



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Entrer votre filière
Entrer votre spécialité

Réf. :

Présenté et soutenu par :
Khaled MENASRI

Le : mercredi 10 juillet 2019

Thème

Importance de laboratoire d'hygiène hospitalière dans le Dépistage de patient porteurs des BMR et BHR dans un hôpital: caractérisation et identification phénotypique des souches BMR et BHR par la méthode d'antibiotypage

Jury:

Mr	BENMEDDOUR Tarek	M.C.A	Université de Biskra	Promoteur
Mr	GUEMAZ Fateh	M.A.A	Université de Biskra	Président
Mme	MOHAMMEDI Kenza	M.A.B	Université de Biskra	Examinatrice

Année universitaire: 2019/2020

Remerciements

Je remercie en premier lieu Dieu tout puissant de m'avoir accordé la puissance et la volonté pour achever ce travail.

Ce travail a été effectué au laboratoire de microbiologie de CRSTRA Biskra, dirigé par Dr Gouil Widad ; pharmacienne spécialiste en microbiologie à l'établissement public hospitalier Dr Saadane Biskra, mon plus grande gratitude va à mon encadreur, Dr Ben Meddour Tarek ; pour sa disponibilité et la confiance qu'il m'a accordé.

J'adresse mes sincères remerciements à Dr Abed Elhamid Foughalia, responsable de laboratoire de microbiologie de CRSTRA Biskra et tous mes professeurs, qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé mes réflexions et répondre à mes questions durant mes études.

J'exprime tout mon reconnaissance à Dr Guemaz F et Dr Mhammedi K pour avoir bien voulu accepter de présider le jury de ce mémoire. Afin de n'oublier personne, mes vifs remerciements s'adressent à tous ceux qui m'ont aidée à la réalisation de ce modeste mémoire

Table des matières

Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des abréviations	III
Introduction	4
Chapitre 1. Les antibiotiques	6
1.1. Définition des antibiotiques	6
1.2. Origine des antibiotiques	6
1.3. Les bêtalactamines	6
1.3.1. Définition des bêtalactamines	6
1.3.2. Classification des bêtalactamines	6
1.3.2.1. Les pénames	7
1.3.2.2. Les céphames	7
1.3.2.3. Les monobactames	7
1.3.2.4. Les carbapénames	7
1.4. Modalités d'action d'antibiotique sur la cellule bactérienne	7
1.4.1. Action sur la paroi bactérienne	7
1.4.2. Action sur la synthèse des acides nucléiques et protéiques	8
1.4.2. Action d'inhibition de certaines voies métaboliques	8
1.5. Définition de la résistance aux antibiotiques	8
Chapitre 2. Mécanismes de la résistance aux antibiotiques	9
2.1. Mécanismes génétiques de la résistance	9
2.1.1. Facteurs génétiques de la résistance	9
2.1.1.1. Facteurs chromosomique	9
2.1.1.2. Facteurs plasmidique	9
2.2. Mécanismes biochimiques de la résistance	9
2.2.1. Altération de la pénétration de l'antibiotique dans la cellule-cible	9
2.2.2. Modification du métabolisme intracellulaire de l'antibiotique	10
2.2.3. Changement de structure de la cible moléculaire de l'antibiotique	10
2.2.4. Autres	10
2.3. Classification des bêtalactamases	11
2.3.1. Définition des bêtalactamases	11
2.3.2. Mode d'action des bêtalactamases	11

2.3.3. Les inhibiteurs de bétalactamase	11
2.3.4. La classification des bétalactamases	12
2.4. Notions des BMR et BHR	13
Chapitre 3. Matériel et méthodes	14
3.1. Matériel biologique	14
3.1.1. Souches de références	14
3.1.2. Souches isolées	14
3.2. Protocole expérimentale	15
3.2.1. Etapes de la préparation de milieu Driglaski	15
3.2.2. Les antibiotiques utilisées	15
3.2.2.1 Disques des antibiotiques pour antibiogramme cartouche : Bio-Rad	15
3.2.2.2 .Antibiotiques en poudre pour préparation injectable	16
3.2.3. Préparation de milieu de culture synthétique : sélectif pour l'isolement	16
des BMR et BHR	
3.2.3.1. Préparation de la gélose DRIGLASKI + CEFTAZIDINE	16
3.2.3.2. Préparation de la gélose DRIGLASKI + CEFOTAXIME	17
3.2.3.3 : Préparation de la gélose DRIGLASKI + ZNSO4	17
3.3. Les prélèvements	19
3.3.1. Services concernés par le dépistage	19
3.3.2. Mode opératoire de prélèvements bactériologiques à la recherche des	19
BMR	
3.4. Culture et isolement	20
3.5. Lecture des boîtes et identification	21
3.5.1. Examen macroscopique des caractères cultureux	21
3.5.2. Test TSI (Triple Sugar Iron)	21
3.5.3. Disque pour test d'oxydase	22
3.5.4. Test de coagulase (pour les staphylocoques)	22
3.5.5. Galerie API20E	22
3.4. Etude de mécanisme de la résistance	23
3.4.1. Antibiogramme	23
3.4.2. Tests complémentaires pour la détection des BMR et BHR	25
3.4.2.1. Méthodes indirectes	25
3.4.2.2. Méthodes directes : détection de carbapénimase par le test CIM	27

3.4.2.3. La recherche des MRSA	28
3.5. Conservation des souches	22
Chapitre 4. Résultats et discussions	29
4.1. Les prélèvements	29
4.2. Identification des BMR et BHR isolées	31
4.3. Etude de profil de la résistance	34
4.3.1 Tests d'identifications phénotypiques des souches isolées	36
4.3.1.1 La détection des BLSE	38
4.3.1.2 Le test double disque	38
4.3.1.3 Détection des BHR : La recherche des EPC par le test CIM	38
4.3.1.4. E.test	40
4.3.2. Répartition des BMR et BHR isolées selon le service	41
4.3.3. Fréquence des facteurs de risques influençant sur la dissémination des BMR et des BHR chez les patients étudiés	43
Conclusion	45
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumés	

Liste des Tableaux

Tableau 01.	Classification des bêtalactamases	12
Tableau 02.	Nombres des BMR et BHR isolées par services hospitaliers	14
Tableau 03.	Disques des antibiotiques pour antibiogramme	16
Tableau 04.	Antibiotiques en poudre pour préparation injectable	16
Tableau 05.	Techniques de prélèvement selon BMR rechercher	20
Tableau 06.	Caractères macroscopiques des souches sur les milieux de cultures	21
Tableau 07.	Technique et lecture de test TSI	21
Tableau 08.	Lecture de test coagulase	22
Tableau 09.	Lecture des souches BLSE sur antibiogramme	25
Tableau 10.	Souches bactériennes isolées à partir des patients hospitalisés à l'établissement public hospitalier Bachir Ben Nacer, Biskra	30
Tableau 11.	Résultat de profil des antibiogrammes des souches isolées	34

Liste des Figures

Figure 01.	Structure chimique des bétalactamines	7
Figure 02.	Mode d'action de bétalactamase	11
Figure 03.	Structure chimiques des inhibiteurs de bétalactamase	12
Figure 04.	Bactérie de la flore intestinale sur DRIGLASKI sans antibiotiques	18
Figure 05.	Contrôle de milieu de culture synthétisé (témoin positive)	18
Figure 06.	Contrôle de milieu de culture synthétisé (témoin négative)	19
Figure 07.	Démonstration technique de test CIM à la recherche de carbapénimase	28
Figure 08.	Pourcentages des souches isolées selon les services de l'établissement public hospitalier Bachir Ben Nacer, Biskra	32
Figure 09.	Aspect macroscopique des souches isolées sur différents milieux de cultures	33
Figure 10.	Galerie biochimique classique et galerie API20E	33
Figure 11.	Résultats de test coagulase et oxydase positives	34
Figure 12.	Image de synergie d'une souche BLSE positive	37
Figure 13.	Test double disques positive d'une souche BLSE+	38
Figure 14.	Test CIM positive d'une souche BHR+	39
Figure 15.	Test Etest d'une souche BHR positive	40
Figure 16.	Répartition (en nombre) des souches BMR et BHR isolées selon les services de l'établissement public hospitalier Bachir Ben Nacer, Biskra	41
Figure 17.	Les pourcentages des espèces de BMR et BHR isolées au service de réanimation dans l'établissement public hospitalier Bachir Ben Nacer, Biskra	42
Figure 18.	Les pourcentages des espèces de BMR et BHR isolées au service de sénologie dans l'établissement public hospitalier Bachir Ben Nacer, Biskra	42
Figure 19.	L'incidence de portage des BMR et BHR selon les facteurs de risques	43

Liste des abréviations

BMR	Bactéries multi résistantes
BHR	Bactéries hautement résistantes
BHRe	Bactéries hautement résistantes émergentes
BLSE	Bêta-Lactamases à spectre étendu
EPC	Entérobactéries productrices de carbapénèmases
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
GISA	Glycopepti-des-intermediate <i>S. Aureus</i>
VISA	Vanco-mycin-intermediate <i>S. Aureus</i>
CMI	Concentration minimale d'inhibition
CIM	Carbapenem inactivation method
ABR	<i>Acinetobacter baumannii</i> résistant
IBL	Inhibiteur des bêtalactamases
TSI	Triple sugar iron
BGT	Bouillon glucosé tamponné
C3G	Céphalosporine de troisième génération
DCI	Dénomination commun internationale

Introduction

La progression mondiale de la résistance aux antibactériens est actuellement un problème de santé publique (Spellberg et *al.*, 2004).

