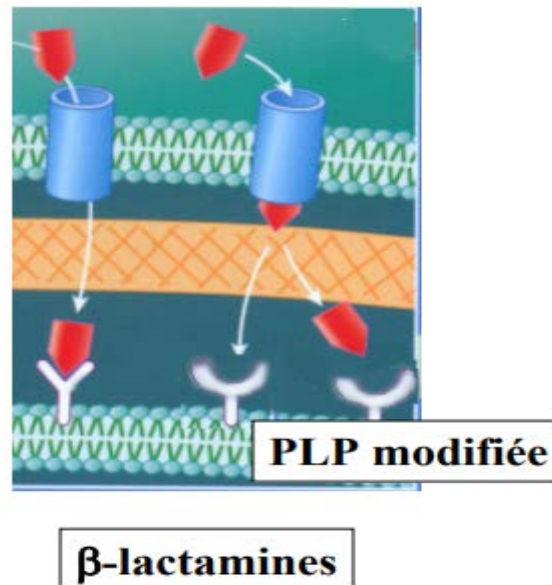


Figure 13: Modification de la cible (Simonet, 2012)

3. Perméabilité de la paroi

La paroi cellulaire des BGN est très imperméable à de nombreuses molécules, dont certains antibiotiques. Comme les cibles de ces derniers sont souvent à l'intérieur de la cellule, les antibiotiques doivent emprunter des porines, qui sont littéralement des tunnels protéiques qui traversent la paroi cellulaire et permettent à certaines substances de pénétrer dans la bactérie. Dans certaines données, (présence d'antibiotiques), certains BGN sont capables de diminuer la quantité de porines produites ou de modifier leurs types. Cette diminution de la perméabilité de la membrane aux antibiotiques entraîne une concentration plus faible d'antibiotique à l'intérieur de la bactérie rendant ainsi l'antibiotique moins efficace ou inefficace (Marjolaine Brideau et al., 2015) (Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006) (Dubouix et Marty, 2004).

L'exemple le plus répondeu de ce phénomène chez les BGN est la perte de la porine OprD chez le *Pseudomonas aeruginosa* qui provoque une résistance de ce dernier à l'imipénème. Ce phénomène peut être observé dans presque 25 % des cas d'infection à *P. aeruginosa* traités par cet antibiotique. On compte plusieurs types de porines.

Certaines modifications des porines empêchent un seul antibiotique de pénétrer dans la cellule, alors que d'autres bloquent l'entrée de plusieurs antibiotiques de plusieurs classes différentes (Marjolaine Brideau et al., 2015) (Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006) (Dubouix et Marty, 2004).

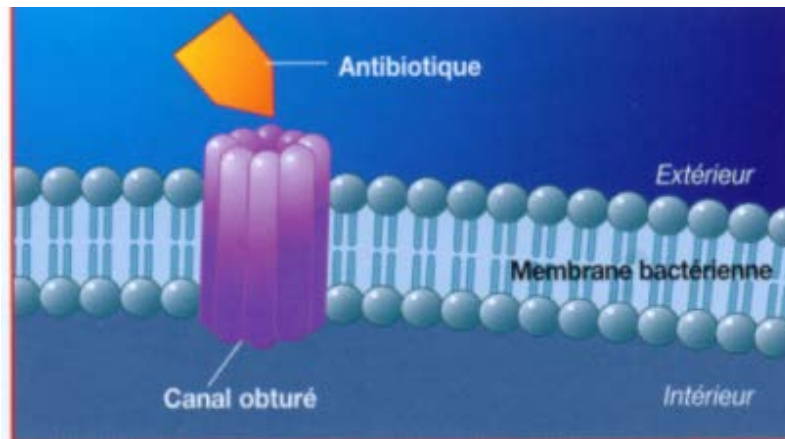


Figure 14 : Imperméabilité chez les Gram –, nombre de porines/altération de porines
(Archambaud, 2009c)

1.4. Pompe à efflux:

Le dernier mécanisme de résistance des BGN est la pompe à efflux, qui sont des protéines de la paroi cellulaire bactérienne qui sont capables de prendre des substances entrées dans la bactérie et de les repousser à l'extérieur de celle-ci. Ces pompes ont souvent une structure moléculaire complexe. Il existe plusieurs familles de différentes protéines qui agissent comme pompe à efflux.

Ces pompes sont souvent produites ou activées dans des circonstances particulières, dont en présence de certains antibiotiques. Ces pompes ont comme particularité d'être actives simultanément contre des classes différentes d'antibiotiques comparativement aux trois premiers mécanismes de résistance qui sont actifs contre un seul antibiotique ou quelques-uns d'une même classe. Par exemple, la pompe MexXY-OprM de *P. aeruginosa* diminue la sensibilité de ce dernier au méropénème, aux aminosides, aux fluoroquinolones, ainsi qu'aux pénicillines et aux céphalosporines, aboutissant grandement à un phénotype de multirésistance (Marjolaine Brideau et al., 2015) (Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006) (Dubouix et Marty, 2004).

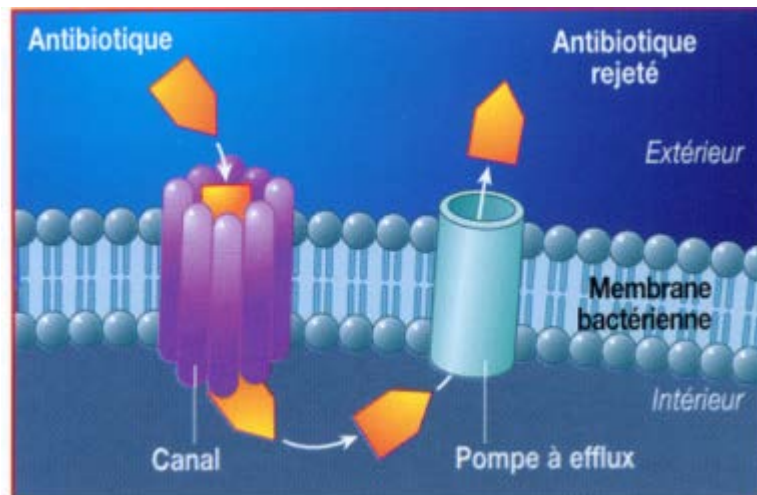


Figure 15: Pompe à efflux (Archambaud, 2009c)

2. β -Lactamases à spectre étendu BLSE

Au début des années 1980, seules les enzymes plasmidiques TEM-1, TEM-2 et SHV-1 étaient connues. Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) SHV-2 et TEM-3 ont été découvertes à cette période chez *Klebsiella pneumoniae*, soit peu après l'introduction en clinique des céphalosporines de troisième génération. En quelques années, les β -lactamases ont évolué parallèlement à l'utilisation massive des β -lactamines. Actuellement, plus de 400 β -lactamases dont plus de 200 BLSE sont décrites et aucune β -lactamine, seule ou en association avec des inhibiteurs de β -lactamases, n'est invulnérable à leur action potentielle.

Classiquement, les BLSE sont définies comme des enzymes appartenant à la classe A ou D de la classification d'Amblar, capables d'hydrolyser les pénicillines, céphalosporines de première, deuxième, troisième et quatrième génération (C1G, C2G, C3G et C4G) et l'aztréonam (Rodriguez et Struelens, 2006).

La majorité des BLSE sont dérivées de mutations ponctuelles dans la séquence génétique codant pour le site actif des β -lactamases TEM-1 et SHV-1, mais de nombreuses enzymes non apparentées ont été décrites (OXA, CTX-M, PER, VEB, GES, BES, TLA, SFO, et IBC).

Les deux schémas les plus utilisés pour la classification des BLSE sont celui d'Amblar qui est fondé sur l'homologie de séquence des acides aminés et de Bush-Jacoby-Medeiros qui est fondé sur les propriétés fonctionnelles des enzymes (Cattoen, 2011). La classification d'Amblar divise les β -lactamases en quatre groupes (de A à D). Les groupes A, C et D contiennent des β -lactamases avec la sérine dans son site actif. Les BLSE appartiennent soit au groupe A (types TEM, SHV, CTX-M) et en plus petit nombre au groupe D (type OXA). Les β -lactamases du groupe C sont des céphalosporinases (type AmpC) mais non BLSE. Le

groupe B contient des enzymes comportant deux atomes de zinc au site actif. Elles sont désignées comme métallo- β -lactamases et peuvent hydrolyser les carbapénèmes (**Rodriguez et Struelens, 2006**).

2.1. Diversité d'enzymes

2.1.1. Type TEM :

La majorité des BLSE de ce type issu de quatre à sept mutations ponctuelles de l'enzyme originale (TEM-1 ou TEM-2). Actuellement, il y a plus de 140 enzymes TEM . Ces mutations rendent l'enzyme capable d'hydrolyser les C3G, mais également plus vulnérable à l'action des inhibiteurs (acide clavulanique). Cependant, d'autres mutations peuvent conférer la résistance aux inhibiteurs. Ces variantes sont appelées TRI (TEM résistantes aux inhibiteurs). Les enzymes dérivées par mutations permettant d'hydrolyser à la fois les C3G et les inhibiteurs sont de plus en plus fréquentes.

2.1.2. Type SHV :

Après TEM, le type SHV constitue celui comportant le plus grand nombre (supérieur à 70) d'enzymes BLSE. Comme dans le cas des enzymes de type TEM, les enzymes de type SHV dérivent par mutations ponctuelles de l'enzyme originale SHV-1. L'origine de ces enzymes est peut être une variante de l'enzyme chromosomique K2 de *K. pneumoniae* (**Philippon, 2013a**)(**Carrer et Nordmann, 2011**).

2.1.3. Type OXA

Ces enzymes ont une grande activité catalytique pour la cloxacilline, l'oxacilline et la méticilline. À l'exception de l'OXA-18, elles ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique. Il y'a actuellement 11 BLSE du groupe OXA, dérivées de OXA-1, OXA-2 et OXA-10. En général, elles hydrolysent mieux la ceftazidime que le céfotaxime. Ces enzymes ont été observés chez *Pseudomonas aeruginosa* mais aussi chez les entérobactéries, majoritairement en France et en Turquie. Les BLSE de type OXA sont codés par de gènes portés par des éléments mobiles comme les transposons et intégrons (**ANSES, 2020**) (**CNPM, 2017**) (**Grall et al., 2011**).

Certaines enzymes de cette classe (OXA-21, OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-40, OXA-58) donne une certaine résistance aux carbapénèmes (méropénème ou

imipénème) et ont une large diffusion parmi les *Acinetobacter* (Philippon, 2013a)(Carrer et Nordmann, 2011).

2.1. 4. Type CTX-M:

Les BLSE de type CTX-M ont été décrites initialement en 1986 (FEC-1) au Japon, Allemagne et France en 1989 (CTX- M-1) et ont disséminé largement dans le monde. Sur la base de leur apparentement de séquences d'acides aminés, il semble qu'elles dérivent des céphalosporinases chromosomiques des bactéries du genre *Kluyvera*. Il existe actuellement 40 enzymes qui sont eux-mêmes classées phylogénétiquement en cinq groupes. À la différence des types précédents, les CTX-M confèrent une résistance marquée au céfotaxime (origine de son nom) et au céfépime. En revanche, l'inactivation de la ceftazidime est plus limitée, à l'exception d'enzymes récemment décrites (CTX-M-15, CTX- M-16, CTX-M-27) qui ont une forte capacité hydrolytique pour la ceftazidime. Les CTX-M sont plus fortement inhibées par le tazobactam que par l'acide clavulanique (Philippon, 2013a).

Ces BLSE ont été retrouvées majoritairement chez *Escherichia coli* et *Salmonella enterica*. Leur émergence parmi d'autres espèces et genres d'entérobactéries est rapide. Les groupes 1, 9 et 2 sont actuellement prédominants. Dans la majorité des isolats cliniques, ces enzymes sont codées par des plasmides de 60– 160 kb, au sein desquels coexistent fréquemment des gènes codant pour d'autres β -lactamases comme TEM-1, TEM-2 ou OXA-1 (Philippon, 2013a) (Carrer et Nordmann, 2011).

2.1. 5. Autres types de BLSE:

D'autres types plus rares de BLSE :

- **Les β -lactamases de la classe A :**

incluent BES, GES-IBC, VEB, SFO, TLA et PER. Elles sont inhibées par l'acide clavulanique et en général ont le même substrat que TEM et SHV. Les enzymes BES-1, SFO-1 et TLA-1 ont été retrouvées chez les entérobactéries.

Les enzymes du type GES et PER, VEB et IBC-2, ont été largement retrouvées chez *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* mais aussi chez les entérobactéries. Les enzymes du type VEB hydrolysent de préférence la ceftazidime et l'aztréonam. PER-1 a été observée chez *P. aeruginosa* mais aussi chez *Proteus mirabilis*, *Alcaligenes faecalis* et *Acinetobacter spp* (Rodriguez et Struelens, 2006)(Lecaillon et al., 1993).

- **Les β -lactamases de la classe C :**

Les β -lactamases de la classe C (AmpC) sont codées par des gènes chromosomiques ou plasmidiques. Ces céphalosporina sont cliniquement importantes chez *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa*, *Proteus spp* et

Providencia spp du fait de la fréquence de mutants hyperproducteurs parmi ces espèces. Les β -lactamases AmpC sont capables d'hydrolyser les céphalosporines y compris les céphamycines (céfoxitine) ainsi que les pénicillines, mais pas le céfépime. Ces β -lactamases sont résistantes aux inhibiteurs de β -lactamases. Le gène AmpC constitutif est faiblement exprimé chez *E. coli* et est absent chez *Klebsiella* et *Salmonella spp*. Cependant, ces espèces peuvent acquérir différents sous-groupes d'AmpC codés par des plasmides. Ce sont des AmpC dérivées de *C. freundii* (BIL-1, CMY-2, LAT-1,2), d'*Enterobacter cloacae* (MIR-1, ACT-1) ou encore de *P. aeruginosa* (CMY-1, FOX-1, MOX-1). Aujourd'hui, il existe plus de 20 β -lactamases AmpC différentes portées par des plasmides (Rodriguez et Struelens, 2006)(Lecaillon et al., 1993)(Messaia et al., 2008)(Dubouix et Marty, 2004).

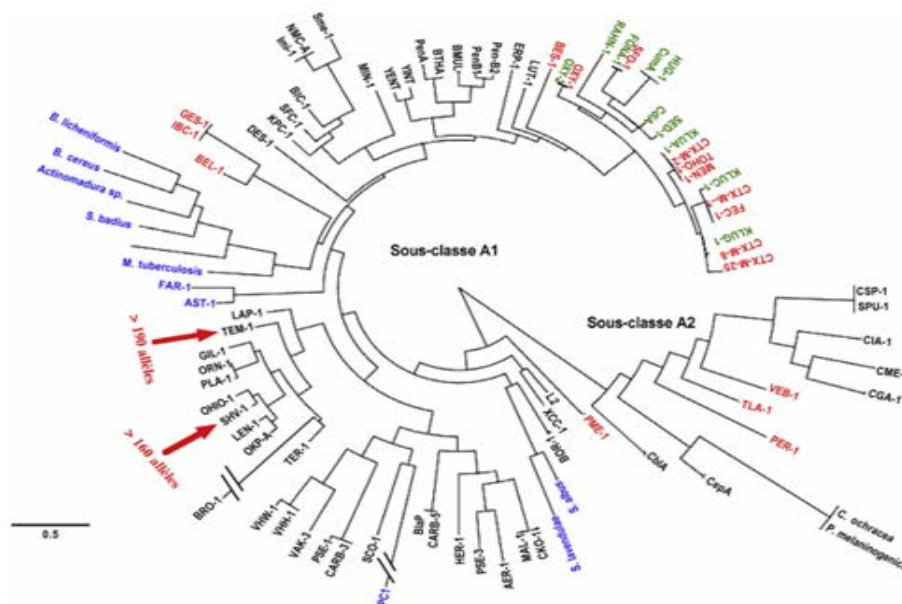


Figure 16 : Phylogramme de 84 séquences peptidiques de bêta-lactamases appartenant à la classe A (alignement multiple Muscle, phylogeny Phym et TreeDin : www.phylogeny.fr). Bêta-lactamases de bactéries à Gram-positives (en bleu) ; BLSE transférables (en rouge) ; BLSE chromosomiques (en vert) Philippon A. Les bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu (BLSE) (Philippon, 2013b)

Tableau IV : β -lactamines: comportement habituel en fonction du type de β -lactamase (Dubouix et Marty, 2004) (Philippon, 2013b).