L'émergence et la propagation de la résistance aux antimicrobiens sont le résultat d'une pression sélective exercée par les antibiotiques et de la transmission de bactéries multirésistantes.

Les bactéries multirésistantes sont des souches appartiennent à la flore hospitalière, responsable généralement des infections nosocomiales, c'est une population microbienne implantée dans les services et qu'on peut considérer comme un réservoir.

Elle est composée des flores des malades, du personnel hospitalier, des germes, de l'environnement qui existent sur les sols, les objets, dans l'eau, les circuits de climatisation.

La résistance bactérienne aux antibiotiques est une priorité de santé publique qui nécessite des actions concertées, tant en médecine de ville que dans les établissements de santé (Simonsen et *al.*, 2004).

Dans le cadre de la lutte contre l'apparition et la dissémination des BMR et BHR on a choisi la méthode de dépistage systématique des malades admis aux services de l'établissement public hospitalier Bachir Ben Nacer, Biskra

Cette étude a pour objectifs la prise en charge optimale individuelle du patient en prenant en compte également la dimension humaine des soins délivrés et le nécessaire contrôle du risque de transmission croisée.

Cette étude est basée sur les méthodes de laboratoire de détection des BMR et BHR et sur l'identification des patients porteurs des BMR et BHR responsables des infections et de la colonisation ou les porteurs sains des BHR.

Cette étude prospective a pour but en premier lieu de montrer l'importance de laboratoire de l'hygiène hospitalier dans l'identification de ces souches pour prendre les précautions d'isolement des porteurs des BMR et BHR afin d'éviter les infections croisées et les épidémies de BMR. Il est d'une grande importance que tout établissement de santé doit mettre en œuvre une politique active de lutte contre les BMR.

En effet la détermination phénotypes des souches isolées nous permet d'évaluer le type et le mécanisme de résistance en se basant sur les profils de résistance aux bêtalactamines et autres familles d'antibiotiques.

1.1. Définitions des antibiotiques

Les antibiotiques sont définis comme : des agents antibactériens, des composés naturels ou synthétiques inactivant les micro-organismes spécifiques à faibles concentrations et qui sont capables d'inhiber leurs croissances ou les tuer (Ola, 2010).

1.2. Origine des antibiotiques

Les premiers antibiotiques étaient d'origine naturelle (Aminov, 2010). Actuellement la préparation et la fabrication des antibiotiques à usage médical regroupent des composants d'origine synthétique et semi-synthétique.

1.3. Les bêta-lactamines

Il existe plusieurs façons de classifier les antibiotiques, en se basant sur plusieurs critères : Leur structure chimique, leur mécanisme d'action sur la cellule bactérienne (la cible thérapeutique), la voie d'administration ; leurs origines et leur spectre d'activité spécifique. Mais les systèmes de classification les plus adaptés sont basés sur leur structure moléculaire, et leur mécanisme d'action (Calderon et Sabundayo, 2007). La cible d'action de l'antibiotique est l'un des caractères de base de classifications, (Yves et Michel, 2009). On peut regrouper les différentes familles d'antibiotiques autour de quatre (par rapport aux mécanismes d'action principaux) (Van et *al.*, 2011). Les bêta-lactamines, les aminosides, les quinolones, les sulfonamides

1.3.1. Définition des bêtalactamines

Les premiers antibiotiques utilisés en milieu hospitalier vu leur spectre d'action, leur efficacité et leur faible toxicité (Owens et Shorr, 2009). Il empêche la synthèse de la paroi bactérienne (Bimal, 2017). La structure de base de cette famille est le noyau bêta-lactame ; qui peut se diviser en quatre sous familles :

1.3.2. Les groupes des bêtalactamines

- 1.3.2.1. Les pénames

C'est un cycle β -lactame associé à un cycle thiazolidine et sont les premiers antibiotiques synthétisés de manière industrielle (Kirkiacharian, 2010).

- **1.3.2.2. Les céphèmes**

C'est une substitution de cycle thiazolidine de la pénicilline par un cycle dihydrothiazine. Elles sont classées en différentes générations selon la date d'apparition de leurs analogues avec de nouvelles propriétés (Femandes et Amador, 2013).

- **1.3.2.3. Les monobactames**

Contrairement aux autres bêta-lactamines, le cycle de bêta lactame est libre et n'est pas associé avec autres radicaux ; dont le spectre d'activité est très spécifique (actif contre les bactéries Gram négatif) (Skykes *et al.*, 1981).

- **1.3.2.4. Les carbapénèmes**

D'autres modifications structurelles sont possibles du noyau du b-lactame (fig. 1) qui donne naissance à la classe d'antibiotiques carbapénèmes et ont conféré un spectre d'activité plus large, y compris une activité contre les Gram négatif producteurs de b-lactamase (Brunton *et al.*, 2017).

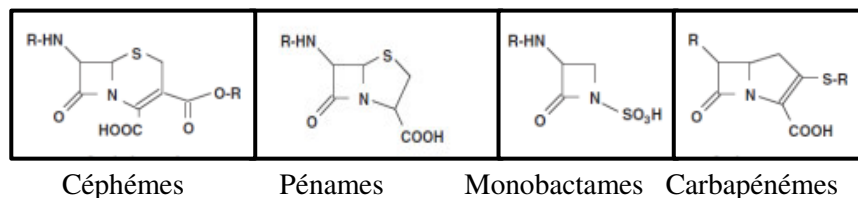


Figure 1. Structures chimiques des bêta-lactamines (Nordmann *et al.*, 2012)

1.4. Modalité d'action des antibiotiques sur la cellule bactérienne

Les antibiotiques agissent contre la cellule bactérienne sur trois grandes catégories de cibles cellulaires (Yves et Michel, 2009).

1.4.1. Action sur la paroi bactérienne

Les bêta-lactamines agissent (action bactéricide) sur la paroi en inhibant la formation des liaisons peptidiques, surtout dans la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane (Brunton *et al.*, 2017).

1.4.2. Action sur la synthèse d'acide nucléique et de protéines

Les aminosides sont des antibiotiques qui exercent leurs effets en inhibant la synthèse de protéines bactériennes (Rachel et Kristina, 2019). L'action de ce type des antibiotiques est bactériostatique, le chloramphénicol agit contre la cellule par l'arrêt de la synthèse peptidique (Brunton et *al.*, 2017). Les quinolones sont des antibiotiques bactéricides agissent sur la synthèse de l'ADN (Gilbert et *al.*, 2011).

1.4.3. Action sur certaines voies métaboliques essentielles pour la cellule bactérienne

Inhibition compétitif de la dihydroptéroate synthase, une enzyme impliquée dans la synthèse de l'acide folique (Talaro et Chess., 2008).

1.5 Définition de la résistance aux antibiotiques

L'utilisation appropriée ou inappropriée des antibiotiques est à l'origine de l'apparition de phénomène de résistance. Pour bénéficier d'un traitement optimal lors d'une infection bactérienne, mais en contrepartie le risque d'apparition des souches résistantes est un risque qui contrebalance les qualités des antibiotiques. En effet leurs sur-indication et l'utilisation systématique et déraisonnée entraîne l'apparition des souches devenue résistantes aux antibiotiques, ce phénomène porte le nom antibiorésistance (Leekha et *al.*, 2008). Une bactérie est dite résistante lorsqu'elle réunit deux propriétés (François, 2003).

- Possède une information génétique lui permettant d'élaborer des mécanismes d'échappement à l'action de l'antibiotique.
- Réalise effectivement ces mécanismes.

2.1. Mécanismes génétiques de la résistance aux antibiotiques

Certaines espèces bactériennes sont résistantes à quelques antibiotiques de manière innée (ou naturelle) le caractère de la résistance dans ce cas est porté sur le chromosome et l'on dénomme intrinsèque. Par contre nous constatons régulièrement que des bactéries initialement sensibles à un antibiotique deviennent résistantes. Ce changement dû à une modification génétique soit par mutation, soit par acquisition de matériel génétique (un plasmide) à l'action des antibiotiques. On parle alors de résistance acquise (Yvon, 2009).

2.1.1. Facteurs génétiques de la résistance

2.1.1.1. La résistance chromosomique

Elle est toujours liée à des mutations de l'ADN bactérien lors de la réplication, ces mutations chromosomiques sont héréditaires et réversibles rare et spontanées.

2.1.1.2. La résistance plasmidique

Ce type de résistance est très fréquente présente 90% de résistance acquise qui se traduit par la production des enzymes spécifiques pour inhiber ou bloquer l'activité de l'antibiotique (Yvon, 2009).

2.2. Les mécanismes biochimiques de la résistance aux antibiotiques

Les bactéries synthétisent un ensemble des enzymes inactivant l'antibiotique ; ils peuvent être regroupés en trois grands types de mécanismes :

2.2.1. Une altération de la pénétration de l'antibiotique dans sa cellule-cible (bactérie)

Grace à un mécanisme qui bloque le passage de l'antibiotique vers le milieu intracellulaire dans ce cas l'antibiotique ne traverse pas la paroi et/ou la membrane cytoplasmique pour exercer son effet bactéricide on parle alors de phénomène d'imperméabilité aux antibiotiques (Boutal, 2017).

Exemple

Les systèmes enzymatiques impliqués dans la résistance aux bêta-lactamines par modification des systèmes de porines, ces systèmes sont considérés comme les canaux d'entrée pour les

bêta-actamines à travers la membrane externe. Leur modification permet donc d'empêcher l'entrée des bêta- lactamines dans la bactérie. Chez les bactéries à Gram négatif une mutation dans la séquence du gène *ompF* codant pour une porine d'*E.Coli* entraîne une résistance aux b-lactamines (Léa *et al.*, 2001).

2.2.2. Une modification du métabolisme intracellulaire de l'antibiotique avec formation de catabolites inactifs

Dans ce cas y aura une perte d'affinité de l'antibiotique vue plusieurs facteurs parmi lesquels :

- Altération de la cible de beta-lactamines ; la modification porte sur les protéines liant les pénicillines ou PLP (Léa *et al.*, 2001).
- Une mutation sur le gène responsable de la cible spécifique qui rend l'affinité de l'interaction avec l'antibiotique très faible (Hooper, 2002).
- Modification de la structure protéique de la cible par action de méthylation sur le ribosome (résistance aux macrolides) (Leclercq, 2002).

2.2.3. Un changement de structure de la cible moléculaire de l'antibiotique la rendant insensible à ce dernier

Ce processus est très répandu chez les entérobactéries responsables des infections nosocomiales (Femandes *et al.*, 2013) par la production d'un enzyme bêta-lactamase qui dégrade les bêta-lactamines parmi elles celles codées par le gènes *bla* (Léa *et al.* , 2001), qui va modifier la structure moléculaire de l'antibiotique par action d'acétylation, phosphorylation ou adénylation (Bonomo, 2017), donc ce dernier ne pourra plus se fixer à son cible.

2.2.4. Autre mécanismes : Efflux ou l'excrétion de l'antibiotique

Ce processus est basé sur des pompes protéiques (Webber *et al.*, 2003) qui jouent un rôle essentiel dans l'extrusion de l'antibiotique vers le milieu extracellulaire (Bambeke *et al.*, 2000). Ce système conduit à une diminution de la concentration de l'antibiotique dans le milieu intracellulaire et responsable généralement à une multi-résistance. On peut le retrouver chez les bactéries Gram négatif et les Gram positif (Xian *et al.*, 2016).

2.3. Classification des bêta-lactamases

2.3.1. Définition de bêtalactamase

Les bêta-lactamases sont des enzymes produites par des souches bactériennes de grande d'importance clinique (Robert et *al.*, 2007). Ils constituent un des principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques de la famille bêta-lactamine. La production de ces enzymes joue un rôle très important dans l'apparition des souches bactériennes multi-résistantes et hautement-résistantes fréquemment chez les bactéries Gram négatif notamment (Robert et *al.*, 2007). *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* (Asad, 2013).

2.3.2. Mode d'action de bêtalactamase

Ces enzymes dégradent la fonction amine des bêta-lactamine (fig. 2) par réaction d'hydrolyse, alors en fonction de groupe de bêtalactamines hydrolysé on peut trouver : des bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE), des céphalosporinases, carbapénémases et les pénicillinases.

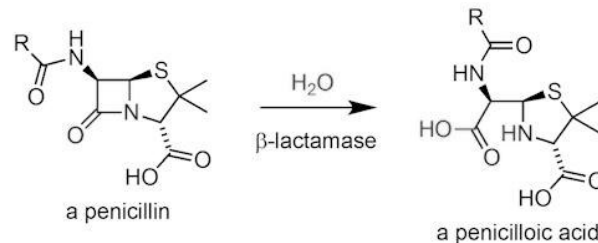


Figure 02 : Mode d'action de bêtalactamase (Jean et Joffin., 2001)

2.3.3 : Les inhibiteurs de bêtalactamase

Sont des substances produit par *Streptomyces clavuligerus* jouent rôle d'une inhibiteur chimique, développer pour lutter l'action de bêtalactamase en protégeant le noyau de bêtalactamines contre l'hydrolyse de ces enzymes. Les IBL les plus répondue dans le domaine pharmaceutique sont (figure. 3) : l'acide clavulanique, le tazobactam et le sulbactam (Drawz et Bonomo, 2010). Mais peu actif sur les céphalosporinases. Il est employé en association

avec d'autres pénames : Acide clavulanique + amoxicilline = Augmentation ,Acide clavulanique + ticarcilline = Claventin

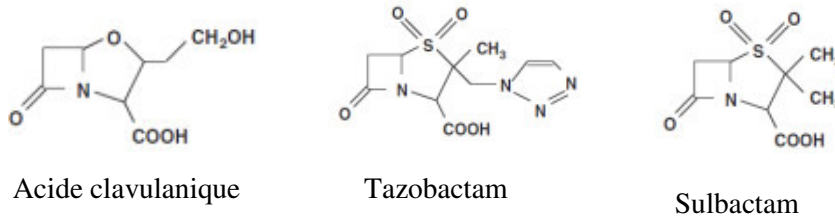


Figure 03. Structure chimiques des inhibiteurs de bêta-lactamase (Nordmann et *al.*, 2012)

2.3.4. Classification des bêta-lactamases

La classification des bêta-lactamases est basée sur la structure et la fonction de ces enzymes (Bush., 2010). Selon Ambler ; on peut classer les bêta-lactamases en fonction de leur séquence en acides aminés, on parle alors de la classification structurale (Ambler. 1980). Selon Bush-Jacoby-Medeiros; on peut classer les bêta-lactamases en fonction de leur substrats et de leurs inhibiteurs elles sont classées en 4 groupes (tableau. 1) (Thomas et *al.*, 2007). Dans le domaine de la bactériologie clinique nous adaptons à la classification d'Ambler .

Tableau 01 : Classification des bêta-lactamases (Thomas et *al.*, 2007)

Classification d'Ambler	Caractéristiques
Classe A	Pénicillinases,elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines
Classe B	Métallo-β-lactamases, hydrolysent tous les bêta-lactamines
Classe C	Céphalosporinases chromosomiques des bactéries Gram négatif hydrolysent préférentiellement les céphalosporines.
Classe D	Oxacillinases, ces enzymes sont caractérisées par une hydrolyse rapide de l'oxacilline.
Classification de Bush	Caractéristiques
Classe 1	Céphalosporinases non inhibées par l'acide clavulanique
Classe 2	Bêta-lactamase inhibée par les inhibiteurs de la bêta-lactamase
Classe 3	Métallo-bêta-lactamases faiblement inhibées par tous les inhibiteurs classiques de la bêta-lactamase
Classe 4	Pénicillinases non inhibées par l'acide clavulanique

2.4 : Notions des bactéries multi-résistantes et hautement-résistantes

Le terme de la multirésistance est très large, deux sens les plus communément acceptés de la multirésistance bactérienne tournent autour de bactéries qui sont résistantes à de nombreux antibiotiques ou qui sont résistantes à beaucoup plus d'antibiotiques que la connaissance du phénotype sauvage ne le laissait prévoir. La multirésistance bactérienne résulte de l'accumulation de résistance à un nombre important d'antibiotiques appartenant à des familles variées et donc ayant des mécanismes d'action très divers. (Serge, 2017)

Enfin, les BHR évoluant sous un mode endémo-épidémique, ce qui caractérise ces bactéries est le fait qu'elles sont des commensales du tube digestif à fort potentiel de diffusion tant à l'hôpital qu'en ville, on parle alors de BHR, « e » pour émergentes. Cette stigmatisation pourra être étendue au-delà des ERG et EPC quand émergeront de nouvelles BHR commensales du tube digestif, à fort potentiel de diffusion et porteuses de mécanismes de résistances transmissibles. (Magiorakos et al., 2012)

Selon l'organisation mondiale de la santé OMS et les normes de l'hygiène hospitalier, les BMR et les BHR sont classées comme suivant :

Priorité 1 : critique

- *Pseudomonas aeruginosa*, résistance aux carbapénèmes
- *Enterobacteriaceae*, productrices de β -lactamase à spectre étendu ou les entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération

Priorité 2: élevée

- SARM *Staphylococcus aureus*, résistance à la méthicylline, résistance intermédiaire ou complète à la vancomycine ; glycopepti-des-intermediate *S. aureus* GISA et vancomycin-intermediate *S. aureus*, VISA.

Priorité 3: moyenne

- *Streptococcus pneumoniae*, insensible à la pénicilline (site web)

3.1. Matériel biologique

3.1.1. Souches de références

Les souches de référence pour le contrôle de l'antibiogramme et autres caractères biochimiques ont été fournies par le laboratoire de bactériologie de l'établissement Public Hospitalier Docteur Saadane, Biskra

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Klebsiella pneumoniae* Kp BA 1705
- *Staphylococcus aureus* ATCC 5923
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

3.1.2. Souches isolées

Différents souches BMR et BHR étaient isolées à partir de 25 patients hospitalisés à l'établissement public hospitalier Bachir Ben Nacer, Biskra (tab. 2) dont les prélèvements sont d'origines rectale et nasale et de différents services hospitaliers, l'étude était effectuée pendant 3 mois de travail au laboratoire de microbiologie de CRSTRA Biskra.