	PASE	BLSE	CASE	CASE HP	CASE SE	CARB
Amoxicilline	R	R	R	R	R	R
Amoxicilline + AC	S/I/R	S	R	R	R	R
Ticarcilline	R	R	S	R	R	R
Ticarcilline + AC	S/I/R	S	S	R	R	R
Pipéracilline	R	R	S	R	R	R
Pipéracilline + PTZ	S/I/R	S	S	R	R	R
Céfalotine	I/R	R	R	R	R	R
Céfamandole	I/R	R	S	R	R	R
Céfuroxime	S/I	R	S	R	R	R
Céfoxitine	S	S	R	R	R	R
Céfotaxime	S	R	S	R	R	R
Ceftazidime	S	R	S	R	R	R
Céfépime	S	R	S	S	R	R
Cefpirome	S	R	S	S	R	R
Aztréonam	S	R	S	R	R	V
Imipénème	S	S	S	S	S	R
Méropénème	S	S	S	S	S	R
Ertapénème	S	S	S	S	S	R

PASE : pénicillinase ; BLSE : bêta-lactamase à spectre élargi/étendu ; CASE : céphalosporinase inductible ; CASE HP : céphalosporinase hyperproduite ou plasmidique ; CASE SE : céphalosporinase à spectre élargi/étendu ; CARB : carbapénémase ; R : résistant ; S : sensible ; I : intermédiaire ; AC : acide clavulanique ; PTZ : tazobactam.

3. Inhibiteurs de la β -lactamase

L'identification de la TEM β -lactamase plasmidique chez les gonocoques à la fin des années 1960 a stimulé les sociétés pharmaceutiques à se concentrer sur le développement de TEM-stable β -lactamines et découvrir des inhibiteurs qui pourraient être utilisés dans le cadre d'une combinaison thérapeutique pour potentialiser l'activité des β -lactamines auparavant inefficaces.

Ces efforts ont entraîné le développement d'inhibiteurs de β -lactamases à base de β -lactames (acide clavulanique, sulbactam et tazobactam). Initialement, ces composés ont fourni d'excellentes propriétés antimicrobiennes contre les agents pathogènes Gram-négatifs hébergeant des β -lactamases de type TEM-1 et SHV-1 ainsi que des pénicillinases et *S. aureus* parmi les bactéries Gram positif. Cependant, presque immédiatement après leur introduction dans la pratique clinique, les bactéries ont commencé à produire de nouvelles variantes de β -lactamase qui ont été immunisées contre l'inhibition par ces composés.

Actuellement, il existe plusieurs inhibiteurs des β -lactame et non- β -lactame, en cours de développement clinique (**Dustin et al., 2017**).

La grande découverte dans le domaine des antibiotiques et le phénomène de l'antibiorésistance est donc celle des petites molécules qui fonctionnent comme des inhibiteurs basés sur le mécanisme (suicide) des β -lactamases. Ces composés sont utilisés en association avec les antibiotiques afin d'empêcher la destruction de ces derniers par l'enzyme β -lactamase. Il existe trois inhibiteurs de la β -lactamase qui ont connu un succès clinique : Acide clavulanique, Sulbactam et Tazobactam. Le premier est un énole éther lactame tandis que les deux derniers sont des sulfonyl dérivés de β -lactame. Tous ces trois composés inhibent uniquement la sérine β -lactamases et non les métallo- β -lactamases que plusieurs inhibiteurs ont également été développés.

L'acide clavulanique: est un inhibiteur de β -lactamase produit par *Streptomyces clavuligerus*. Ce n'est pas un antibiotique (il n'a qu'une faible activité antibactérienne), sa fonction principale est de contrecarrer l'effet de β -lactamases.

Les gènes de biosynthèse de l'antibiotique ainsi que la β -lactamase inhibiteur sont regroupés dans la même séquence du chromosome. Ainsi cet organisation est l'unique concernant la biosynthèse d'un antibiotique et d'une molécule qui protège l'antibiotique de la dégradation enzymatique et qui sont contrôlés par des mécanismes partagés.

Ce concept a été utilisé en clinique en prescrivant des antibiotiques β -lactamines en association avec l'acide clavulanique.

Exemple : Augmentin (contient de la pénicilline et de l'acide clavulanique),
Timentin (contient de la ticarcilline et de l'acide clavulanique),
Zosyn (contient de la pipéracilline et du tazobactam),
Unasyn (contient de l'ampicilline et du sulbactam).

L'acide clavulanique inactive l'enzyme β - lactamase qui est sécrétée par les bactéries infectantes et permet ainsi à la pénicilline de fonctionner correctement.

Le mécanisme d'action de l'acide clavulanique et des sulfones fait intervenir un « électron-puits », qui est une double liaison à une bonne position pour accepter les électrons du nucléophile, la sérine qui initie la réaction. En cas de transpeptidase réagissant avec soit le substrat naturel, le monomère de peptidoglycane ou avec la pénicilline, ainsi que dans le cas de réaction des β -lactamases avec la pénicilline ou d'autres β -lactamines, les électrons de la sérine s'orientent vers l'azote de la liaison amide qui est rompue par l'acquisition d'un proton à partir d'un acide aminé au site actif de l'enzyme.

Dans le cas de réaction de la β -lactamase avec l'acide clavulanique et les sulfones sulbactam et tazobactam, les électrons du nucléophile vont jusqu'au carbone alcényle ou à l'oxygène du sulfone, qui accepte alors un proton d'un acide aminé au site actif de la β -lactamase. La liaison acyle enzymatique formée entre la β -lactamase et l'inhibiteur est différent de la liaison acyle formée avec la pénicilline du fait qu'il est beaucoup plus lent à s'hydrolyser. Ce qui rend la libération d'enzyme active libre encore moins probable est la formation d'une deuxième liaison à une autre sérine au site actif. En raison des liaisons de deux sérines de l'enzyme au fragment molécule inhibitrice, la β -lactamase devient définitivement inactivée (Bhattacharjee, 2016).

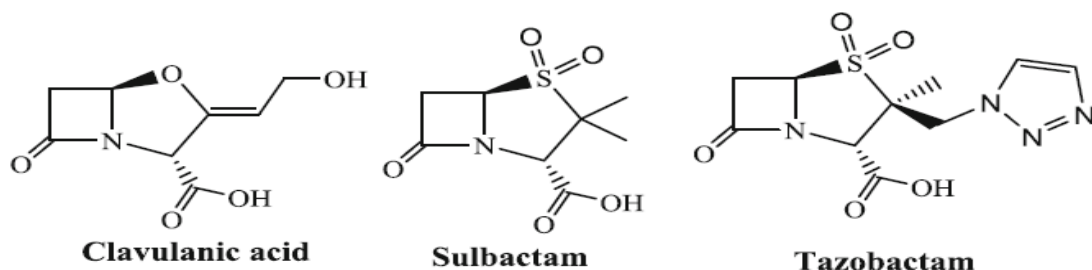


Figure 17. Inhibiteurs des β -lactamases à mécanisme suicidaire (Bhattacharjee, 2016) (Noël Joffin et Leyral, 2006).

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

1. Lieu de l'étude

Ce travail a porté sur les prélèvements analysés au niveau du laboratoire central de l'Établissement Public Hospitalier (EPH) Ahmed Ben Bella de Khenchela du 23 mai au 08 juin 2021. Cet établissement est d'une capacité de 240 lits et regroupe plusieurs services. Les prélèvements provenaient de patients hospitalisés ou adressés par le service des urgences ou encore externes.

Ces prélèvements étaient essentiellement des urines, liquide céphalo-rachidien, hémoculture, pus, épanchement d'ascite et prélèvement distal protégé (respiratoire).



Figure18; a) Laboratoire de microbiologie,

EPH Ahmed Ben Bella de Khenchela.

b) Microscope optique

2. Étude bactériologique:

Les prélèvements étaient majoritairement des urines. Les urines ont fait l'objet d'un ECBU (examen cytobactériologique des urines) de routine comportant les éléments suivants :

- Une uroculture avec dénombrement de germes (bactériurie);
- Un examen cytologique permettant d'apprécier la leucocyturie et les éléments figurés de l'urine (hématies, cristaux, cylindres...); état frais ou coloration au bleu de méthylène permettant de visualiser les cellules qui sont mieux conservées (Noël Joffin et Leyral, 2006)

Nous avons retenu seulement les ECBU avec une culture mono-bactérienne. Les autres prélèvements ont été traités de la même façon (avec quelques différences, examen cytologique, milieu de culture ...etc.)

L'identification des bactéries était basée sur des caractères morphologiques, cultureux et biochimiques (galeries Api 20E) (Ben Haj Khalifa et Khedher, 2010).

2.1. Isolement

Il est réalisé sur milieu gélose nutritive (GN). A l'aide d'une anse de platine calibrée on prélève une gouttelette d'urine qu'on dépose sur le bord de la GN et qu'on tire pour créer une strie centrale qui sera à son tour déconcentrée en stries perpendiculaires à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée pour avoir des colonies bien isolées. On met les boîtes de Petri dans l'incubateur à 37°C pendant 24 heures (Djennane et al., 2009).

En cas de repiquage nous avons également recouru à la technique d'ensemencement avec flambage sur quatre quadrants (Noël Joffin et Leyral, 2006).



Figures 19-20.Ensemencement à partir d'urine sur gélose nutritive LM-EPH-ABB

Après avoir évalué macroscopiquement l'aspect des colonies, nous avons effectué des repiquages sur des milieux sélectifs.

2.2. Identification:

Cette phase commence dès l'examen macroscopique de l'aspect des colonies, pour passer par l'examen microscopique et enfin l'identification biochimique par le système de galeries biochimiques (Api E20) ou les tests biochimiques de la galerie classique (complémentairement).

2.2.1. Aspect macroscopique des colonies:

Cet examen doit ressortir plusieurs éléments:

- Taille: grandes et petites colonies
- Forme: bombée, plate, ombiliquée, ronde, bords dentelés et étoile
- Surface: lisse, rugueuse, reflet métallique et irisée
- Opacité: opaques, translucides et transparente
- Consistance: grasse, crémeuse, sèche et muqueuse
- Couleur: crème et pigmentée (**Noël Joffin et Leyral, 2006**)

2.2.2. Examen microscopique des bactéries:

- **Coloration de gram:**

- En ajoutant le violet de gentiane, toutes les bactéries prennent ce colorant
- En ajoutant l'éthanol, il dissout le violet de gentiane et décolore les BGN
- En ajoutant la fuschine, elle recolore en rose les BGN déjà colorés
- A l'issue de l'opération, les BGN sont roses et les bactéries à Gram positif sont violettes. La nature de la paroi des deux types de bactéries donne deux couleurs différentes, les BGN ne retiennent pas le colorant à cause de leur paroi fine riche en lipides (Noël Joffin et Leyral, 2006) (Djennane et al., 2009).
- Rincer à l'eau distillée ou du robinet
- Séchage et observation à l'objectif x 100 à immersion et à pleine lumière (Noël Joffin et Leyral, 2006)

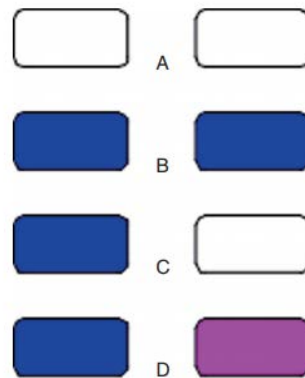


Figure 21: Principe de la coloration de Gram, avec à gauche une bactérie à Gram positif et à droite une bactérie à Gram négatif.

A) Bactéries fixées non colorées. B) Bactéries colorées par le violet de gentiane. C) Seules les bactéries à Gram positif restent colorées en violet après l'étape de décoloration. D) Les bactéries décolorées à l'étape précédente sont recolores en rose par la fuschine. (Alfred et Heidi, 2012)

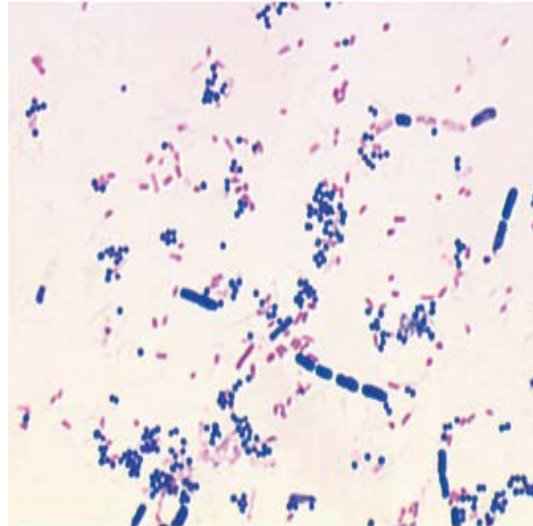


Figure 22 .Coloration de Gram d'un mélange de germes (*Bacillus cereus* , *Staphylococcus aureus* et *Salmonella Typhimurium*). Observation à l'immersion (× 1000) (Alfred et Heidi, 2012).

2.2.3. Identification biochimique:

- **Test oxydase:** pour mettre en évidence une bactérie oxydase +
 - Méthode des disques:
 - A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée prélever une colonie de la culture (milieu solide et aérobie) et déposer sur un disque placé sur une lame
 - Tache violette → oxydase +
 - Pas de tache violette → oxydase – (Noël Joffin et Leyral, 2006) (Djennane et al., 2009)

- **Test catalase:** pour mettre en évidence une bactérie catalase +, la réaction catalysée est:



- A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée prélever une colonie de la culture (milieu solide et aérobie) et mettre en suspension sur une goutte d'eau oxygénée (Peroxyde d'oxygène = H_2O_2) déposée sur une lame
- Bulles d'oxygène → catalase +
- Pas de bulles d'oxygène → catalase – (Noël Joffin et Leyral, 2006) (Djennane et al., 2009)



a) Eau oxygénée 10V , b) Prélèvement de colonie ; c) Oxydase positif

Figure 23. Test oxydase LM-EPH-ABB

- **Test coagulase:** ne concerne pas les BGN, on en a fait recours juste pour confirmer la présence de *Staphylococcus aureus* par la mise en évidence de l'enzyme «coagulase», particularité absente chez les autres *Staphylococcus*. Cette enzyme coagule le plasma recueilli sur anticoagulant.
- Méthode:
 - Mettre une colonie en suspension dans de l'eau physiologique
 - Remettre dans un tube contenant du plasma
 - Incuber au moins 3 H
 - Coagulation du plasma → coagulase +
 - Plasma toujours liquide → coagulase – (Noël Joffin et Leyral, 2006)



a) Réalisation du test coagulase b) Incubation (3h) c) Interprétation (coagulase -)

Figure 24. Test de coagulase LM-EPH-ABB

- Galerie biochimique Api 20 E – bioMérieux: c'est un système de galeries miniaturisé (Noël Joffin et Leyral, 2006).

C'est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données. () voir annexes(**Biomérieux, 2010**) (**GHL, 2013**). .

- 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 (**Biomérieux, 2010**) (**Djennane et al., 2009**).

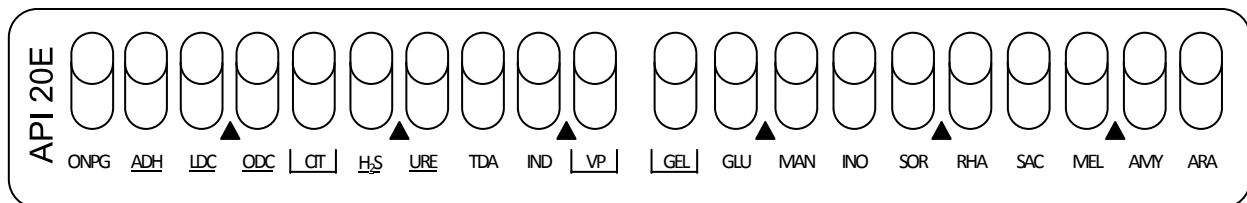


Figure 25. Galerie biochimique Api 20 E – bioMérieux (**GHL, 2013**)

Mode opératoire:

- Test oxydase: doit être réalisé selon les instructions du fabricant, il constitue le 21ème test d'identification à noter sur la fiche de résultats.
- **Préparation de la galerie:**
 - * Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée [ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex: Cl₂, CO₂ ...)] dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
 - * Incrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation).
 - * Sortir la galerie de son emballage.
 - * Placer la galerie dans la boîte d'incubation (**Biomérieux, 2010**).

▪ Préparation de l'inoculum:

- * Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85 % Medium (5 ml) ou une ampoule d'API Suspension Medium (5 ml) comme indiqué au paragraphe "Précautions" de la notice du produit, ou utiliser un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile ou d'eau distillée stérile, sans additif.
- * A l'aide d'une pipette ou d'une PSipette, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
- * Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu. Cette suspension doit être utilisée extemporanément (**Biomérieux, 2010**).

▪ 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 ou de la PSipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant):
 - pour les tests **[CIT]**, **[VP]** et **[GEL]** remplir tube et cupule,
 - pour les autres tests, remplir uniquement les tubes (et non les cupules),
 - pour les tests : **[ADH]**, **[LDC]**, **[ODC]**, **[H2S]**, **[URE]** créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- * Refermer la boîte d'incubation.
- * Incuber à $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 18-24 heures (**Biomérieux, 2010**).

○ Lecture et interprétation:**▪ 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**.
- * Si le nombre de tests positifs avant ajout des réactifs (y compris le test GLU) est inférieur à 3 :
 - Réincuber la galerie 24 heures (\pm 2 heures) de plus sans rajouter les réactifs.
 - Rvéler les tests nécessitant l'addition de réactifs (voir paragraphe précédent).
 - Pour compléter l'identification, il peut être utile de réaliser des tests complémentaires (se reporter au paragraphe Identification) (**Biomérieux, 2010**).
- Interprétation:

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

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

 - A l'aide du Catalogue Analytique : Rechercher le profil numérique dans la liste des profils.
 - A l'aide du logiciel d'identification apiweb TM : Entrer manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres (**Biomérieux, 2010**) (**Djennane et al., 2009**).



Figure 26. Galerie Api 20 E Négative (GHL, 2013)



Figure 27. Galerie Api 20 E Positive (GHL, 2013)

3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques:

3.1. Technique de diffusion des disques en milieu gélose:

Elle était réalisée par la technique de diffusion des disques en milieu gélosé. L'interprétation des résultats a obéi aux normes du «Clinical and Laboratory Standards Institute» (CLSI).

Cette méthode est l'une des plus anciennes approches de détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques et demeure l'une des méthodes les plus utilisées en pratique médicale.

Elle est convenable pour la majorité des bactéries pathogènes y compris les bactéries à croissance lente; elle donne accès à un grand nombre d'antibiotiques et ne requiert pas de matériel particulier. Comme la plupart des techniques de diffusion en gélose (SFM, 2018) (RASRBA, 2014).

- Milieu: Gélose Mueller-Hinton (MH) (Noël Joffin et Leyral, 2006) (SFM, 2018) (RASRBA, 2014)

La gélose MH est employée lors de la méthode de diffusion en gélose pour les bactéries à l'exception de celles à croissance lente.

- Préparer et chauffer la gélose MH
- Ramener la température à 42-45°C
- Répartir le milieu en boîtes de Petri stériles pour obtenir une épaisseur de 4 mm ± 0.5 mm (soit environ 25 mL par boîte de Petri de 90 mm de diamètre)
- La surface de la boîte doit être sèche avant utilisation
- Conserver les boîtes de Petri entre 8-10°C (SFM, 2018)

- **Préparation de l'inoculum:**

- A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Bien décharger l'anse ou l'écouvillon dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%. Dans le cas de *Neisseria gonorrhoeae*, décharger l'anse dans 1 à 2 ml de tampon phosphate stérile à pH 7,2.

- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 MF ou à une D.O. de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm. L'utilisation d'un densitomètre est fortement souhaitable (Noël Joffin et Leyral, 2006) (RASRBA, 2014).
- **Inoculation des géloses:**
 - 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 (Noël Joffin et Leyral, 2006) (RASRBA, 2014).
- Dépôt des disques imprégnés d'antibiotique:
 - Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotique sur une boîte de 90 mm.
 - Pour les bactéries exigeantes (*Streptococcus spp*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus spp*.....), ne pas mettre plus de 4 disques par boîte de 90 mm.
 - Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de pinces bactériologiques stériles et ne pas déplacer les disques après application.
 - La liste des antibiotiques à tester selon la bactérie isolée, figure dans les annexes 4 – 5 et 6 (Noël Joffin et Leyral, 2006) (RASRBA, 2014).
- **Incubation des boîtes de Petri:**
 - Respecter la température, l'atmosphère et la durée d'incubation recommandées pour chaque bactérie (voir Annexe n°7) (RASRBA, 2014).
- **Lecture:**
 - Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.

- Pour les bactéries testées sur Mueller-Hinton simple, les mesures seront prises en procédant par transparence à travers le fond de la boîte de Petri fermée.
- Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes (tableaux 12 – 18).
- Classer la bactérie dans l'une des catégories S, R ou I (sensible, résistant ou intermédiaire) (**RASRBA, 2014**) (**Alfandari et al., 2018**).



Figures 28-29. Réalisation de l'antibiogramme LM-EPH-ABB

3.2. Tests complémentaires

Pour certains antibiotiques ou familles d'antibiotiques, l'antibiogramme standard ne suffit pas, donc des tests complémentaires doivent être pratiqués avant une interprétation définitive (**RASRBA, 2014**).

Ces tests complémentaires sont résumés dans le tableau IV:

Tableau V. Tableau récapitulatif des différentes recherches complémentaires (**RASRBA, 2014**)

	β -lactamase	Résistance Oxacilline	Résistance Vancomycine	BLSE/Case/IMPase	CMI	BLNAR	Résistance inducible à la clinda
<i>Haemophilus</i> spp.	X					X	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	X						
<i>Moraxella</i> spp.	X						
<i>Staphylococcus</i> spp.	X	X	X		Oxacilline* Vancomycine*		X
<i>S. pneumoniae</i>					β -lactamines		X
<i>Enterococcus</i> spp.	X		X		Vancomycine*		
Streptocoque β -hémolytique							X
Entérobactéries				X			
<i>P. aeruginosa</i>				X			
<i>Acinetobacter</i> spp.				X	Nétilmicine Colistine		
Anaérobies	X						

3.2.1. Recherche de la β -lactamase à spectre élargi (BLSE) chez les entérobactéries, *pseudomonas aeruginosa* et *acinetobacter* spp. :

Selon les recommandations du CLSI, la recherche de la BLSE pour l'interprétation de la sensibilité des entérobactéries, *Pseudomonas* spp. et *Acinetobacter* spp. aux céphalosporines n'est plus obligatoire.

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

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

- céfotaxime (CTX a 27mm), ceftazidime (CAZ a22mm), ceftriaxone (CRO a 25mm), aztréonam (ATM a 27mm).

3.2.1.1. Méthodes de détection de la BLSE :

- **Test de synergie :**

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

- Entérobactérie :

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 μ g) à 30mm centre à centre d'un disque de C3G (Céfotaxime : CTX 30 μ g ou Ceftriaxone : CRO 30 μ g). Incuber 18H à 35°C (**Ben Haj Khalifa et Khedher, 2010**) (**RASRBA, 2014**).

Cette technique permet la mise en évidence des TEM et SHV. Pour les autres BLSE de classe A (CTX-M, CMT, ...), ce test doit être fait dans les mêmes conditions standards de l'antibiogramme en déposant un disque d'AMC à 30mm centre à centre d'un disque de : CAZ, CTX ou CRO et ATM en raison de l'existence de phénotypes de résistance différents (céfotaximase ou ceftazidimase ...).

La production d'enzyme peut se traduire par l'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre les disques : AMC et CTX, AMC et CAZ, AMC et ATM (Ben Haj Khalifa et Khedher, 2010) (RASRBA, 2014).

- **Test de confirmation (double disque):**

Ce test devra être fait systématiquement devant :

- L'absence de synergie avec diminution des diamètres des C3G
- La présence d'une résistance aux molécules suivantes : ampicilline, ticarcilline, céfazoline avec un diamètre <6mm, par contre l'AMC présente un diamètre d'inhibition.

Ce test se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme. On applique les disques d'antibiotiques (Pour les entérobactéries) en déposant 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 pailasse), la boîte sera déposée couvercle vers le haut. Après 1H d'incubation, ôter le disque d'AMC et le remplacer par un disque de CTX ou CRO. Incuber la boîte 18 H à 35°C.

Le test du double disque est considéré 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 (**RASRBA, 2014**).

Résultats

Résultats

1. Souches bactérienne

Sur 57 prélèvements, 11 ont répondu positivement (19.29 % du total des prélèvements).

Au cours de cette étude, 12 souches de BGN ont été isolées, dont 02 souches résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération (céftazidime) ont été identifiées au niveau de l'EPH Ahmed Ben Bella à Khenchela, du 23 mai au 08 juin 2021.

Selon les résultats de l'identification par la galerie Api 20E, *Escherichia coli* est l'espèce la plus fréquemment isolée avec un taux de 33.33% (4/12), suivi par, *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter cloacae* avec des taux de 25% (3/12), 25% (3/12) et 16.66% (2/12) respectivement (**Figure 30**).

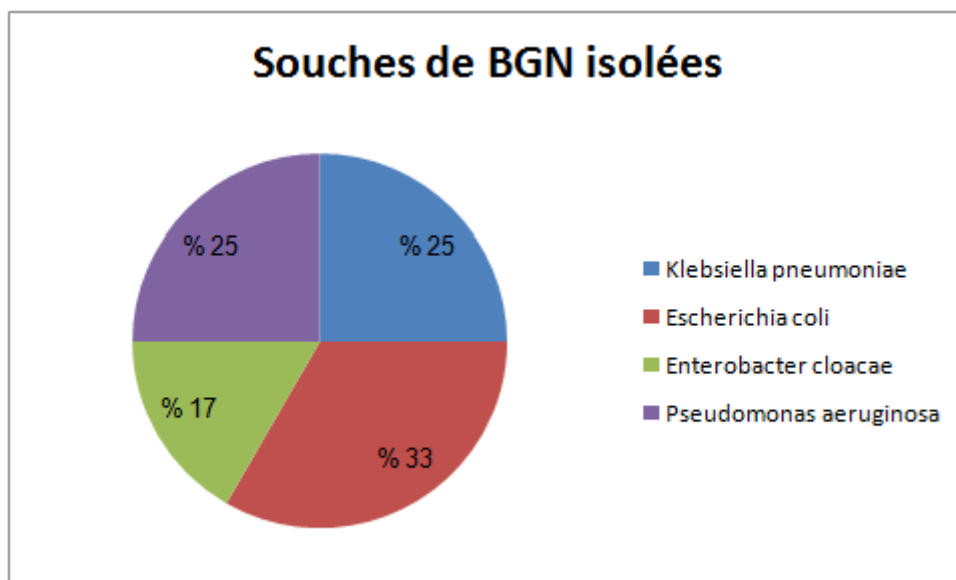


Figure 30. Fréquence des souches de BGN isolées

1.1. Répartition des souches selon le sexe des patients

La figure 31 montre que les taux d'isolement les plus élevés sont observés chez le sexe féminin avec une valeur de **64%** (7/11), tandis que le taux d'isolement chez les patients de sexe masculin est de **36%** (4/11).

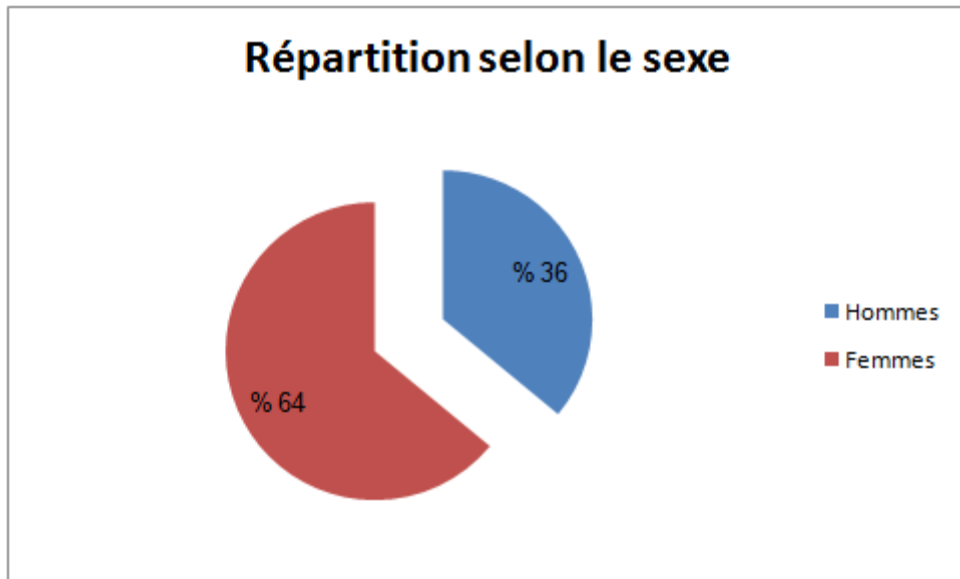


Figure 31. Répartition des souches de BGN par sexe de patients

1.2. Répartition des souches selon l'âge des patients

La figure 32 montre que les taux d'isolement les plus élevés sont observés chez les jeunes avec une valeur de **55%** (6/11), tandis que le taux d'isolement chez les patients adultes est de **45%** (5/11).

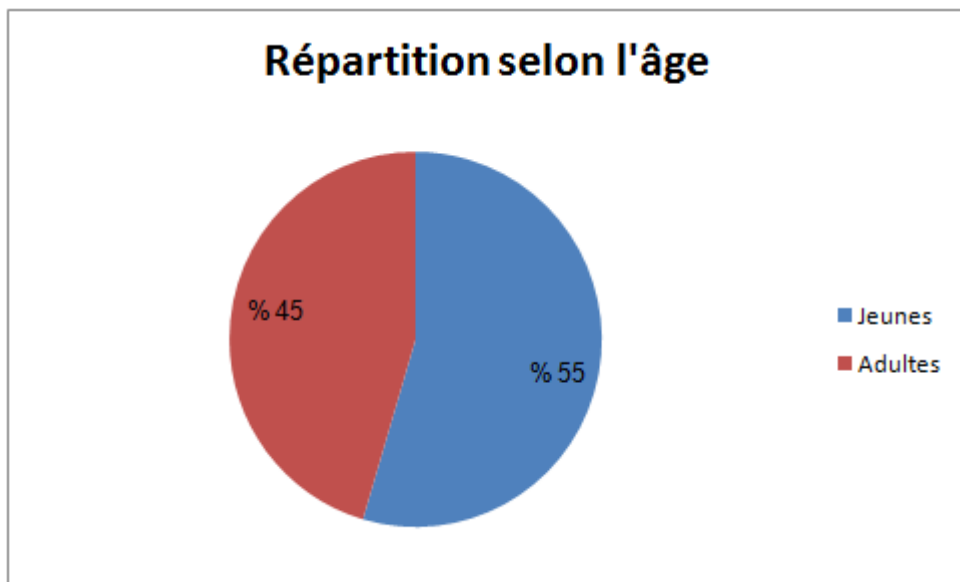


Figure 32. Répartition des souches de BGN par catégorie d'âge

1.3. Répartition des souches selon la nature du prélèvement

Les résultats montrent que plus de la moitié des souches (73%) sont d'origine urinaire, (18%) des souches ont été isolées à partir de Pus, et (9%) isolés à partir de prélèvement distal protégé (respiratoire). La répartition des souches selon l'origine de prélèvement est résumée dans le tableau VI.