Tableau 02: Nombre des souches BMR et BHR isolées par service hospitalier

Service hospitaliers	Réanimation	sénologie	Orthopédie	Chirurgie
BMR	12	4	0	3
BHR	4	1	0	0

3.2 Protocole expérimentale

Nous avons choisi d'étudier la recherche de portage des BMR et BHR dans un établissement public hospitalier, pour cela on a choisi la méthode de dépistage systématique des patients à risque élevé de portage de BMR :

- les patients de service réanimation
- les patients ayant long séjourné hospitalière
- Les patients, présentant une maladie chronique avec un motif d'hospitalisation antibiothérapie ou chimiothérapie.

Suite à un protocole de l'hygiène hospitalier par le Centre National de Référence (CNR) des résistances aux antibiotiques du l'Hôpital Kremlin Bicêtre (Le Kremlin Bicêtre, France) et la standardisation de réseau Algérien de surveillance de la résistance aux antibiotique nous avons sélectionné les étapes suivantes :

3.2.1 Etapes de la préparation de milieu Driglaski

-A partir d'un milieu déshydraté DRIGLASKI LACTOSE AGAR lot 102412201 lab Lioflichem bacterilgy products ; on a confirmé que la qualité de milieu ne présente aucun aspect non habituel (changement de couleur et de texture par exemple).

-La première étape était la dissolution, peser 53.0g de la poudre et la reconstituer dans un 1 litre d'eau distillée.

-Chauffer jusqu'à la dissolution total avec agitation lente et régulière pour répartir les composant dans la gélose de façon homogène.

- Répartir la gélose dans des flacons de 200 ml.

-Autoclaver à 115°C pendant 20 minutes.

3.2.2 Les antibiotiques utilisées

3.2.2.1. Disques des antibiotiques pour antibiogramme cartouche : Bio-Rad

Tableau 03 : Disques des antibiotiques pour antibiogramme.

Antibiotique	Charge de disque	Symbole
Amoxicillin+A.Clavulanic	20 + 10 µg	AMC
Cefotaxime	30 µg	CTX
Ceftazidime	30 µg	CAZ
Amikacin	30 µg	AN
Ertapenem	10 µg	EME
Erythromycine	15 µg	ET
Ciprofloxacine	5 µg	CIP
Gentamicin	10 µg	GN

3.2.2.2 Antibiotiques en poudre pour préparation injectable (tab. 4)

Tableau 04 : Antibiotiques en poudre pour préparation injectable.

Antibiotique (DCI)	La dose (g)	La marque
Ceftazidime	1	Ceftazin laboratoire Unimed
<i>Céfotaxime</i>	1	Ceftax laboratoire Sunpharma
Ertapénéme	1	Ertapénéme laboratoire Anvanz

3.2.3. Préparation de milieu de culture synthétique : sélectif pour l'isolement des BMR et BHR

3.2.3.1. Préparation de gélose DRIGLASKI + CEFTAZIDINE (GRIG+CAZ) : à la recherche des BMR

-Dissoudre la poudre d'un flacon de 1 gramme de la CAZ dans 2.5ml d'eau distillée afin d'avoir une solution mère A

-Une dilution en série de la solution mère A est ensuite effectuée pour atteindre une concentration finale A2.

-On ajoute 2 ml de la solution A2 diluée avec 200ml de gélose DRIGLASKI en surfusion. Après agitation rigoureuse, on coule le milieu dans des boîtes de Pétri de 8.5cm qui seront conservées à 4°C jusqu'à l'utilisation.

N.B :

Toutes les étapes de la préparation effectuent dans des conditions aseptiques.

Mesure et ajustement de pH de milieu complète DRIG+ antibiotique à la fin de chaque préparation à l'aide d'un pH-mètre et à température ambiante.

Nous avons remarqué qu'après deux mois de conservation des boîtes à 4°C, l'antibiotique a pu maintenir son efficacité.

3.2.3.2. Préparation de la gélose DRIGLASKI + CEFOTAXIME (GRIG+CTX) : à la recherche des BMR et BHR

-Dissoudre la poudre d'un flacon de 1 gramme de CTX dans 10ml d'eau distillée afin d'avoir une solution mère B.

-Une dilution en série de la solution mère B est ensuite effectuée pour atteindre une concentration finale B2.

-On ajout 1 ml de la solution B2 dilué avec 200ml de gélose DRIGLASKI en surfusion.

- Après agitation rigoureuse, on coule le milieu dans des boîtes de Pétri de 8.5cm qui seront conservées à 4°C jusqu'à l'utilisation.

3.2.3.3 : Préparation de gélose DRIGLASKI + ZNSO4 à la recherche du métallogènes (GRIG+ZNSO4)

-Une solution aqueuse (solution C) ZNSO4 à une concentration de 7g/l a été préparée

-Une dilution en série de la solution mère C est ensuite effectuée pour atteindre une concentration finale C2.

-On ajout 1 ml de la solution C2 dilué avec 200ml de gélose DRIGLASKI en surfusion

-Après agitation rigoureuse, on coule le milieu dans des boîtes de Pétri de 8.5cm qui seront conservées à 4°C jusqu'à l'utilisation.

N.B :

Après la préparation des milieux de culture (DRIGLASKI + antibiotique) ; pour vérifier l'activité de l'antibiotique dans le milieu , une étape de contrôle de qualité de milieu est effectuée à l'aide d'une souche *Escherichia coli* ATCC 25922 sensible à tous les antibiotiques comme un contrôle négative et une autre souche BMR (déjà connue) comme une contrôle positive .



Figure 04 : Bactérie de la flore intestinale sur le milieu DRIGLASKI sans antibiotique



Figure 05 : Une souche BMR sur le milieu synthétisé DRIGLASKI + antibiotique (contrôle positive)



Figure 06 : Une souche ATCC *Escherichia coli* sur le milieu Synthétisé DRIGLASKI + antibiotique (contrôle négative)

3.3 : les prélèvements

Les prélèvements de dépistage sont réalisés au niveau :

- la muqueuse nasale pour la recherche des SARM
- la muqueuse rectale pour la recherche des BLSE et autres BMR

3.3.1 Service concerné par le dépistage

Notre travail est réalisé à l'établissement public hospitalier Bachir Ben Nacer Biskra ; le choix de service et de patients à prélever est fondamental car il va limiter notre recherche des souches BMR.

3.3.2 Mode opératoire de prélèvements bactériologiques à la recherche des BMR :

Les prélèvements (tab. 5) sont effectués par la technique d'écouvillonnage en fonction de la BMR recherchée :

Tableau 05 : Techniques de prélèvement selon les BMR rechercher

Bactérie recherché	Site	Observation
MRSA <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline	Fosses nasales : 1 écouvillon pour les 2 narines	Bien faire rouler l'écouvillon humidifié au niveau des 2 narines
BLSE et autre BMR	Rectum : 1 écouvillon	Introduire l'écouvillon au niveau rectal –totalité de la partie humidifiée- effectué une rotation

- Placer les prélèvements dans un sac en plastique
- Remplir la fiche de renseignement de patient
- Les prélèvements est ensuite envoyé rapidement au laboratoire de microbiologie dans une glacière.

3.4. Culture et Isolement

-Un pré-enrichissement des écouvillons est souhaitable avec un bouillon BGT qui va permettre à notre souche de se régénérer avant la mise en culture.

-Les prélèvements rectaux sont ensemencés successivement sur les trois boites de gélose déjà préparé: DRIG+CAZ, Drig+CTX et Drig +ZnSO4 pour la recherche sélective des BMR, ensemencement effectué par la technique des cadrans.

-Les écouvillons de prélèvement nasal sont ensemencés sur la gélose Chapman pour la recherche des SARM, ensemencement effectué par la technique des cadrans.

- Les boites sont incubées à 37°C pendant 24h.
- Après 24 heures d'incubation, l'isolement des souches de :
 - Bacilles Gram négatifs résistantes à partir des prélèvements rectales.
 - Les staphylocoques à partir des prélèvements nasals.

3.5. Lecture des boîtes et identification

Après avoir une culture pure, l'identification nous permet de mettre en évidence des caractères cultureux et un ou plusieurs propriétés biochimiques de bactéries recherchées (BMR), elle repose sur les caractères suivants :

- La recherche d'enzyme coagulase pour les MRSA (prélèvements nasal)
- Identification des Bacilles Gram négatifs par les tests suivant : TSI ; test oxydase ; Galerie API20E, Galerie 10S (prélèvements rectales)

3.5.1 Examen macroscopique des caractères cultureux

L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé (tab. 6).

Tableau 06 : Caractères macroscopique des souches sur les milieux de cultures

Driglaski + antibiotique	Chapman
<ul style="list-style-type: none"> - Colonies jaunes : Utilisation du lactose par les bactéries, lactose + - Colonies bleues ou vertes : Absence d'utilisation du lactose par les bactéries, lactose - 	<ul style="list-style-type: none"> - Les colonies jaunes correspondent à des <i>Staphylococcus aureus</i> - Les colonies rouges correspondent à des <i>Staphylococcus epidermidis</i>

3.5.2 Test TSI (Triple Sugar Iron) (tab. 7)

C'est une gélose incliné semi-solide compose essentiellement de lactose, saccharose, glucose et de fer, il permet d'étudier la fermentation des sucres, d'apprécier la production ou non de H₂S et de noter la production ou non de gaz.