Tableau VI. Répartition des souches de BGN selon la nature du prélèvement.

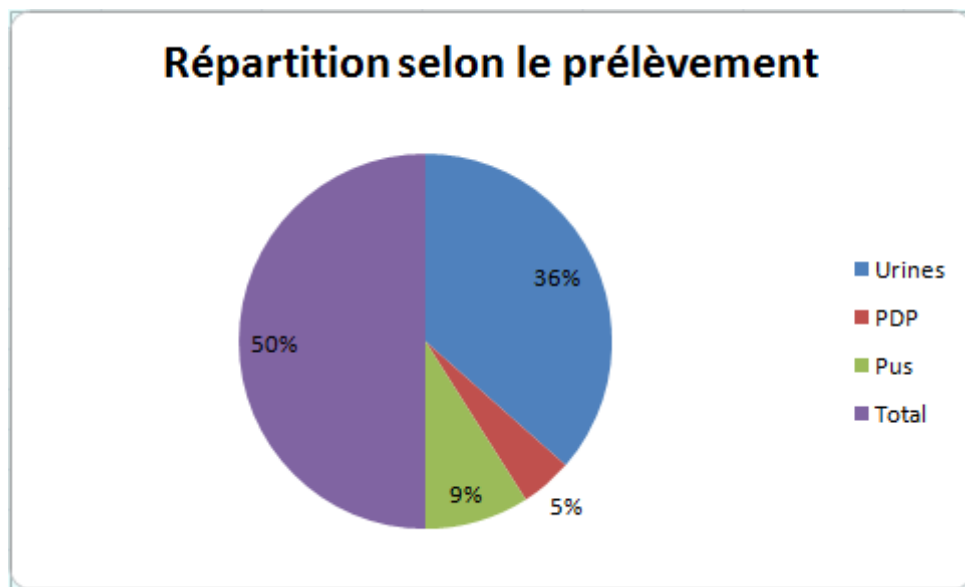


Figure 33. Répartition des souches de BGN selon la nature du prélèvement.

2. Identification des souches

2.1. Examen macroscopique

Sur gélose nutritive, les colonies présentaient l'aspect macroscopique caractéristique de la famille des *Enterobacteriaceae* et *Pseudomonaceae*.

➤ Sur gélose nutritive

- Colonies beiges ou blanchâtres, rondes, bombées, de 1 à 4 mm de diamètre, d'odeur putride ou fade, parfois muqueuses.
 - Colonies jaunes, rondes, bombées de 0,1 à 0,5 mm de diamètre.
 - Colonies beiges, à bord irrégulier, de 2 à 3 mm de diamètre d'odeur putride.
- Colonies bleu vertes, à bord irrégulier de 0,5 mm de diamètre, dégageant une odeur du jasmin caractéristique de *P. aeruginosa*.

➤ Sur gélose Hektoen

- Colonies vertes ou bleues : bactéries ne catabolisant aucun glucide.
- Colonies saumon : bactéries catabolisant des glucides (lac+).
- Colonies à centre noir : bactéries H₂S +

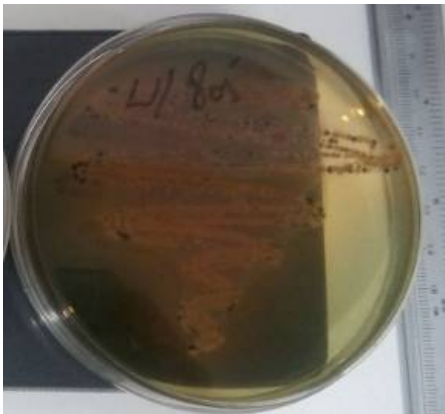


Figure 34. Entérobactéries H₂S +
sur Hektoen (N° U 805) LM-EPH-ABB

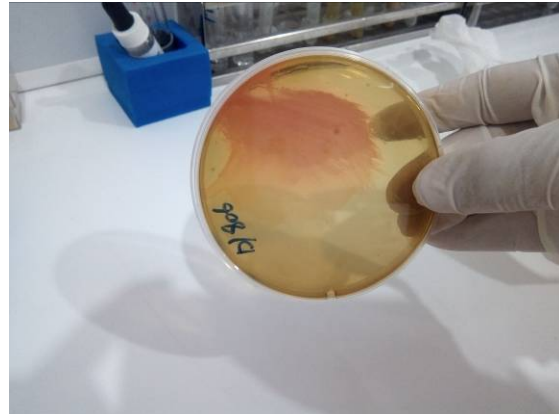


Figure 35. *Pseudomonas* sur
Hektoen (N° D 806) LM-EPH-ABB

2.2. Examen microscopique

L'examen microscopique après coloration différentielle de Gram d'une culture jeune (18 à 24 heures d'incubation) a révélé des bacilles isolées ou en courtes chainettes colorés en rose. Les colonies apparues à la surface de la gélose sont donc issues de bacilles à Gram négatif, ce qui est compatible avec les caractéristiques du milieu d'Hektoen qui est un milieu sélectif pour les bacilles à Gram négatif.

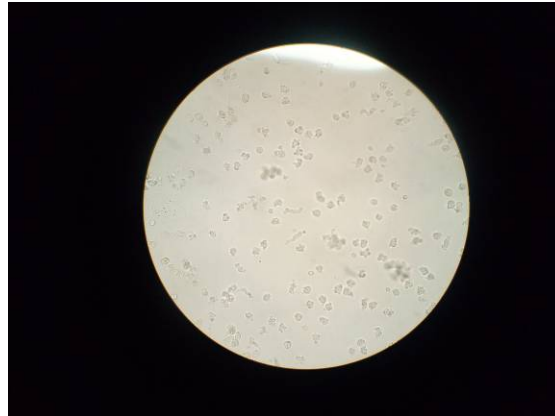


Figure 36. Examen à l'objectif x100 à l'état frais (urines) LM-EPH-ABB

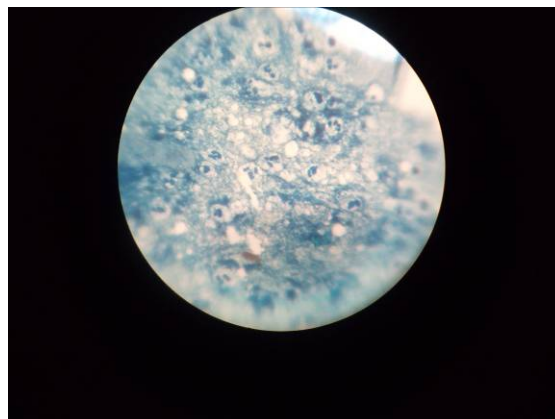


Figure 37 : Coloration au bleu de méthylène
examen à l'objectif x100 (urines) LM-EPH-ABB

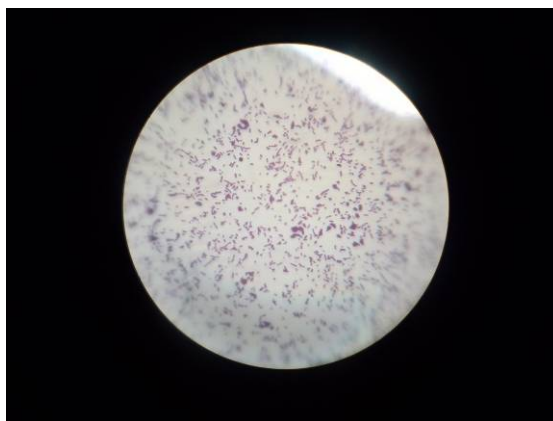


Figure 38. Examen à l'objectif x100 (Cocci Gram +) LM-EPH-ABB

2.3. Résultats de l'identification par la galerie Api20E

Figure 39. Api 20 E d'*Enterobacter cloacae* (N° D 822) LM-EPH-ABBFigure 40. Api 20 E d'*E. coli* (N° U 820) LM-EPH-ABB

Tableau VII: Résultat de l'identification biochimique des bactéries par les galeries API 20E

Identification	ARA	AMY	MEL	SAC	RHA	SOR	INO	MAN	GLU	GEL	VP	IND	TDA	URE	H2S	CIT	ODC	LDC	ADH	ONPG
<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumonia</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+

(+) : Résultat positif, (-) : Résultat négatif; (ONPG) : β -galactosidase ; (ADH) : Arginine-dihydrolase ; (LDC) : Lysine-décarboxylase ; (ODC) : Ornithine-décarboxylase ; (CIT) : Citrate ; (H2S) : Production du sulfure d'hydrogène ; (URE) : Uréase ; (TDA) : Tryptophane-désaminase ; (IND) : Indole ; (VP) : Réaction de Voges-Proskauer ; (GEL) : Gélatine ; (GLU) : D-glucose ; (MAN) : D-mannitol ; (INO) : Inositol ; (SOR) : D-sorbitol ; (RHA) : L-rhamnose ; (SAC) : D-saccharose ; (AMY) : Amygdaline ; (MEL) : D-melibiose ; (ARA) : L-arabinose.

3. Etude de sensibilité aux antibiotiques

3.1. Étude de la sensibilité aux β -lactamines

Les 12 souches BGN sélectionnées selon leur résistance à la CAZ ont montré des taux de résistance élevés pour la plupart des β -lactamines, (16,66%) pour la Céfotaxime, (58%) pour l'ampicilline et (8,33%) pour la céfalotine (**Tableau VIII**)

Tableau VIII. Taux de résistance aux β -lactamines par espèces

ATB Souche	Taux de résistance %										
	AMC	AMP	CAZ	CTX	IPM	ATM	ETP	FOX	CEF	PRL	KZ
<i>K. pneumoniae</i>	8,33	25	0	8,33	0	8,33	0	0	8,33	0	0
<i>E. coli</i>	16,66	16,66	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. cloacae</i>	16,66	16,66	8,33	8,33	0	0	0	16,66	0	8,33	16,66
<i>P. aerogenosa</i>	25	0	8,33	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	66,66	58,33	16,66	16,66	0	8,33	0	16,66	8,33	8,33	16,66

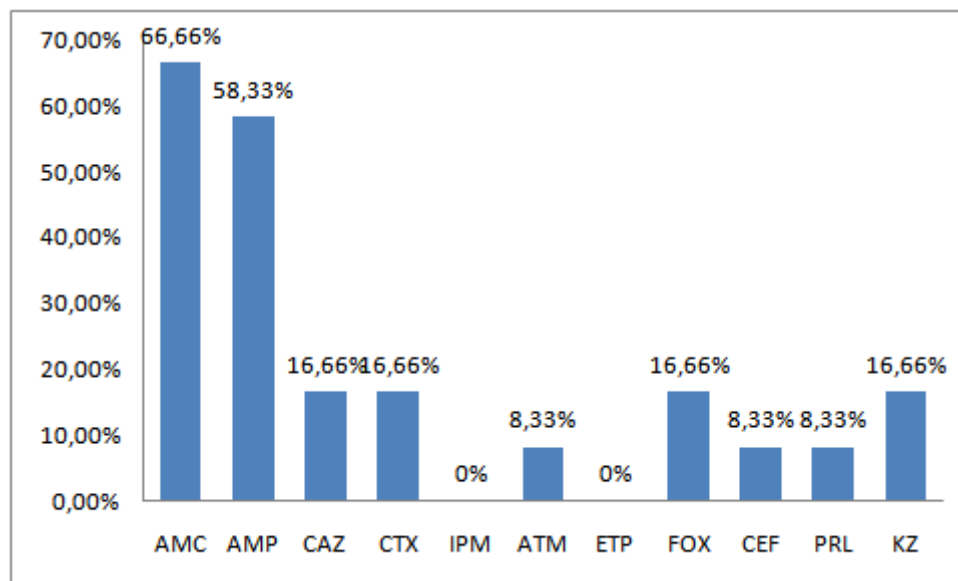


Figure 41. Taux de résistance aux β -lactamines par espèces

3.2. Étude de la sensibilité aux autres familles d'antibiotiques

Les souches de BGN résistent également à d'autres familles d'antibiotiques autres que les β -lactamines. En effet, un taux de résistance peu élevé de (50%) a été enregistré pour le sulfaméthoxazole-triméthoprine, (16.66%) a été enregistré pour la Gentamycine et la tobramycine et (8.33%) a été enregistrés pour la lévofloxacine (**Tableau IX**).

Tableau IX: Taux de résistance aux autres familles d'antibiotiques par espèces

ATB Souche	Taux de résistance %								
	AK	CN	CIP	F	SXT	FOS	CT	LEV	TOB
<i>K. pneumoniae</i>	0	8,33	0	0	16.66	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. cloacae</i>	0	8.33	0	0	8.33	0	0	8.33	8.33
<i>P. aerogenosa</i>	0	0	0	0	25	0	0	0	8.33
Total	0	16,66	0	0	50	0	0	8.33	16,66

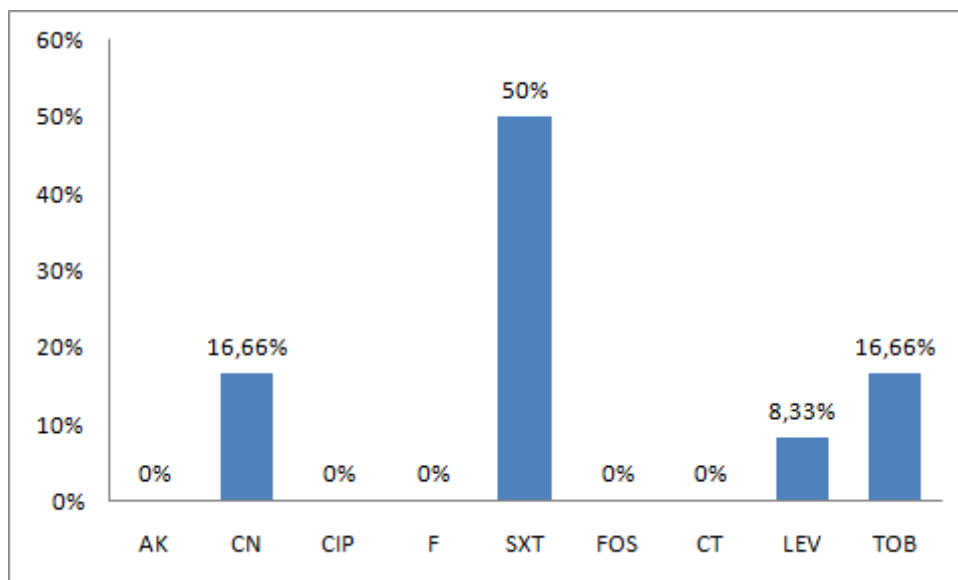


Figure 42. Taux de résistance aux autres familles d'antibiotiques par espèces

4. Analyse des souches résistantes aux carbapénèmes

4.1. Caractéristiques des souches résistantes aux carbapénèmes

Dans cette étude nous n'avons pas rencontré de souches bactériennes résistantes aux carbapénèmes, elles étaient toutes sensibles.

4.2. Résistance des souches aux β -lactamines

Les résultats de l'antibiogramme effectué sur les 12 souches de BGN montrent que (83.33%) des souches sont résistantes à des β -lactamines, néanmoins, (16.66%) d'entre elles étaient toujours sensibles à toutes les β -lactamines testées (**Figure 43**), (**Tableau X**).

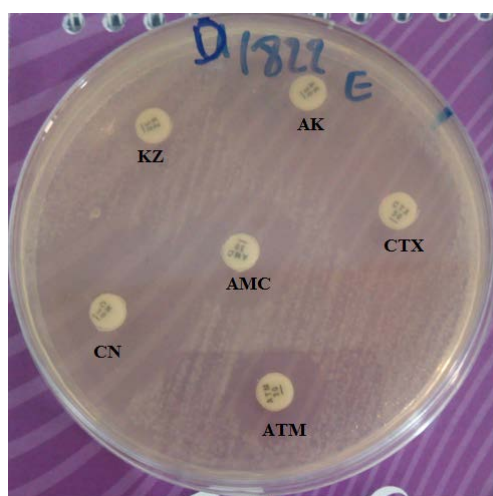


Figure 43. Souche *E. cloacae* résistante aux β -lactamines (N° D 822) LM-EPH-ABB

Tableau X: Sensibilité des souches de BGN aux β -lactamines testées

	AMC	AMP	CAZ	CTX	IPM	ATM	ETP	FOX	CEF	PRL	KZ
<i>K. pneumoniae</i>	1 R	3 R	0 R	1 R	0 R	1 R	0 R	0 R	1 R	0 R	2 R
<i>K. pneumoniae</i>	2 S	0 S		2 S	3 S	2 S	3 S	3 S	2 S		1 S
<i>E. coli</i>	2 R	2 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R
<i>E. coli</i>	2 S	2 S		4 S	4 S	4 S	4 S	4 S	4 S		4 S
<i>E. cloacae</i>	2 R	2 R	1 R	1 R	0 R	0 R	0 R	2 R	0 R	1 R	2 R
<i>E. cloacae</i>	0 S	0 S	1 S	1 S	2 S	2 S	2 S	0 S	2 S	1 S	0 S
<i>P. aerogenosa</i>	3 R	0 R	1 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R
<i>P. aerogenosa</i>	0 S		2 S	3 S	3 S	3 S	3 S			3 S	

AMP : Ampicilline ; **AMC** : Amoxicilline/Acide clavulanique ; **CAZ** : Céfotaxime ; **CTX** : Céfotaxime ; **IPM** : Imipénème ; **ATM** : Aztréonam ; **ETP** : Ertapénème ; **FOX** : Céfoxitine ; **CEF** : Céfotaxime ; **KZ** : Cefazoline ; **PRL** : Pipéracilline ; **R** : Résistant, **S** : Sensible.

4.3. Étude de la sensibilité aux autres familles d'antibiotiques

La moitié des souches sont résistantes aux autres familles d'antibiotiques (quinolones, aminosides, sulfamides).

L'indice de multi-résistance (rapport entre nombre d'antibiotiques auxquels la souche est résistante sur le nombre total d'antibiotiques testés) qui renseigne sur le niveau de résistance des souches aux molécules testées est très élevé pour deux souches. Ainsi, seule deux souches d'*E. coli* sont sensibles à tous les antibiotiques testés, alors qu'une souche d'*E. cloacae* est résistante à 11 des 18 antibiotiques testés. Enfin, une souche de *K. pneumoniae* est résistante à 7 sur 14 antibiotiques testés.

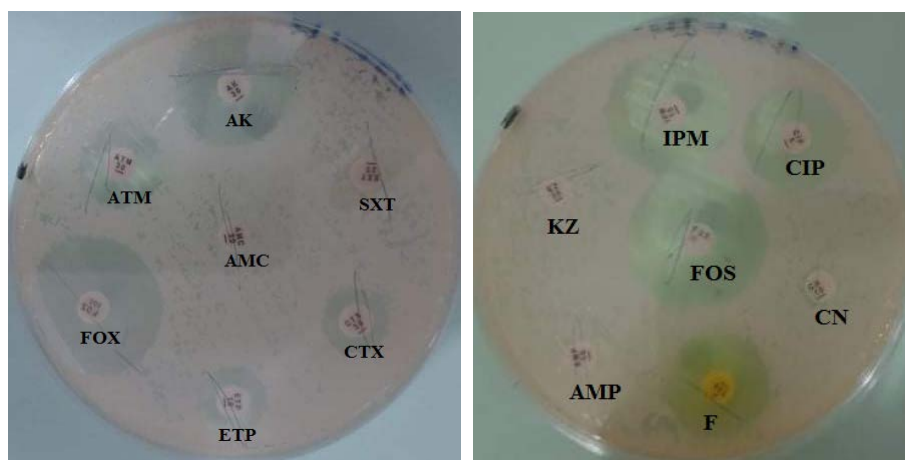


Figure 44-45. Souche *K. pneumoniae* résistante à d'autres familles d'antibiotiques. (N° U 784) LM-EPH-ABB

Tableau XI: Sensibilité des souches de BGN aux autres familles d'antibiotiques.

	AK	CN	CIP	F	SXT	FOS	CT	LEV	TOB
<i>K. pneumoniae</i>	0 R	1 R	0 R	0 R	2 R	0 R	0 R	0 R	0 R
<i>K. pneumoniae</i>	3 S	2 S	3 S	3 S	1 S	3 S	3 S		
<i>E. coli</i>	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R
<i>E. coli</i>	4 S	4 S	4 S	4 S	4 S	4 S	4 S		
<i>E. cloacae</i>	0 R	1 R	0 R	0 R	1 R	0 R	0 R	1 R	1 R
<i>E. cloacae</i>	2 S	1 S	2 S	2 S	1 S	2 S	2 S	1 S	1 S
<i>P. aerogenosa</i>	0 R	0 R	0 R	0 R	3 R	0 R	0 R	0 R	0 R
<i>P. aerogenosa</i>	3 S	3 S	3 S		0 S	3 S	3 S	3 S	3 S

CN: Gentamicine; **AK:** Amikacine ; **CIP :** Ciprofloxacine; **F:** Nitrofurane; **SXT :** Triméthoprime-sulfaméthoxazole ; **FOS :** Fosfomycine; **CT :** Colistine; **TOB :** Tobramycine; **LEV :** Levofloxacine ; **R :** Résistant, **S :** Sensible.

➤ Recherche des β -lactamases à spectre étendu (BLSE)

Notre étude a révélé l'existence de trois images de synergie, trois souches étaient productrices de β -lactamases à spectre étendu. Il s'agit de *K. pneumoniae* (2 souches) et *P. aeruginosa* (1 souche).

Une seule souche a répondu positivement au test du double disque, il s'agit de *K. pneumoniae*.

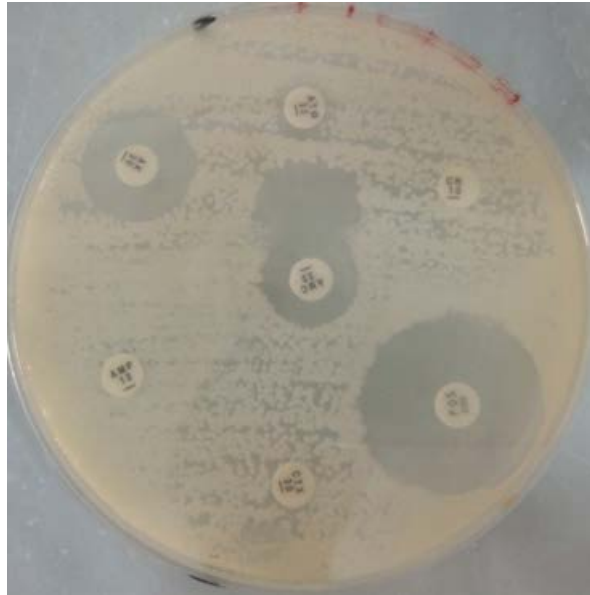


Figure 46. Image en bouchon de champagne entre AMC et ATM (N° U 774) LM-EPH-ABB

Figure 47. Image en bouchon de champagne entre AMC – ATM et AMC – CAZ (N° D 822) LM-EPH-ABB

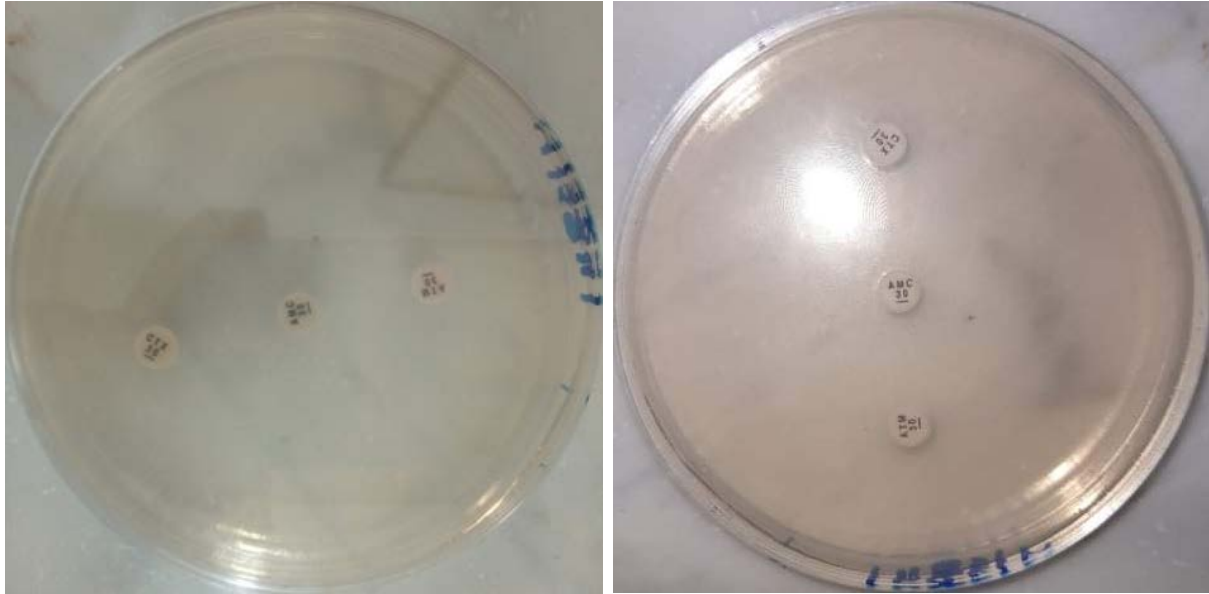


Figure 48. a) Test de synergie entre AMC–CTX–ATM. b) Résultat
K. pneumoniae (N° U 784) LM-EPH-ABB

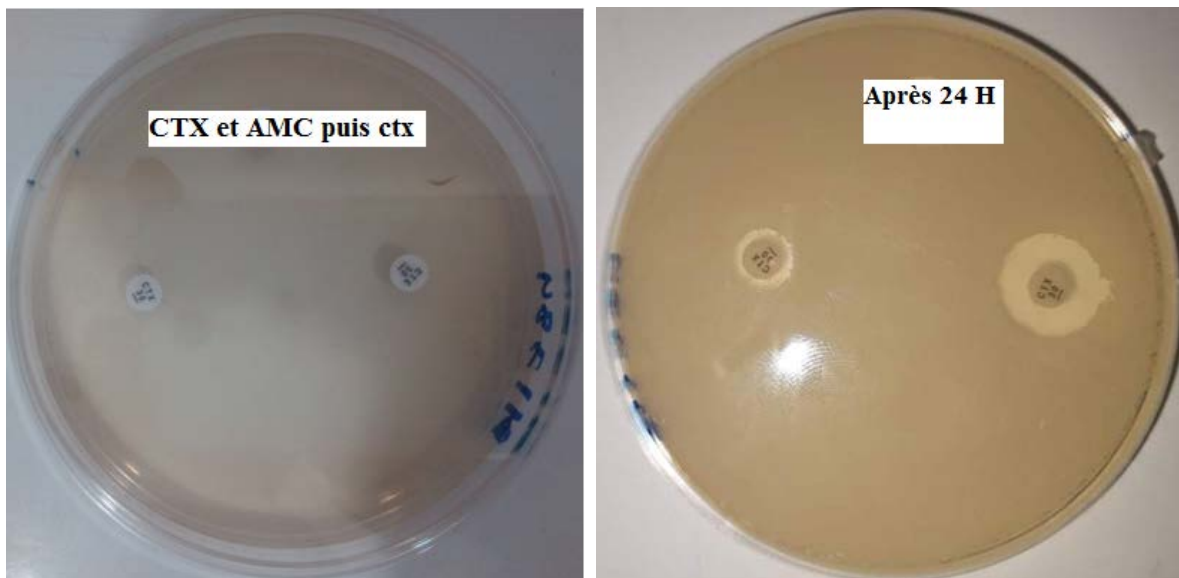


Figure 49. a) Test du double disque CTX et AMC puis CTX. b) Résultat
Klebsiella pneumoniae (N° U 784) LM-EPH-ABB

Discussion

Discussion

L'utilisation des antibiotiques est le facteur majeur dans le développement de la résistance bactérienne. Le rôle principal des antibiotiques dans l'émergence de la résistance est indiscutable. La pression de sélection est quant à elle, plus intense tant que le nombre de patients sous traitement est grand et que temps de séjour à l'hôpital est long.

En Algérie, la résistance aux antibiotiques représente un problème sérieux qui s'amplifie de plus en plus depuis plusieurs années.

Les entérobactéries, cette entité au sein du groupe des bacilles à gram négatif, sont de loin, les agents infectieux les plus impliqués dans les infections en milieu hospitalier. Elles demeurent toujours préoccupantes en pathologie.

Au cours de l'étude réalisée, sur les 12 souches de BGN isolées, 25% (3/12) résistent aux céphalosporines de 3ème génération (céftazidime et céfotaxime), 25% (3/12) produisent des bêta-lactamases, alors qu'aucune souche ne résiste aux carbapénèmes. Il est à noter l'absence de toute publication sur l'antibiorésistance dans cette région jusqu'à ce jour.

Egalement 33.33% des entérobactéries isolées étaient BLSE+, ce qui est proche des résultats du Réseau Algérien de la Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques (RASRBA) 30.28% obtenus à 12 laboratoires nationaux (RASRBA, 2012).

Les *P.aeruginosa* résistants à l'imipénème étaient à 0% dans cette étude, ce qui n'est pas le cas pour les résultats du RASRBA (12,30 %). Les *P.aeruginosa* résistants à la ceftazidime étaient à 8.33 % contre 15,05 % du RASRBA, et *P.aeruginosa* résistants à la ciprofloxacine 0 % contre 8,57 % (RASRBA, 2012).

Quant aux souches de *P.aeruginosa* BLSE+, leur taux global est de 7.14% (1/14) contre 4,13% recensées au RASRBA.

Puis nous allons comparer un autre pourcentage au sein de la même souche (nombre de souches résistantes sur nombre isolé) pour les *E.coli* résistants, cette étude a ressorti un pourcentage de 50% de résistance à l'ampicilline et l'amoxicilline + acide clavulanique en face de 73.79 % et 31.56 % consécutivement pour le RASRBA. *E.coli* était sensible à tous les

autres antibiotiques inversement aux résultats du RASRBA (excepté l'imipinème qui est identiquement à 0 %).

K. pneumoniae a montré 33.33 % de résistance contre 57.31 % du RASRBA pour l'amoxicilline + acide clavulanique, 0 % contre 6.94 % pour la céfoxitine, 33.33 % contre 51.69 % pour le céfotaxime, 0 % contre 0.12 % pour l'imipinème, 33.33 % contre 44.66 % pour la gentamicine, 0 % contre 16.77 % pour l'amikacine, 0 % contre 37.77 % pour la ciprofloxacine, 66.66 % contre 53.34 % pour le sulfaméthoxazole + triméthoprim et 0 % contre 12.15 % pour la fosfomycine.