Tableau 07 : Technique et lecture de test TSI

Test	Technique	Interprétation
TSI	Ensemencement par piqûre centrale jusqu'à la base du tube puis par stries sur la pente, la lecture se fait après 24 heures d'incubation à 37°C.	<ul style="list-style-type: none"> - Virage de couleur de milieu au jaune s'il y a fermentation des sucres - Noircissement due à la production de H₂S - Formation des bulles de gaz due au dégagement de gaz

3.5.3 Disque pour test d'oxydase

Les disques oxydase sont utilisés pour détecter la présence de l'enzyme oxydase afin d'éliminer la famille des *Enterobacteriaceae*, qui donnent des réactions négatives.

Le test est réalisé de façon très simple avec des disques prêts à l'emploi et l'imbiber avec de l'eau physiologique stérile. Prélever une partie de colonie à étudier et l'étaler sur le disque d'oxydase à l'aide d'une pipette Pasteur (ne pas utiliser la matière de métal). La réaction est observée dans les 5-10 secondes à 25-30 ° C. une coloration violet foncé apparaît immédiatement sur le disque : test oxydase + (Camille et Tec., 2007).

3.5.4 Test de coagulase (pour les staphylocoques)

La coagulase est un enzyme produit par l'espèce *Staphylococcus aureus* lie au fibrinogène plasmatique, provoquant la coagulation du plasma.

Le test consiste à incuber un mélange de plasma oxalaté de lapin et de la souche suspectée à tester pendant 24 heures à 37°C.

Observation de test coagulase (tab. 8)

Tableau 08 : Lecture de test coagualse

Observations	Lecture de test coagulase	Espèce type
Coagulation du plasma avec prise en masse totale après ½ heures et moins de 24heurs d'incubation	Coagualse +	<i>Staphylococcus aureus</i>
Pas de coagulation	Coagualse -	Autres espèces de staphylocoques

N.B : Vu le manque de plasma oxalaté de lapin, on a remplacé avec un plasma citraté humain dont le taux de prothrombine (facteur de coagulation) est de 100%

3.5.5 Galerie API20E

-La galerie API20E (Biomérieux) est un système pour l'identification en utilisant une version miniaturisée et standardisée des 20 tests biochimiques conventionnels pour les entérobactéries et autres bactéries à Gram négatif.

-Il comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée, pour analyser le métabolisme d'une colonie bactérienne à identifier, ces microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux.

- Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs.

-Les résultats obtenus sont ensuite reportés sur une fiche d'identification, permettant d'obtenir un code propre à la souche étudiée, et l'identification se fait par consultation du catalogue de références fourni par Biomérieux ou par logiciel de l'informatique (la base de donné) (Guy et Jean., 2006).

3.4 Etude de mécanisme de résistance

3.4.1 Antibiogramme

-L'antibiogramme est une technique de laboratoire de microbiologie visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques.

Il donnera donc des indications sur l'efficacité in vitro de ces antibiotiques.

-Pour réaliser l'antibiogramme par la méthode des disques, la culture bactérienne est effectuée à la surface d'une gélose de Mueller Hinton, des disques pré-imprégnés d'une dose connue d'antibiotique sont déposés à la surface de la gélose.

-L'antibiotique diffuse à partir du disque en créant un gradient de concentration à partir le quel, on détermine le diamètre de la zone d'inhibition qui nous donne une estimation de la concentration minimale inhibitrice.

-Les caractères de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne est défini à partir d'un tableau de référence publié par la standardisation de ministère de la santé (Francois, 2011).

• La technique (Guy et Jean. , 2006)

- Couler 25ml de la gélose MH dans une boîte Pétri de 90cm de diamètre.
- Préparation de la suspension à partir d'une culture pure et diluer les colonies suspectés : 1/100 dans 10 ml de l'eau physiologique
- Agitation de la suspension bactérienne au vortex pour assurer son homogénéisation
- Ensemencer la suspension par écouvillonnage ; tremper l'écouvillon dans la suspension et l'essorer sur les bords, ensemencer la boîte en frottant délicatement l'écouvillon sur la gélose
- Placer les disques d'antibiotiques à l'aide d'une pince stérile
- Laisser les boîtes 20 minutes à température ambiante pour permettre une pré-diffusion de l'antibiotique, puis les incuber pendant 18-24 heures à 37°C.

N.B

• On choisit les disques des antibiotiques en fonction des spectres d'activité (voir annexe) plusieurs antibiotiques seront nécessaire pour identifier un BMR et un BHR ; selon les recommandations de CNR et la standardisation on peut trouver :

✚ Antibiogramme standard (liste 1)

▪ Antibiotiques nécessaires qui orientent le schéma thérapeutique, dépend de type d'infection et de la prévalence de la résistance acquise

✚ Tests complémentaires (liste 2)

▪ Dont l'intérêt est épidémiologique, adapté pour identifier les BMR et les BHR et le mécanisme de résistance

• Lecture et interprétation :

-Une souche sensible est une souche qui peut être atteinte par traitement à dose habituelle par voie générale

-Une souche intermédiaire est une souche qui peut être atteinte par un traitement local par augmentation des doses par voie générale

-Une souche résistante est une souche qui ne réagira probablement pas quel que soit la dose et le type de traitement (Avril et *al.*, 2000).

3.4.2 Test complémentaire pour la détection des BMR et BHR**3.4.2.1 Méthodes indirectes****❖ La recherche de synergie entre deux antibiotiques**

La démonstration phénotypique de la présence de β -lactamase à spectre élargie consiste à mettre en évidence une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de β -lactamase (l'acide clavulanique) et un disque de céphalosporine de 3^{ème} génération (Drieux et *al.*, 2008).

- Technique

Sur une gélose Mueller Hinton, ensemencée par la souche suspecté d'un BMR, un disque de ceftazidime (CAZ) et/ ou de céfotaxime (CTX) et un disque de AMC +, distant 1,5cm. Incuber pendant 18 heures à 37°C.

- Lecture

La présence d'une BLSE est confirmée lors d'une sensibilité diminuée à la C3G, associée à une zone d'inhibition élargie vers le disque contenant l'acide clavulanique. Ce phénomène met en évidence une synergie entre la C3G et l'inhibiteur de β -lactamase avec un profil dit en « bouchon de champagne » (Tzelepi et *al.*, 2000).

Tableau 09 : Lecture des souches BLSE sur antibiogramme

Phénotype observé	Mécanisme inféré	Phénotype prédit
AMC R CTX R Synergie AC+CTX	BLSE	R à tous les bêtalactamines sauf céphème et carbapénème

❖ **Test double disque pour la confirmation de BLSE**

Technique :

-Par la méthode de diffusion en gélose ; ensemencer les souches suspecté et on base dans la technique sur la présence et l'absence de l'acide clavulanique (inhibiteur de bêtalactamase)

-Déposer un disque d'AMC et un disque de C3G à une distance de 30mm (centre centre)

-Laisser diffuser les antibiotiques pendant une heure à la température ambiante

-Après une heure d'incubation ôter le disque d'AMC et le remplacer par un disque de CTX

-Incubé la boîte à 37°C pendant 24h

N.B

En cas de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* on utilise le disque de ticarcilline + acide clavulanique TCC avec un C3G.

Lecture :

-Le test est positive si le diamètre d'inhibition autour de C3G appliqué après diffusion de disque AMC est supérieur ou est égale à 5 mm par rapport au diamètre d'inhibition autour du disque de C3G . (Harada et *al.*, 2008)

❖ E. test

Il s'agit d'une bandelette d'antibiotique en gradient qui permet de déterminer de façon précise la CMI.

La technique :

-à partir d'une suspension bactérienne des souches suspectées, préparé de même façon de l'antibiogramme, déposé la bandelette sur une gélose écouvillonnée, dont l'extrémité contient un antibiotique avec un gradient de concentration précis. (Jolyguillou, 2006)

La lecture :

Après incubation, la CMI correspondra à la valeur lue au niveau de l'intersection entre la zone d'inhibition et la bandelette.

3.4.2.2. Méthodes directes, le test CIM : (carbapenem inactivation method) :

La détection des EPC par des tests phénotypiques n'est pas aisé car le niveau de résistance aux carbapénèmes est variable et peut parfois être à la limite du seuil de sensibilité. L'ertapénème est le carbapénème offrant la meilleure sensibilité pour la détection des EPC. Ainsi, d'après les recommandations de la standardisation, toute souche présentant une diminution de sensibilité à l'ertapénème (CMI > 0,5 mg/L ou un diamètre d'inhibition < 25mm; disque de 10 µg) par test de diffusion en gélose, est à considérer comme suspecte d'EPC et dérivés. Les entérobactéries productrices de carbapénémases : Les espèces les plus fréquemment concernées sont : *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* et *Citrobacter freundii*.

Technique :

Le principe de ce test repose sur l'hydrolyse du méropénème contenu dans un disque chargé à 10 µg (Van et al., 2015).

Après mise en contact pendant 2h avec la souche à tester, le disque est testé sur une souche d *E. coli* sensible ATCC 29522.