L'étude des *Enterobacter* a conduit à des pourcentages de 50 % face à 53.96 % du RASRBA pour céfotaxime, 0 % les deux pour l'imipinème, 50 % contre 33.27 % pour la gentamicine, 0 % contre 8.59 % pour l'amikacine, 0 % contre 27.35 % pour la ciprofloxacine, 50 % contre 43.25 % pour le sulfaméthoxazole + triméthoprim et finalement 0 % contre 10.64 % pour la fosfomycine.

P.aeruginosa dans l'étude à l'EPH Ahmed Ben Bella de Khenchela a exprimé les pourcentages; 0 % à l'encontre de 19.75 % du RASRBA pour la pipéracilline, 33.33% contre 17.37 % pour la céftazidime, 0 % face à 12.02 % pour l'imipinème, 0 % face à 16.38 % pour l'aztréonam, 0 % contre 11.37 % pour la gentamicine, 0 % contre 10.53 % pour la tobramycine, 0 % contre 8.23 % pour l'amikacine, 0 % contre 14.68 % pour la fosfomycine et en fin 0 % contre 11.38 % pour la ciprofloxacine.

Conclusion

Conclusion

La résistance aux antibiotiques est un sujet d'actualité et problématique de société, un danger accroissant. Depuis l'émergence de la résistance, des moyens de lutte ont été découverts, les plus efficaces et les plus connus étant les inhibiteurs de bêta-lactamases qui sont associés aux bêta-lactamines.

Les résistances touchent tous les domaines : vétérinaires, hospitaliers et environnementaux, il s'avère alors essentiel que tout le monde soit impliqué.

En milieu hospitalier des moyens sont exploités, malgré leur effet très limité pour suivre l'émergence de résistances. Seuls l'antibiogramme et l'orientation du choix thérapeutique demeurent des moyens défensifs face à une administration abusive d'antibiotiques.

Les dernières années l'Algérie connaît une grande hausse de la résistance aux antibiotiques, particulièrement chez les bacilles à gram négatif qui devient inquiétante. Ces souches sont généralement multirésistantes et menacent directement la survie des patients en représentant des impasses thérapeutiques. Une réflexion sur un usage rationnel et orienté avec la mise en place d'une politique de surveillance de la résistance s'imposent pour entraver la dissémination des multirésistants.

Les carbapénèmes sont les dernières armes contre les germes producteurs de BLSE, surtout avec la propagation rapide des BLSE, qu'il faut préserver autant que possible au vu de l'absence à court terme de perspective de fabrication de nouveaux antibiotiques.

Le fait que l'émergence de la résistance est inévitable, tant que les bactéries évoluent avec les antibiotiques, incite à emprunter d'autres voies, à l'image de la lutte contre les infections, l'hygiène et les mesures préventives, pour bloquer la propagation de souches résistantes.

Résumés

Étude de la résistance aux antibiotiques des bactéries à gram négatif dans le milieu hospitalier

Résumé

Ces dernières années, la résistance aux antibiotiques en Algérie a connu une importante augmentation en particulier chez les bacilles à Gram négatif. Dans ce contexte notre travail vise à déterminer la résistance des BGN isolés à l'EPH Ahmed Ben Bella de la wilaya de Khenchela durant la période s'étalant du 23 Mai 2021 au 08 Juin 2021.

D'après les résultats de ce travail, les prélèvements cliniques émanant des différents services de l'EPH Ahmed Ben Bella (Urines, Liquide céphalorachidien, Pus...) ont fait l'objet d'une étude bactériologique passant par les étapes ; d'isolement et d'identification selon le système de galeries biochimiques (Api 20E) et de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques (méthode de diffusion de disques sur gélose selon CLSI).

Cette procédure a permis l'isolement de 12 souches de BGN, comportant *Escherichia coli*, l'espèce la plus fréquemment isolée avec un taux de 33.33% (4/12), suivi de *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* avec 25% (3/12) chacune et *Enterobacter cloacae* avec 16.66% (2/12).

Les souches isolées et selon leur résistance à la Céfotazidime ont montré un taux de résistance élevé pour la plupart des β -lactamines : (16.66%) pour la céftazidime, (58%) pour l'ampicilline et (8.33%) pour la céfalotine.

Des pourcentages de résistance peu élevés ont été enregistrés pour les familles, autres que les β -lactamines : (50%) pour le *sulfaméthoxazole-triméthoprime*, (16.66%) pour la gentamycine et la tobramycine et (8.33%) pour la lévofloxacine.

Pour la résistance aux carbapénèmes, aucune souche bactérienne n'a été enregistrée durant cette étude.

Une recherche phénotypique de la production de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) a été également effectuée. Les résultats montrent l'existence de trois images de synergie indiquant la production des enzymes de type *TEM* et *HSV* par les souches: *K. pneumoniae* (2 souches) et *P. aeruginosa* répondant positivement au test.

La souche *K. pneumoniae* a montré un résultat positif au test du double disque.

Mots clé : Bacilles à Gram négatif, β -lactamine, Résistance, BLSE.

Study of gram negative bacteria's resistance to antibiotics in hospital environment

Abstract

In recent years, bacterial resistance to antibiotic has increased significantly in Algeria, particularly in Gram-negative bacilli. In this context our work aims to determine the resistance of GNB isolated in Ahmed Ben Bella's hospital (Khenchela city) during a period from May 23rd to June 08th of the year 2021.

According to the results, the clinical samples from the different departments of Ahmed Ben Bella's hospital (Urines, Cerebrospinal fluid, Pus, etc.) were the subject of a bacteriological study by isolation and identification steps according to the biochemical gallery system (Api 20E) and the study of sensitivity to antibiotics (agar disc-diffusion testing).

This procedure led to the isolation of 12 strains of GNB, including *Escherichia coli*, the most frequently isolated species with a rate of 33.33% (4/12), followed by *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* with 25% (3/12) each one and *Enterobacter cloacae* with 16.66% (2/12).

The isolated strains, according to their resistance to ceftazidime, showed a high resistance rate for β -lactams: (16.66%) for ceftazidime, (58%) for ampicillin and (8.33%) for cefalotin.

Low resistance percentages were recorded for other families than β -lactams: (50%) for sulfamethoxazole/trimethoprim, (16.66%) for gentamycin and tobramycin and (8.33%) for levofloxacin.

About resistance to carbapenems; no bacterial strain were recorded during this study.

A phenotypic research of the production of extended spectrum β -lactamases (ESBL) was also carried out. The results show three positive synergy test results indicating the production of TEM and SHV-type enzymes by the strains: *K. pneumoniae* (2 strains) and *P. aeruginosa* responding positively to the test. *K. pneumoniae* strain showed a positive result in double disc test

Keywords: Gram negative bacilli, β -lactam, Resistance, ESBL.

دراسة مقاومة البكتيريا سالبة الجرام للمضادات الحيوية في الوسط الإستشفائي

ملخص

في السنوات الأخيرة ، ازدادت مقاومة المضادات الحيوية في الجزائر بشكل ملحوظ ، لا سيما ما يتعلق منها بالعصيات سالبة الجرام. في هذا السياق ، كان الهدف من عملنا هو تحديد مقاومة ال ع س ج المعزولة من مستشفى أحمد بن بلة بولاية خنشلة خلال الفترة الممتدة من: 23 ماي 2021 إلى غاية 08 جوان 2021.

ووفقاً لنتائج هذا العمل ، فإن العينات السريرية من أقسام مستشفى أحمد بن بلة المختلفة (بول ، سائل نخاعي ، قيح ، إلخ) كانت موضوع دراسة بكتريولوجية وفقاً لمرحل العزل وتحديد هوية البكتيريا استناداً لنظام (Api 20E) بالإضافة لدراسة الحساسية للمضادات الحيوية (طريقة انتشار الأقراص في الأجار وفقاً لمعهد المقاييس السريرية والمخبرية CLSI).

سمحت هذه الطريقة بعزل 12 سلالة من العصيات سالبة الجرام، تشمل *Escherichia coli* ، وهي النوع الأكثر عزلاً بمعدل 33.33% (12/4) ، تليها *Klebsiella pneumoniae* و *Pseudomonas aeruginosa* بمعدلات 25% (12/3) لكل منها و *Enterobacter cloacae* بنسبة 16.66% (12/2).

أظهرت السلالات المعزولة وفقاً لمقاومتها للسيفتازيديم معدل مقاومة مرتفع لمعظم البييتالاكتامينات : 16.66% للسيفتازيديم ، (58%) للأمبيسيلين و (8.33%) للسيفالوتين.

أيضا ، تم تسجيل نسب مقاومة منخفضة للعائلات أخرى من المضادات الحيوية غير عائلة بيتالاكتامينات: (50%) للسلفاميثوكسازول-وتريميثوبريم ، (16.66%) للجنتاميسين والتوبراميسين ، و (8.33%) لليوفلوكساسين. بخصوص مقاومة الكاربابينيمات ؛ لم يتم تسجيل أي سلالة بكتيرية مقاومة لها خلال هذه الدراسة.

تم أيضا إجراء بحث مظهري لإنتاج البييتالاكتاماز ذات الطيف الممتد (BLSE) حيث أظهرت النتائج وجود ثلاث صور تآزرية تدل على إنتاج أنزيمات من نوع TEM و HSV من طرف السلالات: *K. pneumoniae* (سلالتان) و *P. aeruginosa* استجاب بشكل إيجابي للاختبار. كما أظهرت *K. pneumoniae* نتيجة إيجابية في اختبار القرص المزدوج.

الكلمات المفتاحية: عصيات سالبة الجرام ، β -lactam ، مقاومة ، النمط الظاهري ، ESBL.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail ANSES. Antibiorésistance et environnement. État et causes possibles de la contamination des milieux en France par les antibiotiques, les bactéries résistantes aux antibiotiques et les supports génétiques de la résistance aux antibiotiques. Saisine 2016-SA-0252 - Antibiorésistance et environnement. RAPPORT d'expertise collective. GT «Antibiorésistance et environnement ». Novembre 2020. Anses Éditions.
2. Alfandari. S et al., La lecture de l'antibiogramme pour les nuls, V2 – 2018. CH Tourcoing, 2018. 4-5
3. Alfred Brown et Heidi Smith; Benson's Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology, Thirteenth Edition; 2012. P481
4. Anaïs Veyssiere. La résistance aux antibiotiques des bactéries les plus communément rencontrées dans les infections communautaires état des lieux en 2019. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. dumas- 02432394
5. Archambaud. M . Les Antibiotiques. Laboratoire Bactériologie-Hygiène CHU Ranguel Toulouse 2009 (présentation PowerPoint).
6. Archambaud. M. Laboratoire Bactériologie-Hygiène CHU ; Ranguel Toulouse, 2009 (présentation PowerPoint)
7. Baba Ahmed-Kazi Tani. Z, Arlet. G, Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie. Pathologie Biologie 62 (2014) 169–178.
8. Ben Haj Khalifa. A, Khedher. M, Fréquence et résistance aux antibiotiques des bactéries uropathogènes à l'hôpital universitaire Tahar Sfar de Mahdia, 2010. Revue Tunisienne d'Infectiologie, Avril 2010 - Vol.4 - N°2 - p. 57 – 61
9. Bhattacharjee. Mrinal K, Chemistry of Antibiotics and Related Drugs. 2016.
10. Carrer. A, Nordmann. P; *Klebsiella pneumoniae* CTX-M-15 : vers une modification de l'épidémiologie des β -lactamases à spectre étendu Pathologie Biologie Actualité biologique (2011) : 59 /133–135

Références bibliographiques

11. Caspar. Y, les résistances des bacilles Gram négatif, 2021. Cours de l'université Grenoble Alpes, CHU Grenoble Alpes, DU Thérapeutiques anti-infectieuses, 136.
12. Christian CATTOEN – CH Valenciennes, BLSE Bêtalactamases à spectre étendu D.U.A.C.A.I 2010 – 2011.
13. Djennane. F et al., Examen Cytobactériologique des Urines (E.C.B.U), Edition 2009. Institut Pasteur d'Algérie: Techniques Microbiologiques. 2009. 76p
14. Dubouix. A, Marty. N ; Détection des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu par biologie moléculaire : avantages, limites ; Antibiotiques 2004 ; 6 : 193-201.
15. Dustin T. King, Solmaz Sobhanifar, and Natalie C. J. Strynadka, The Mechanisms of Resistance to b-Lactam Antibiotics. Handbook of Antimicrobial Resistance 2017 Springer.
16. Françoise Van Bambeke et coll. Pharmacologie et Pharmacothérapie : Anti-infectieuse ; 1. Antibiotiques 2- Antifongiques. Unité de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire - Université catholique de Louvain 2007-2008.
17. Frédéric Robin ; Lucie Gibold et Richard Bonnet ; L'ANTIBIOGRAMME ET SON INTERPRÉTATION PHÉNOTYPIQUE EN 2012 : Résistances naturelles et acquises aux - lactamines chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quotidienne ; 2012. REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES ; 445 :2012 ; 47-58

Gautier. V c, Arlet. G c, Bakoura. R ; Prévalence et caractérisation des b-lactamases à spectre élargi chez *Klebsiella pneumoniae* dans des hôpitaux d'Alger (Algérie), Pathologie Biologie 56 (2008) 319–325.
18. Giancarlo Lancini, Francesco Parenti and Gian Gualberto Gallo, Antibiotics A Multidisciplinary Approach.1995, Springer, 278.
19. Global Health Laboratories (GHL). Microbiology Standard Operating Procedure, Bacterial Identification Using bioMérieux API Kits, COMRU-AHC. 2013. 6-17
20. Grall. N, Andremont. A, Armand-Lefèvre. L, Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ? Journal des Anti-infectieux (2011) 13, 87—102.
21. Hagop Demirdjan ; La pénicilline –découverte d'un antibiotique publié le : 01/06/06

Références bibliographiques

22. Jean Carlet, Vincent Jarlier, Bernard Regnier, actualité et **dossier** en santé publique n° 23 juin 1998 pages 21-23.
23. Jean-Marie Pagès, Eric Garnotel ; résistance aux antibiotiques : aspects techniques ; revue française des laboratoires. 2003 : 352 ; 57-63
24. Jehel. F et *al.* De l'antibiogramme à la prescription; biomérieux ; 2011
25. Lecaillon. E, Arnoud. B, Gueudet. P, Negre. C, Delpech. N et Faillie.X ; Prévalence d'entérobactéries possédant une bêta-lactamase spectre étendu chez les malades au moment de l'hospitalisation ; Méd Mal Infect. 1993 ; spécial : 431-433.
26. Marjolaine Brideau et al., Mesures de prévention et de contrôle de la transmission des bacilles Gram négatif multirésistants dans les milieux de soins aigus au Québec, 2015. Institut national de santé publique du Québec (INSPQ), Comité sur les infections nosocomiales du Québec (CINQ), Bibliothèque et Archives Canada, 3ème trimestre 2015, N° de publication : 2022, 16p
27. Michel SIMONET, La résistance des bactéries aux antibiotiques, Michel SIMONET ; 2012 (présentation en PowerPoint).
28. Mollereau. H, Porcher. Ch, Nicolas. E, Brion. A. vade-mecum du vétérinaire tome 1 quinzième édition . 1993).
29. Noël Joffin. J, Leyral. G, Microbiologie technique, Tome 1, Dictionnaire des techniques, 4ème édition, 2006. SCÉRÉN, Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine (CRDP): 2006, 363 p
30. Ola Sköld, Antibiotics and antibiotic resistance, First Edition, 2011. John Wiley & Sons, Inc. 2011, 207
31. Pascale Lesseur, Antibiotiques : mode d'action et mécanismes de résistance, 2019 Développement & santé.
32. Philippon A. Les bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu (BLSE). Immunol Biol Spec (2013), No. de Pages 10.
33. Philippon A. Résistance bactérienne: définitions, mécanismes, évolution. Elsevier Masson SAS (EMC), Paris, Maladies infectieuses, 8-006-N-10, 2008.

Références bibliographiques

34. Philippon. A ; Les bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu (BLSE) Faculté de médecine Paris-Descartes, Paris, France, Reçu le 19 avril 2013; accepté le 20 avril 2013 immuno-analyse et biologie spécialisée).
35. Prescott, Harley ; Klein, Microbiologie. 2^e édition française, traduction de la 5^e édition américaine par Claire-Michèle Bacq-Calberg et Jean Dusart .2007 P 1137
36. Ramdani-Bougoussa. N. Antibiorésistance et règles d'utilisation des antibiotiques ; Service de Microbiologie CHU Mustapha Bacha Alger. 2021
37. Réseau Algérien de la Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques (RASRBA), Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire), 7^{ème} édition, 2014. 178p
38. Réseau Algérien de la Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques (RASRBA), Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques, 13^{ème} rapport d'évaluation, janvier à décembre 2011. ANDS 2012. 139 p
39. Rodriguez-Villalobos. H, Struelens. M-J, Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu : Implications pour le réanimateur Réanimation 15 (2006) 205–213.
40. Société Française de Microbiologie (SFM), Détermination de la sensibilité aux antibiotiques. In : CASFM / EUCAST : Société Française de Microbiologie Ed ; 2018: p.7-15.
41. Sylvie Carle, La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important. Pharmactuel Vol. 42, 6-21, Supplément 2 Décembre 2009.

Sites Internet

1. Antibio-responsable, unis contre l'antibiorésistance. Tableau antibiotiques [en ligne]. Disponible sur : <https://www.antibio-responsable.fr> Consulté en juin 2021
2. Archambaud. M. Les antibiotiques. [Présentation PowerPoint]. Disponible sur : <http://www.medecine.ups-tlse.fr/pcem2/bacteriologie/atb%20action%202009.pdf> Classification des antibiotiques.
3. Collège national de pharmacologie médicale (CNPM), antibiotiques : les points essentiels, 28/12/2017, [en ligne] disponible sur : <https://pharmacomedicale.org/> consulté le 23/04/2021.
4. Dimitri Salvador. Étude structurale d'un système d'efflux tripartite bactérien MexAB-OprM impliqué dans la résistance aux antibiotiques chez Pseudomonas aeruginosa.. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2018. Français.

Disponible sur : <https://culturesciences.chimie.ens.fr/thematiques/chimie-organique/chimie-pharmaceutique/la-penicilline-i-decouverte-d-un-antibiotique/> consulté le : 20/04/2021.
5. Emilie Cardot Martin, Oana Dumitrescu, Philippe Lesprit. Planète vie, [en ligne] disponible sur : <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/microbiologie/bacteriologie/la-resistance-aux-antibiotiques> consulté le 23/04/2021.
6. EurekaSanté par VIDAL. Les critères de choix d'un antibiotique [en ligne]. Consulté le 23/04/2021 Disponible sur : <https://eurekasante.vidal.fr/medicaments/antibiotiques/prescription.html>
7. EurekaSanté par VIDAL. Les familles d'antibiotique [en ligne]. Consulté le 20/02/2021 Disponible sur: <https://www.vidal.fr/medicaments/utilisation/antibiotiques/familles.html>
8. <https://culturesciences.chimie.ens.fr/thematiques/chimie-organique/chimie-pharmaceutique/la-penicilline-i-decouverte-d-un-antibiotique> Consulté en juin 2021
9. Inserm (Institut national de la santé et de la recherche médicale), Programme prioritaire de recherche « Antibiorésistance », [en ligne] disponible sur : https://www.inserm.fr/sites/default/files/2020-01/Inserm_PPRAntibioresistance.pdf consulté le 23/04/2021.
10. Manuel d'utilisation de la galerie Api 20 E, Biomérieux. 05/2010. [en ligne] disponible sur : www.biomerieux.com consulté le 27/05/2021.

Annexes

Liste des annexes

Annexe N°01. Présentation pharmacologique des différentes classes d'antibiotiques par structure chimique commune	82
Annexe N°02 : famille des β -lactamines et leurs actions.....	84
Annexe N°03 : Liste des abréviations des antibiotiques.....	86
Annexe N° 04 : Liste des antibiotiques à tester pour les bactéries non exigeantes.....	87
Annexe N°05. Liste des antibiotiques à tester pour les bactéries exigeantes	88
Annexe N° 06. Liste des antibiotiques à tester pour les autres bactéries.....	88
Annexe N° 07. Techniques d'antibiogramme.....	89
Annexe N°08 : Tableau d'identification Api 20E.....	90
Annexe N°09. Tableau de lecture des réactions biochimiques sur Api system	91

Annexe N°01. Présentation pharmacologique des différentes classes d'antibiotiques par structure chimique commune (CNPM, 2017).

β-LACTAMINES		
Pénicillines G et V, sensibles aux pénicillinases	Céphalosporines de 1 ^{ère} génération (C1G)	Céphalosporines de 3 ^{ème} génération (C3G)
Benzylpénicilline (im, iv)	Céfaclor (vo)	Céfépime (im, iv)
Phénoxyéthylpénicilline (vo)	Céfadroxil (vo)	Céfixime (vo)
	Céfalexine (vo)	Céfopérazone (im, iv)
	Céfalotine (im, iv)	Céfotaxime (im, iv)
	Céfapirine (im, iv)	Céfotétan (im, iv)
	Céfatrizine (vo)	Céfotiam (vo)
	Céfazoline (im, iv)	Cefpirome (iv)
	Céfradine (vo)	Cefpodoxime (vo)
		Cefsulodine (im, iv)
	Ceftazidime (im, iv)	
	Ceftizoxime (im, iv)	
	Ceftriaxone (im, iv)	
Pénicillines M, résistantes aux pénicillinases	Céphalosporines de 2 ^{ème} génération (C2G)	Autres β-lactamines
Cloxacilline (vo, im, iv)	Céfamandole (im, iv)	Aztréonam (im, iv)
Oxacilline (vo, im, iv)	Céfoxitine (iv)	Imipénem + cilastatine (iv)
	Céfuroxime (vo, im, iv)	Méropénem (iv)
Pénicillines A (spectre élargi)	Pénicillines antipyocyaniques	ANTI-STAPHYLOCOCCIQUES
		Glycopeptides et divers
Amoxicilline (vo, im, iv)	Ticarcilline (im, iv)	Téicoplanine (im, iv)
Amoxicilline + acide	Ticarcilline + acide	Vancomycine (vo, iv)

Annexes

clavulanique (vo, iv) Ampicilline (vo, im, iv) Ampicilline + sulbactam (im, iv) Bacampicilline (vo) Pivampicilline (vo)	clavulanique (iv) Mezlocilline (iv) Pipéracilline (im, iv) Pipéracilline + tazobactam (iv)	Acide fusidique (vo, iv) Fosfomycine (iv)
AMINOSIDES	FLUOROQUINOLONES	MACROLIDES et apparentés
Amikacine (im, iv) Gentamicine (im, iv) Isépamicine (im, iv) Nétilmicine (im, iv) Spectinomycine (im, iv) Tobramycine (im, iv)	Ciprofloxacine (vo, iv) Lévofloxacine (vo, iv) Moxifloxacine (vo) Ofloxacine (vo, iv) Péfloxacine (iv)	Azithromycine (vo) Clarithromycine (vo) Dirithromycine (vo) Erythromycine (vo, iv) Josamycine (vo) Midécamycine (vo)
CYCLINES	IMIDAZOLES	Roxythromycine (vo) Spiramycine (vo, iv) Clindamycine (vo, im, iv) Lincomycine (vo, im, iv) Pristinamycine (vo) Quinupristine + dalfopristine (iv) Télithromycine (vo)
Doxycycline (vo, iv) Lymécycline (vo) Métacycline (vo) Minocycline (vo) Oxytétracycline (vo)	Métronidazole (vo, iv) Ornidazole (iv) Tinidazole (vo)	
SULFAMIDES	DIVERS	ANTITUBERCULEUX
Sulfadiazine (vo) Sulfaméthoxazole +Triméthoprime ou Cotrimoxazole (vo, iv)	Thiamphénicol (im, iv) Colistine (im, iv) Linézolide (vo, iv)	Ethambutol (vo); Isoniazide (vo, im, iv) ; Pyrazinamide (vo); Rifabutine (vo); Rifampicine (vo, iv) ; Streptomycine (im, iv)

vo: voie orale ; im : voie intramusculaire ; iv : voie intraveineuse

Annexe N°02 : famille des β -lactamines et leurs actions (Prescott et al., 2007).

Famille des BETA-LACTAMINES → Antibiotiques bactéricides temps dépendants avec cycle β - lactame				
DCI	Spécificité	Mécanisme d'action	EI principaux	CI et IM principales
PENICILLINES 1/ Pénicilline G Benzyl-pénicilline 2/ Pénicilline V 3/ Pénicilline M Oxacilline Cloxacilline 4/Aminopénicilline Ampicilline Amoxicilline 5/Carboxypénicilline (Ticarcilline) Uréidopénicilline (Pipéracilline)	1/ et 2/ Etroit - CG (Cocci Gram) + et - - Bacilles à Gram positif aérobies -pénicilline G : Treponema pallidum - certains anaérobies Molécules dégradées par β -lactamases 3/ Non sensibles aux β -lactamases staphylococciques → indication dans infections à staphylocoques méticilline-sensible (SAMS) 4/ Elargis aux Bacilles à G- Sensibles aux β -lactamases 5 / Plus large que pénicilline. A mais réservés aux infections les plus sévères à germes sensibles	BACTERICIDE Antibiotique temps dépendants Action inhibitrice des transpeptidases <input type="checkbox"/> Empêche la synthèse du peptidoglycane de la paroi par fixation sur les PLP (protéines de liaisons des pénicillines)	Toutes les molécules : - Allergie++ -Troubles digestifs -Troubles hématologiques Pénicillines : peu toxiques - Troubles neurologiques Céphalosporines : -Néphrotoxicité Carbapénèmes : - Encéphalopathie, convulsion Imipénèmes : -Elévation des transaminases et phosphatase	Tous : - Allergies aux β - lactamines Pénicilline : - Mononucléose infectieuse - Réactions cutanées -Association à l'Allopurinol : augmente le risque de réactions cutanées Céphalosporines : 1ère et 2ème générations : méningite car diffusion insuffisante dans le LCR (liquide
CÉPHALOSPORINES 1ère génération (C1G) Céfalotine	1ère génération : spectre étroit proche de celui des pénicillines A, mais avec une meilleure résistance aux β - lactamases			

Annexes

<p>Céfapéros 2^{ème} génération(C2G) Céfuroxime Céfamandole 3^{ème} génération(C3G) - orale Céfpodoxime Céfixime - injectable Céftriaxone Céfotaxime</p>	<p>- CG+ : SAMS, Streptocoques - Quelques Bacilles GN : Haemophilus influenzae, E. coli, Klebsiella... 2^{ème} génération Idem C1G mais avec une résistance plus importante aux β-lactamases ► utilisées contre bactéries devenues inconstamment sensibles aux C1G 3^{ème} génération : spectre large - Ensemble des entérobactéries, Haemophilus... Mais action la plus faible sur SAMS</p>		alcalines	céphalorachdien)
<p>CARBAPÉNÈM ES Imipénèmes</p>	<p>Très large : Bactéries GP et GN aérobies et anaérobies, sauf Staphylocoques meticillino-résistants (SARM) et Clostridium difficile</p>			
<p>MONOBACTA MES Aztréonam</p>	<p>Bactéries GN et CG- aérobies</p>			

Annexe N°03 : Liste des abréviations des antibiotiques (RASRBA, 2014)

Annexes

β-LACTAMINES			
Pénicilline	PEN		
Oxacilline	OXA		
Ampicilline	AMP		
Amoxicilline	AMX		
Amoxicilline+Ac.clavulanique	AMC		
Ticarcilline	TIC		
Ticarcilline +Ac.clavulanique	TCC		
Pipéracilline	PIP		
Céfalexine	LEX		
Céfazoline	CZO		
Céfalotine	CEF		
Céfpime	CPO		
Céfoxitine	FOX		
Céfotaxime	CTX		
Céfotétan	CTT		
Céfotétan+400µg Ac boronique	CTT+bor		
Céftiofur	TIO		
Céftriaxone	CRO		
Céftazidime	CAZ		
Cloxacilline	CLOXA		
Aztréonam	ATM		
Imipénème	IPM		
Céfuroxime	CXM		
Pipéracilline+ tazobactam	TAZ		
Céftazidime+ac clavulanique	CAZ CLA		
Acide clavulanique	AC		
Imipénème+EDTA	IM+ED		
Méropénème	MER		
Ertapénème	ERT		
		PHENICOLES	
		Chloramphénicol	CHL
		POLYPEPTIDES	
		Colistine	COL
AMINOSIDES			
Gentamicine	GEN		
Gentamicine Haut niveau	GEH		
Streptomycine	STR		
Streptomycine Haut niveau	STH		
Kanamycine	KAN		
Amikacine	AMK		
Tobramycine	TOB		
Nétilmicine	NET		
Spectinomycine	SPT		
Néomycine	NEO		
		GLYCOPEPTIDES	
		Vancomycine	VAN
		Teicoplanine	TEC
		SULFAMIDES ET ASSOCIES	
		Triméthoprime	TMP
		Triméthoprime+ sulfaméthoxazole	SXT
		QUINOLONES	
CYCLINES			
Tétracycline	TCY	Acide nalidixique	NAL
Doxycycline	DOX	Ofloxacine	OFX
		Ciprofloxacine	CIP
MACROLIDES		NITROFURANTOINES	
Erythromycine	ERY	Furanes	NIT
Azithromycine	AZM		
Clindamycine	CLI	AUTRES	
Pristinamycine	PRI	Acide fusidique	FUS
Spiramycine	SPI	Rifampicine	RIF
Tilmicosine	TIL	Fosfomycine	FOS

Annexe N° 04 : Liste des antibiotiques à tester pour les bactéries non exigeantes (RASRBA, 2014).