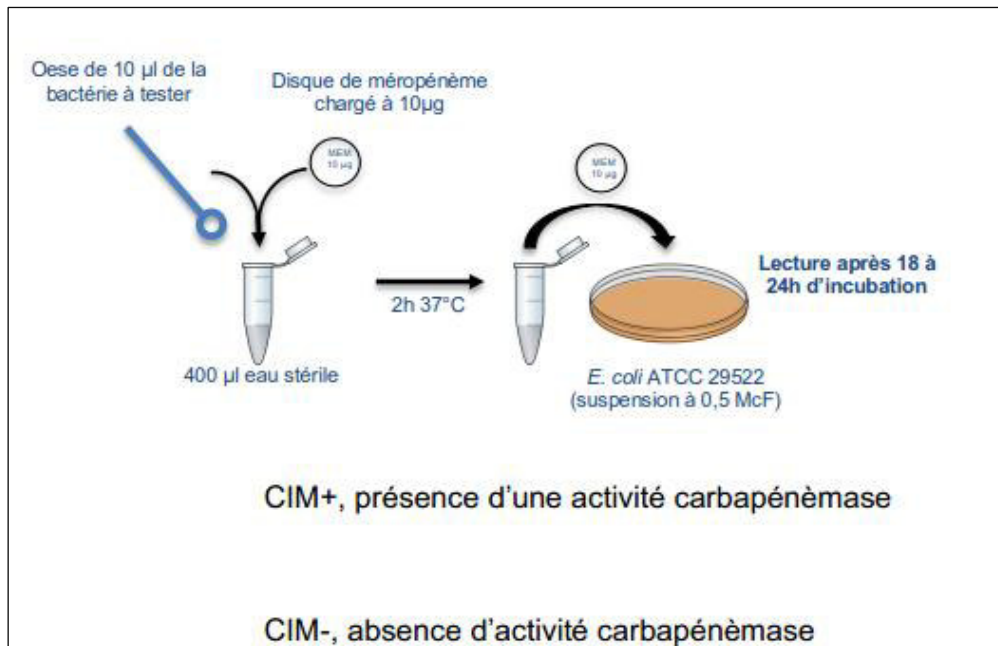


Figure 07 : Protocole de la détection des carbapénimases par le test CIM méthode d'inhibition de carbapénimase.

Lecture de test

Si la souche produit une carbapénèmase, le méropénème est hydrolysé et la souche de *E. coli* ATCC pousse au contact du disque on dit alors test CIM positive.

A l'inverse, si la souche ne produit pas de carbapénèmase, le méropénème reste actif et une zone d'inhibition est visible on dit alors le test CIM est négative. (Gauthier et al., 2017)

3.4.2.3. La recherche des MRSA typique à partir d'un antibiogramme :

Selon Scheffers, D. et Pinho, M la présence des MRSA due à un caractère phénotypique sur l'antibiogramme dont la CMI de céfoxitine FOX est supérieure à 8mg/l et la zone d'inhibition est inférieur ou égale 21mm (disque de charge de 30 µg) et la présence de pénicillinase + PLP 2a issue de gène *mecA*. (Scheffers et Pinho., 2005)

3.5 Conservation des souches

Les souches ont été conservées à 4°C dans des géloses de conservation avec un disque d'inhibiteurs de bêtalactamase afin de gardé l'activité de l'enzyme.

Cette étude a été réalisée pendant 3 mois à l'établissement public hospitalier Bachir Ben Nacer Biskra à la recherche de portage des bactéries multirésistantes (BMR) :

- MRSA *Staphylococcus aureus* résistant à la pénicilline
- EBLSE entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu
- BHR bactérie hautement résistantes
- BHRe Les bactéries hautement résistantes émergentes

Selon les recommandations de centre nationale de référence (CNR) ainsi que la littérature scientifique de réseau Algérien de surveillance de la résistance aux antibiotique (standardisation), il est a rappelé que les souches BHRe doivent êtres:

1. Des bactéries commensales du tube digestif
2. Présente un résistante à de nombreux antibiotiques
3. Avec des mécanismes de résistance aux antibiotiques transférables entre bactéries
4. Emergente selon l'épidémiologie connue c'est-à-dire n'ayant diffusé que sous un mode sporadique ou un mode épidémique limité. (Magiorakos et *al.*, 2012)

On considèrera alors comme BHRe,

- Parmi les bacilles à Gram négatif : Entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC),
- Parmi les cocci à Gram positif : *E. faecium* résistant aux glycopeptides (ERG)

4.1 Les prélèvements

Durant cette étude, 25 patients étaient prélevé :

- Un prélèvement nasales à la recherche de portage des MRSA, GISA et VISA
- Autre prélèvement rectales à la recherche des EBLSE+ et EPC

Les différentes souches bactériennes isolées pour chaque patient sont présentées dans le tableau 10.

Tableau 10 : Souches bactériennes isolées à partir des patients (25) à l'établissement public hospitalier Bachir Ben Nacer Biskra

Patients et service	Natures de prélèvement	Souche isolé *
X1 sénologie	Prélèvement nasal	<i>Staphylococcus épidermidus</i>
	Prélèvement rectale	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>
X2 réanimation	Prélèvement nasal	<i>Staphylococcus épidermidus</i>
	Prélèvement rectale	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>
X3 réanimation	Prélèvement nasal	<i>Staphylococcus épidermidus</i>
	Prélèvement rectale	A BMR/BHR
X4 réanimation	Prélèvement nasal	<i>Staphylococcus épidermidus</i>
	Prélèvement rectale	A BMR/BHR
X5 réanimation	Prélèvement nasal	<i>Staphylococcus épidermidus</i>
	Prélèvement rectale	A BMR/BHR
X6 réanimation	Prélèvement nasal	<i>Staphylococcus épidermidus</i>
	Prélèvement rectale	A BMR/BHR
X7 réanimation	Prélèvement nasal	<i>Staphylococcus épidermidus</i>
	Prélèvement rectale	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella Pneumoniae</i>
X8 réanimation	Prélèvement nasal	<i>Staphylococcus épidermidus</i>
	Prélèvement rectale	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>
X9 réanimation	Prélèvement nasal	SAMS
	Prélèvement rectale	A BMR/BHR
X10 réanimation	Prélèvement nasal	<i>Staphylococcus épidermidus</i>
	Prélèvement rectale	A BMR/BHR
X11 réanimation	Prélèvement nasal	<i>Staphylococcus épidermidus</i>
	Prélèvement rectale	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella Pneumoniae</i>
X12 réanimation	Prélèvement nasal	<i>Staphylococcus épidermidus</i>
	Prélèvement rectale	<i>Escherichia coli</i>
X13 orthopédie	Prélèvement nasal	<i>Staphylococcus épidermidus</i>
	Prélèvement rectale	A BMR/BHR
X14 chirurgie	Prélèvement nasal	<i>Staphylococcus épidermidus</i>

	Prélèvement rectale	<i>Escherichia coli</i>
X15 chirurgie	Prélèvement nasal	<i>Staphylococcus épidermidus</i>
	Prélèvement rectale	<i>Escherichia coli</i>
X16 sénologie	Prélèvement nasal	<i>Staphylococcus épidermidus</i>
	Prélèvement rectale	A BMR/BHR
X17 réanimation	Prélèvement nasal	<i>Staphylococcus épidermidus</i>
	Prélèvement rectale	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>
X18 réanimation	Prélèvement nasal	<i>Staphylococcus épidermidus</i>
	Prélèvement rectale	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>
X19 sénologie	Prélèvement nasal	<i>Staphylococcus épidermidus</i>
	Prélèvement rectale	<i>Morgonella Morganii</i>
X20 sénologie	Prélèvement nasal	SAMS
	Prélèvement rectale	<i>Escherichia coli</i>
X21 sénologie	Prélèvement nasal	SAMS
	Prélèvement rectale	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
X22 sénologie	Prélèvement nasal	<i>Staphylococcus épidermidus</i>
	Prélèvement rectale	A BMR/BHR
X23 réanimation	Prélèvement nasal	<i>Staphylococcus épidermidus</i>
	Prélèvement rectale	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>
X24 réanimation	Prélèvement nasal	<i>Staphylococcus épidermidus</i>
	Prélèvement rectale	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
X25 réanimation	Prélèvement nasal	<i>Staphylococcus épidermidus</i>
	Prélèvement rectale	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Nombre totale des souches isolées	44 souches	

- SAMS *Staphylococcus aureus* sensible à la méthécilline
- A BMR/BHR absence de BMR et de BHR
- *. Toutes les souches de *Staphylococcus épidermidus* isolées à partir du prélèvement nasal sont des souches sauvages qui peuvent acquérir dans le temps des résistances.

D'après le tableau 10, on remarque qu'il y a des variations dans le nombre des souches isolées en fonction de service hospitalier et la nature de prélèvement. Voir la Figure 08.