Tableau 2:Liste des antibiotiques à tester pour les bactéries exigeantes

<i>Haemophilus</i> spp.	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>N. meningitidis</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus</i> spp. Groupe <i>viridans</i>	<i>Streptococcus</i> β-hémolytique
Ampicilline ^a (10µg)	Pénicilline (10UI)	Pénicilline (CMI)	Pénicilline (CMI)	Pénicilline (CMI)	Pénicilline (10UI)
Ampicilline (2µg)	Ampicilline (10µg)	Ampicilline ^b (CMI)	Oxacilline ^c (1 µg)	Ampicilline (CMI)	Ampicilline ^b (10UI)
Amoxicilline + Ac clavulanique (20/10µg)	Céftriaxone ^d (30µg)	Céfotaxime (30µg)/ Céftriaxone (30µg)	Amoxicilline pour autre que LCR (CMI)	Céfotaxime (30µg)	Erythromycine ^e (15µg)
Céfotaxime ^f (30µg)	Tétracycline ^e (30µg)	Rifampicine (5µg)	Céfotaxime (CMI)	Pristinamycine (15µg) /Quinupristine-dalfopristine (15µg)	Clindamycine (2µg)
Tétracycline (30µg)	Spectinomycine (100µg)	Chloramphénicol (30µg)	Impénème (CMI)	Tétracycline (30µg)	Pristinamycine (15µg) /Quinupristine-dalfopristine (15 µg)
Azithromycine (15µg)	Ciprofloxacine (5µg)	Ciprofloxacine ^g (5µg)	Erythromycine (15µg)	Gentamicine (CMI pour infections graves)	Tétracycline (30µg)
Acide nalidixique (30µg)		Azithromycine ^h (15µg)	Clindamycine (2µg)	Vancomycine (30µg)	Ofloxacine (5µg)
Ciprofloxacine (5µg)			Quinupristine-dalopristine (15µg)	Chloramphénicol (30µg)	Lévofloxacine (5µg)
Lévofloxacine (5µg)			Chloramphénicol (30µg)	Rifampicine (30µg)	Vancomycine (30µg)
Chloramphénicol (30µg)			Rifampicine (5µg)	Erythromycine ⁱ (15µg)	Chloramphénicol (30µg)
Triméthoprim + sulfaméthoxazole (1.25/23.75µg)			Triméthoprim + sulfaméthoxazole (1.25/23.75µg)	Ofloxacine (5µg)	Gentamicine (500µg)
Rifampicine (5µg)			Vancomycine (30µg)	Lévofloxacine (5µg)	Rifampicine (30µg)
			Lévofloxacine (5µg)	Clindamycine (2µg)	
			Doxycycline (30µg)		
			Fosfomycine (50µg)		
			Gémifloxacine (5µg)		

a : réponse d'interprétation valable pour l'amoxicilline
 b : réponse d'interprétation valable pour céftriaxone, céfixime, céfopérazone, cédinir et céfopodoxime
 c : réponse d'interprétation valable pour tétracycline et doxycycline
 d : réponse d'interprétation valable pour la pénicilline, (voir chapitre « recherches complémentaires »)
 e : marqueur de résistance
 f : réponse d'interprétation valable pour la spiramycine

<http://www.sante.dz/aarn/index.htm>

Annexe N° 06. Liste des antibiotiques à tester pour les autres bactéries (RASRBA, 2014)

Tableau 3 : liste des antibiotiques à tester pour autres bactéries

Groupe HACEK (CMI)	<i>B. pertussis</i> ^a	<i>Listeria monocytogenes</i> (CMI)	<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	<i>Helicobacter pylori</i> (CMI)	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> (CMI)	<i>Corynebacterium</i> spp. (CMI)	<i>Pasteurella</i> spp.	Anaérobies strictes (CMI)
Pénicilline Ampicilline ^b Amoxicilline+ac clavulanique Céfotaxime Impénème Vancomycine Azithromycine Clarithromycine Ciprofloxacine Lévofloxacine Tétracycline Chloramphénicol Triméthoprim+ sulfaméthoxazole Rifampicine	Ampicilline ^b (10 µg) Céfaléxine ^c (30 µg) Erythromycine (15µg) Spiramycine (15µg) Azithromycine (15µg) Clarithromycine (15µg) Roxithromycine (15µg) Gentamicine (10µg) Acide nalidixique (30µg) Ofloxacine (5µg) Triméthoprim+ sulfaméthoxazole (1.25/23.75µg) Doxycycline (30µg)	Pénicilline Ampicilline ^b Céfotaxime ^d Triméthoprim+ sulfaméthoxazole	Erythromycine ^e (15µg) Ciprofloxacine ^f (5 µg) Acide nalidixique ^g (5µg) Tétracycline (CMI) Doxycycline (CMI)	Clarithromycine Lévofloxacine Rifampicine	Pénicilline Ampicilline ^b Céfotaxime Impénème Erythromycine Clindamycine Ciprofloxacine Lévofloxacine	Pénicilline Céfotaxime Impénème Vancomycine Gentamicine Erythromycine Clindamycine Ciprofloxacine Tétracycline/ doxycycline Triméthoprim+ sulfaméthoxazole	Pénicilline (10 U) Ampicilline ^b (10 µg) Amoxicilline+ac clavulanique (20/10 µg) Céftriaxone (30 µg) Erythromycine (15 µg) Azithromycine (15 µg) Lévofloxacine (5 µg) Tétracycline (30 µg) Doxycycline (30 µg) Chloramphénicol (30 µg) Triméthoprim+ sulfaméthoxazole (1.25/23.75 µg)	Pénicilline Ampicilline ^b Amoxicilline+acide clavulanique Ticarcilline Pipéracilline Ticarcilline+acide clavulanique Céfotaxime Impénème Clindamycine Vancomycine Chloramphénicol Métronidazole Kanamycine ^c Colistine ^c

Annexe N° 07. Techniques d'antibiogramme (RASRBA, 2014)

Tableau 6: Technique d'antibiogramme (diffusion de disques antibiotiques).

Microorganismes	Milieu	Inoculum	Conditions d'incubation
Entérobactéries <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Enterococcus</i> spp. <i>Vibrio cholerae</i> - <i>Vibrio</i> spp. <i>Aeromonas</i> spp. - <i>Plesiomonas</i> spp. Autres bactéries non exigeantes	Gélose Mueller-Hinton	0,5 MF en eau physiologique	18 heures (à prolonger pour OXA et VAN/TEC) 35°C Atmosphère ordinaire
<i>Streptococcus</i> spp.	Gélose Mueller-Hinton + 5% sang de mouton	0,5 MF en eau physiologique	20-24 heures 35°C 5%CO2
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Gélose GC+ 1% supplément*	0,5 MF en tampon Phosphate pH 7,2	20-24 heures 35°C 5% CO2
<i>Neisseria meningitidis</i>	Gélose Mueller-Hinton + 5% sang de mouton	0,5 MF en tampon PBS ou eau physiologique	18-24 heures 35°C 5% CO2 Atmosphère humidifiée
<i>Haemophilus</i> spp.	Gélose Haemophilus Test Medium*	0,5 MF en eau physiologique	16 – 18 heures 35°C 5% CO2

* : voir composition en annexe

TABLEAU D'IDENTIFICATION / IDENTIFICATION TABLE / PROZENTTABELLE / TABLA DE IDENTIFICACION / TABELLA DI IDENTIFICAZIONE / QUADRO DE IDENTIFICAÇÃO / ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ / IDENTIFIKATIONSTABEL / IDENTIFIKACYJNA

% de réactions positives après 18-24 / 48 h à 36°C ± 2°C / % of positive reactions after 18-24 / 48 hrs. at 36°C ± 2°C / % der positiven Reaktionen nach 18-24 / 48 h bei 36°C ± 2°C / % de las reacciones positivas después de 18-24 / 48 h a 36°C ± 2°C / % di reazioni positive dopo 18-24 / 48 ore a 36°C ± 2°C / % de reacções positivas após 18-24 / 48 h a 36°C ± 2°C / % θετικών αντιδράσεων μετά από 18-24 / 48 ώρες στους 36°C ± 2°C / % positiva reaktioner efter 18-24 / 48 timmar vid 36°C ± 2°C / % af positive reaktioner efter 18-24 / 48 timer ved 36°C ± 2°C / % pozytywnych reakcji po 18-24 / 48 godzinach w 36°C ± 2°C

API 20 E	V4.1	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO2	N2	MOB	MeC	OFO	OFF
<i>Burkholderia cepacia</i>		100	0	0	85	25	0	0	0	0	0	0	100	100	0	1	99	0	92	99	100	0	100	0	100	100	100	
<i>Cedreia daviesae</i>		99	89	0	99	75	0	0	0	0	89	0	100	100	10	0	0	100	0	100	1	0	99	0	87	100	100	
<i>Cedreia lapagei</i>		99	99	0	0	75	0	0	0	0	90	0	100	99	0	0	0	0	1	100	1	0	99	0	87	100	100	
<i>Citrobacter braakii</i>		99	45	0	99	75	81	1	0	4	0	0	100	100	1	100	100	1	91	99	99	0	100	0	95	100	100	
<i>Citrobacter freundii</i>		99	24	0	0	75	75	1	0	1	0	0	100	99	25	99	99	99	82	40	99	0	98	0	95	100	100	
<i>Citrobacter koseri</i>		99	75	0	100	97	0	1	0	99	0	0	100	100	25	99	99	99	1	1	98	99	0	100	0	95	100	
<i>Citrobacter koseri</i> sensu lato		99	2	0	100	25	0	1	0	99	0	0	100	100	1	99	99	99	99	99	99	99	0	100	0	95	100	
<i>Citrobacter youngii</i>		100	99	0	1	80	80	0	0	1	0	0	100	100	0	95	100	100	0	25	100	0	85	0	95	100	100	
<i>Edwardsiella ictalurae</i>		0	0	100	99	99	99	0	0	99	0	0	100	100	0	0	1	100	0	0	1	0	100	0	100	100	100	
<i>Edwardsiella ictalurae</i> sensu lato		0	0	100	99	1	75	0	0	99	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0	1	0	100	0	98	100	100	
<i>Enterobacter aerogenes</i>		99	0	99	98	82	0	1	0	0	85	0	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	0	100	0	97	100	
<i>Enterobacter amnigenus</i> 1		99	25	0	99	40	0	0	0	0	75	0	100	100	0	1	100	99	99	99	99	0	100	0	92	100	100	
<i>Enterobacter amnigenus</i> 2		99	80	0	99	80	0	0	0	0	75	0	100	100	0	99	100	1	99	99	99	0	100	0	100	100	100	
<i>Enterobacter asburiae</i>		100	25	0	99	80	0	0	0	0	10	0	100	99	25	100	0	99	0	100	100	0	100	0	95	100	100	
<i>Enterobacter canovorum</i>		100	75	0	99	99	0	0	0	0	89	0	100	100	0	1	100	1	1	100	100	0	100	0	99	100	100	
<i>Enterobacter cloacae</i>		98	82	1	92	90	0	1	0	0	85	0	99	99	12	90	85	96	90	99	99	0	100	0	95	100	100	
<i>Enterobacter gergoviae</i>		99	0	32	100	75	0	99	0	0	90	0	100	99	23	1	100	99	100	99	100	0	100	0	99	100	100	
<i>Enterobacter intermedium</i>		99	0	0	99	1	0	0	0	0	2	0	100	97	0	88	99	40	100	99	99	0	100	0	92	100	100	
<i>Enterobacter sakazakii</i>		100	99	0	91	94	0	1	0	25	91	10	100	100	75	8	99	99	99	99	99	0	100	0	96	100	100	
<i>Escherichia coli</i> 1		99	1	74	70	0	1	3	0	89	0	0	99	98	1	91	82	36	75	3	99	0	100	0	95	100	100	
<i>Escherichia coli</i> 2		26	1	45	20	0	1	1	0	90	0	0	99	90	1	42	30	3	3	1	70	0	98	0	5	100	100	
<i>Escherichia fergusonii</i>		96	1	99	100	1	0	0	0	99	0	0	100	99	1	0	87	0	1	99	99	0	100	0	93	100	100	
<i>Escherichia hermannii</i>		100	0	1	100	1	0	0	0	99	0	0	100	100	0	0	99	25	0	99	99	0	100	0	99	100	100	
<i>Escherichia vulneris</i>		100	30	99	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	1	95	7	95	95	99	0	100	0	100	100	100	
<i>Enterobacter amnigenus</i> sensu lato		98	0	0	0	75	0	0	0	0	95	1	99	99	0	1	99	0	1	99	1	0	100	0	85	100	100	
<i>Haemophilus abaci</i> 1		75	0	99	99	99	0	10	0	0	99	0	99	99	0	1	99	0	0	25	99	0	100	0	95	100	100	
<i>Haemophilus abaci</i> 2		80	0	99	99	1	0	1	0	0	10	0	99	98	0	1	1	1	0	0	1	0	100	0	9	100	100	
<i>Haemophilus oxytoca</i>		99	0	80	0	89	0	76	0	99	80	0	100	100	99	100	99	99	100	100	100	0	100	0	0	100	100	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>oceanus</i>		94	18	25	1	15	0	1	0	0	1	0	99	96	57	86	58	20	80	87	85	0	92	0	0	100	100	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>		99	0	73	0	86	0	75	0	0	90	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	0	100	0	0	100	100	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>rhinoscleromatis</i>		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	100	90	90	75	75	1	99	10	0	100	0	0	100	100	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>rhinoscleromatis</i> sensu lato		95	0	25	99	80	0	0	0	80	0	0	100	99	0	25	93	89	99	99	99	0	95	0	94	100	100	
<i>Ledيريا adhaerens</i>		99	0	0	0	0	0	1	0	99	0	1	100	99	0	2	100	86	99	99	100	0	100	0	100	100	100	
<i>Moraxella elscapronae</i>		97	0	0	0	40	0	0	0	15	1	0	100	1	0	0	0	100	99	0	0	0	90	0	0	100	100	
<i>Moraxella moraxii</i>		1	0	10	98	1	1	99	93	99	0	0	99	0	0	0	0	1	0	0	0	0	88	0	95	100	100	
<i>Parvula app</i> 1		85	1	0	0	13	0	1	0	1	9	1	100	99	1	26	1	98	26	99	61	0	85	0	85	100	100	
<i>Parvula app</i> 2		99	1	0	0	99	0	1	0	83	62	4	100	99	36	82	90	98	81	99	99	0	85	0	85	100	100	
<i>Parvula app</i> 3		99	1	0	0	21	0	1	0	1	86	15	100	99	34	1	97	93	23	85	97	0	85	0	85	100	100	
<i>Parvula app</i> 4		86	1	0	0	29	0	0	0	59	1	1	99	100	10	32	99	72	89	99	99	0	85	0	85	100	100	
<i>Proteus mirabilis</i>		1	0	0	99	99	75	99	99	1	1	82	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	93	0	95	100	100	
<i>Proteus plesium</i>		1	0	0	0	1	20	100	99	0	0	90	99	0	0	0	0	100	0	1	0	0	99	0	95	100	100	
<i>Proteus vulgaris</i> group		1	0	0	0	12	83	99	99	93	0	74	99	1	1	0	1	89	0	88	1	0	100	0	94	100	100	
<i>Providencia alcalifaciens</i> ssp. <i>alcalifaciens</i>		0	0	0	0	89	0	0	100	99	0	0	99	1	1	0	0	1	0	0	1	0	96	0	84	100	100	
<i>Providencia nitida</i>		1	1	0	0	74	0	99	99	99	0	0	98	82	76	1	59	25	0	48	1	0	96	0	84	100	100	
<i>Providencia stuartii</i>		1	0	0	0	85	0	98	98	95	0	0	98	3	80	0	0	15	0	0	0	0	100	0	85	100	100	
<i>Rahnella aquatica</i>		100	0	0	0	90	0	0	1	0	99	0	100	100	0	98	99	100	97	100	98	0	100	0	9	100	100	
<i>Rahnella ornithinolytica</i>		100	0	99	99	99	0	85	0	100	65	0	100	99	99	100	100	100	100	100	100	0	100	0	0	100	100	
<i>Rahnella terrigena</i>		100	0	99	6	82	0	0	0	0	75	0	99	99	99	99	99	100	100	99	0	0	100	0	0	100	100	
<i>Rahnella thalassae</i> ssp. <i>thalassae</i>		98	75	97	98	75	99	0	0	1	0	0	100	99	0	99	99	1	78	0	99	0	100	0	99	100	100	
<i>Rahnella thalassae</i> ssp. <i>thalassae</i> sensu lato		0	15	99	99	6	84	0	0	0	0	0	100	99	0	98	99	0	20	0	0	0	100	0	95	100	100	
<i>Rahnella</i> ser. <i>Gallinarum</i>		0	1	100	1																							

Annexe N°09. Tableau de lecture des réactions biochimiques sur Api system (Djennane et al., 2009)

Tests	Résultats		
Urée	Négatif	Positif	
	Orange	Rose	
Indole	Kovacs / immédiat		
	Pas d'anneau	Anneau rouge / rose	
TDA	TDA / immédiat		
	Marron	Brun rouge	
VP	Vp1+vp2 / 10minute		
	Incolore	Rose / rouge	
RM	RM / IMMEDIAT		
	Incolore	Rouge	
TSI (glucose, saccharose, lactose)	Rouge	Jaune	
Citrate de simmons	Vert	Bleu	
Disque OPNG	Incolore	Jaune	
Témoin d'acide amine	Violet		Jaune
LDC ODS ADH	Violet Violet Violet	Zone intermédiaire	
		Jaune	
		Violet	