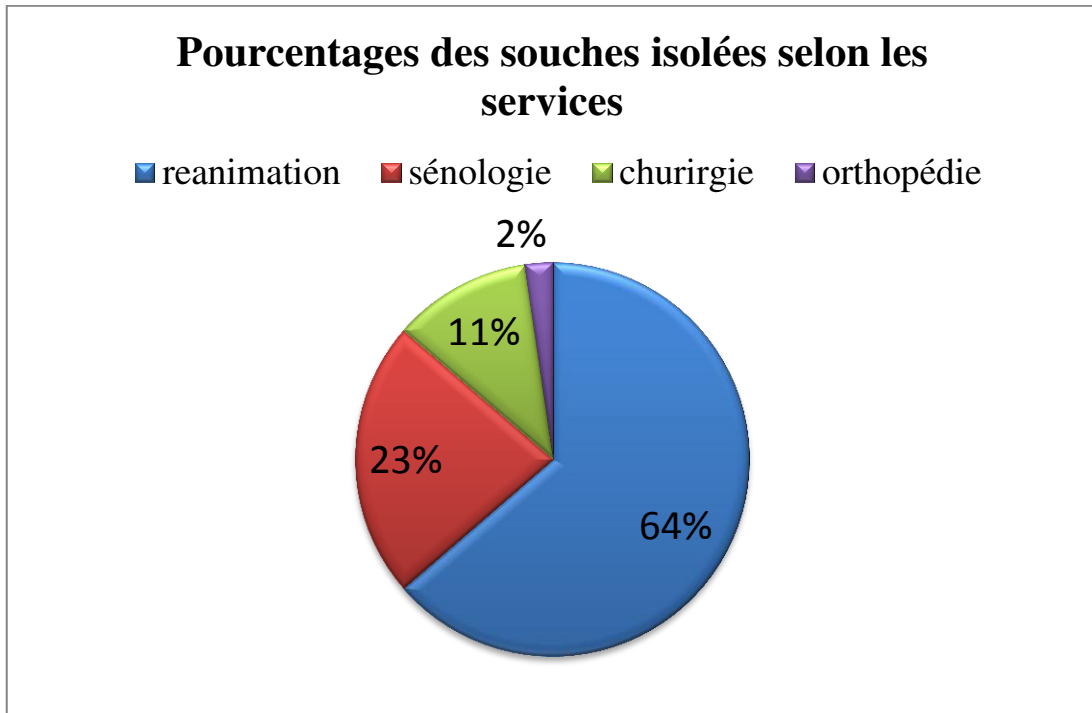


Figure 08 : Pourcentages des souches isolées selon les services de l'établissement public hospitalier Bachir Ben Nacer Biskra

4.2 Identification des BMR et BHR isolées

L'identification des BMR et BHR présentés dans ces prélèvements est effectuée sur la base de plusieurs caractères ; culturels, biochimiques et phénotypiques.

- **Caractères cultureux**



Figure 09 : 1 Aspect macroscopique de culture d'*Escherichia coli* sur gélose DRIGLASKI+ CAZ
 2 Aspect macroscopique de culture de *Pseudomonas aeruginosa* sur DRIGLASKI+ CTX
 3 Aspect macroscopique de culture de *Staphylococcus aureus* sur gélose Chapman

- **Galerie biochimique d'identification**

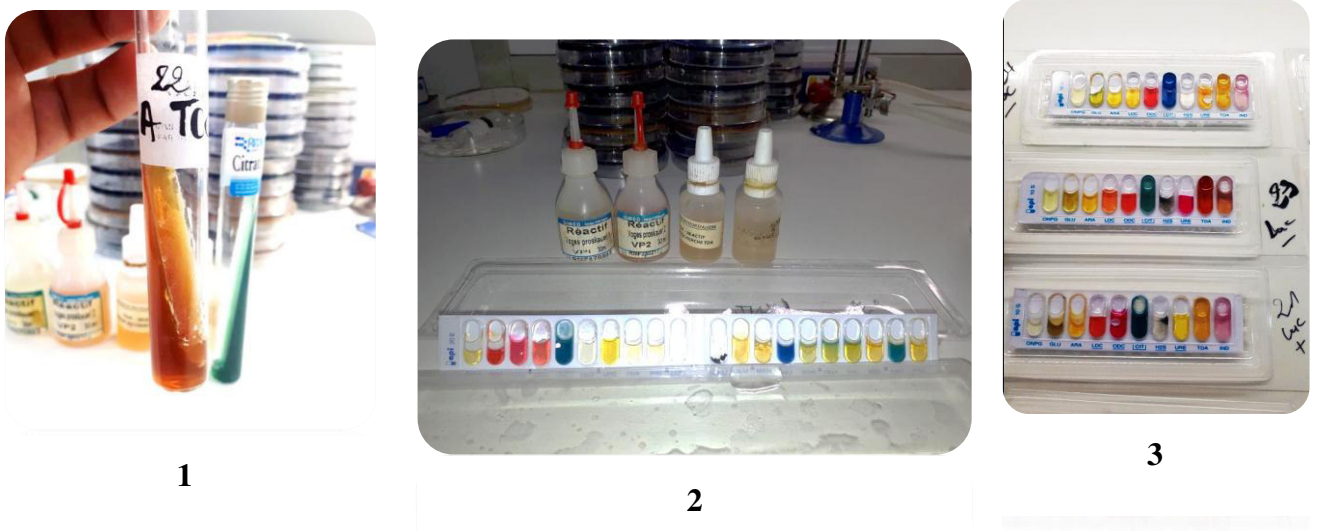


Figure 10 : 1 Test TSI d'une souche ATCC *Escherichia coli*
 2 Galerie API 20 E, réalisée à partir d'une suspension de souche bactérienne
 3 Galerie API10S, réalisée à partir d'une suspension de souche bactérienne

- **Autres tests d'identification :**



1



2

Figure 11 : 1 Test coagulase à la recherche de *Staphylococcus aureus*

2 Test oxydase sur disques pour confirmer le caractère oxydatif de *Pseudomonas aeruginosa*

4.3 Etude de profil des antibiogrammes

Les profils des antibiogrammes des souches isolées sont représentés dans le tableau 11.

Ils sont déterminés selon les valeurs critiques décrites par la standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale (le réseau Algérien de surveillance de la résistance aux antibiotiques)

Tableau 11 : Résultat de profil des antibiogrammes des souches isolées.

Patients/service	AMC	CTX	CAZ	MEM	AK	ET	CIP	BMR/BHR
X1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	13mm R	9mm R	<6mm R	30mm S	14mm R	28mm S	20mm I	BLSE+
X3 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	13mm R	<6mm R	<6mm R	25mm S	16mm I	24mm S	15mm R	BLSE+
X7 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	8mm R	10mm R	<6mm R	28mm S	15mm I	20mm I	13mm R	E.BLSE+
X7 <i>Escherichia coli</i>	7mm R	<6mm R	<6mm R	12mm R	11mm R	<6mm R	<6mm R	BLSE+ BHR+

X8 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	11mm R	6mm R	6mm R	14mm R	11mm R	08mm R	<6mm R	BLSE +
X11 <i>Escherichia coli</i>	10mm R	<6mm R	<6mm R	30mm S	17mm S	22mm S	12mm R	BLSE+
X11 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<6mm R	13mm R	<6mm R	25mm S	16mm I	20mm I	22mm S	BLSE+
X12 <i>Escherichia coli</i>	<6mm R	14mm R	10mm R	> 30mm S	21mm S	28mm S	30mm S	BLSE+
X14 <i>Escherichia coli</i>	12mm R	<6mm R	<6mm R	23mm S	16mm I	17mm R	<6mm R	BLSE+
X14 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	12mm R	<6mm R	7mm R	26mm S	28mm S	19mm I	21mm S	BLSE+
X15 <i>Escherichia coli</i>	<6mm R	<6mm R	<6mm R	22mm I	17mm S	18mm R	10mm R	BLSE+
X17 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	10mm R	08mm R	<6mm R	18mm R	12mm R	13mm R	18mm I	BLSE+
X18 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	10mm R	<6mm R	<6mm R	15mm R	16mm I	12mm R	15mm R	BLSE+ BHR+
X19 <i>Morganella morganii</i>	12mm R	<6mm R	<6mm R	11mm R	12mm R	14mm R	17mm I	BLSE+
X20 <i>Escherichia coli</i>	11mm R	10mm R	<6mm R	25mm I	18mm S	18mm R	28mm S	BLSE+ BHR+
X21 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10mm R	07mm R	<6mm R	12mm R	12mm R	14mm R	15mm R	BLSE+ BHR+
X23 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	10mm R	11mm R	8mm R	7mm R	11mm R	12mm R	12mm R	BLSE+

<i>pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	BHR+
X24 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	07mm R	10mm R	<6mm R	09mm R	10mm R	11mm R	<6mm R	BLSE+ BHR+
X25 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11mm R	<6mm R	<6mm R	18mm R	12mm R	18mm R	11mm R	BLSE+ BHR+

- S : Souche sensible
- R : Souche résistante
- I : Souche a résistance intermédiaire

Selon le tableau on remarque que :

- Les 19 souches isolées présentent une résistance vis-à-vis la majorité des antibiotiques testés.

- Les entérobactéries productrices de BLSE sont fréquemment résistantes au cotrimoxazole, aux quinolones et aux aminosides.

4.3.1 Tests d'identifications phénotypiques des souches isolées

Tous les examens d'identification phénotypique effectués sont basés sur la méthode de diffusion en gélose.

4.3.1.1 La détection des BLSE

Les BLSE désignent des bêta-lactamase produite par les entérobactéries entrainant une diminution de l'activité des céphalosporines de 3ème génération (CAZ,CTX) et des monobactames mais n'ayant aucune activités vis-à-vis des céphamycines ni des carbapénèmes (Imp).

D'après cette définition et les résultats de l'antibiogramme qui contient les diamètres des céphalosporines de 3ème génération (CAZ et CTX) dans tableau 11, tous les BMR isolées à partir du prélèvement rectal sont des BLSE. Cette résistance est due à un mécanisme enzymatique, peut être expliquée par la forte pression des céphalosporines de 3ème génération dans l'hôpital comme traitement symptomatique, et autres facteurs de risque qui favent la dissémination de ces souches.

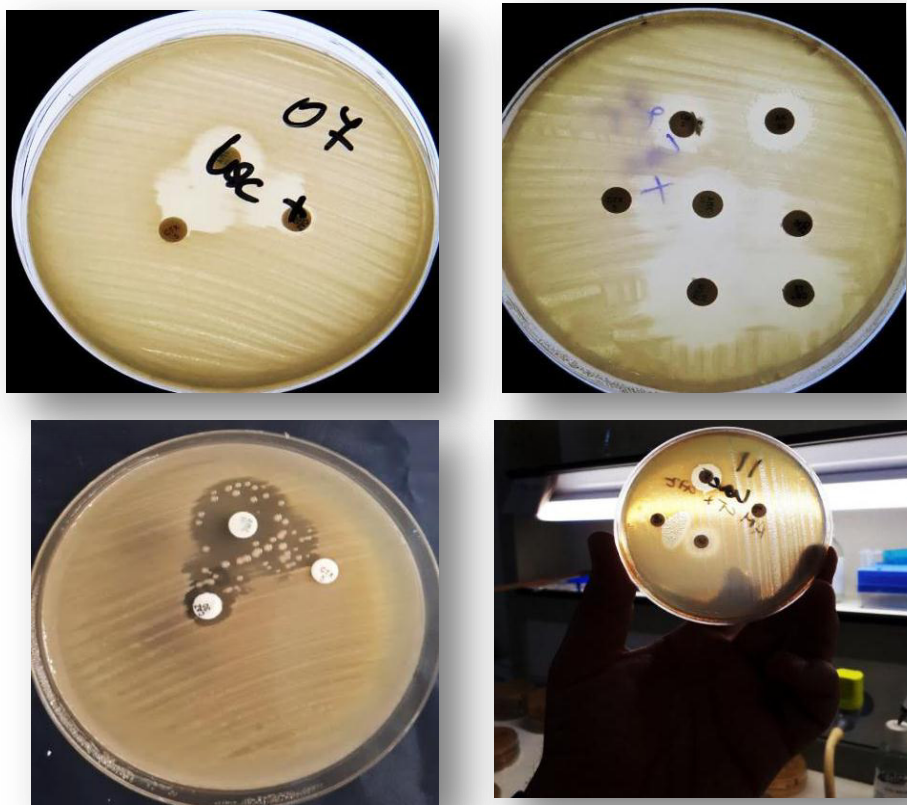


Figure 12 : Souches d'entérobactérie productrice de BLSE. Présence d'image de synergie entre AMC (inhibiteur de β -lactamase) et CTX, CAZ (C3G)

4.3.1.2 Le test double disque

Ce test devra être fait systématiquement devant :

- Les souches qui présentent l'absence de l'image de synergie avec diminution de diamètre de C3G

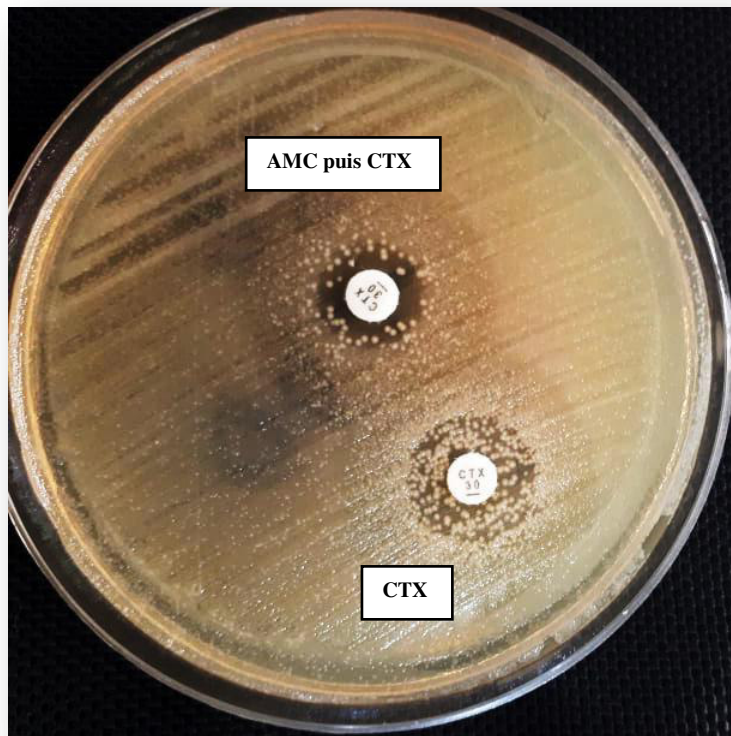


Figure 13 : Test double disque positive.

4.3.1.3 Détection des BHR : La recherche des EPC par le test CIM :

D'après Grall N et al. la résistance à l'ertapénème due à une perte de porine chez des souches de EPC entérobactéries productrices de carbapénémases (**Grall et al., 2011**). Le test a été effectué chez tous souches suspecté d'un BHR qui présente diminution de sensibilité à l'ertapénème.

La figure 14 donne un exemple de test CIM positif des BHR isolées chez des patients admis aux de service réanimation à établissement public hospitalier Bachir Ben Nacer Biskra.

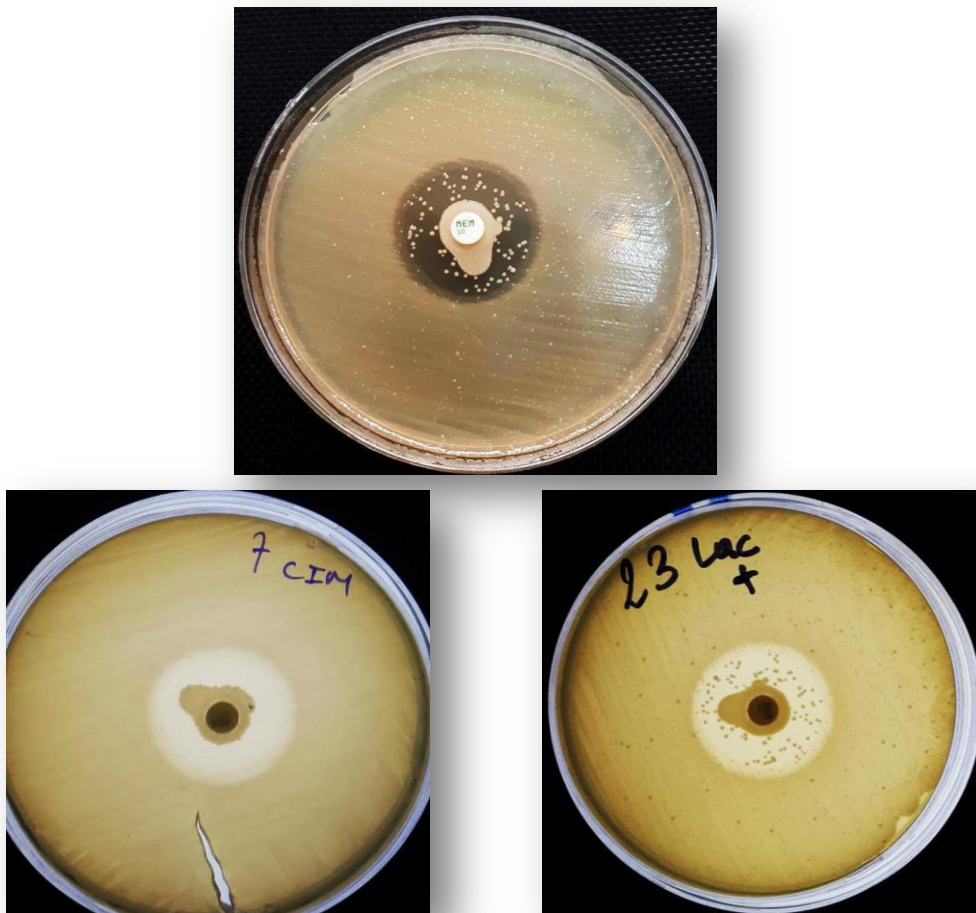


Figure 14 : Test CIM positive après la décharge de disque de l'ertapénème par le carbapénimase

- L'absence de la zone d'inhibition autour le disque de méropénème (MEM) due à la présence de carbapénimase. Le diamètre de méropénème était toujours intermédiaire (15-22 mm) , un test complémentaire Etest est souhaitable pour confirmation le mécanisme de résistance cette souche.

4.3.1.4 E.test

L'E-test est une technique permettant de donner une mesure précise de la concentration minimale inhibitrice d'un antibiotique (CMI).

D'après les résultats obtenus des ECP, le Etest permet de détecté les mécanismes de résistance de MEM des BHR isolées est dont la $CM I \geq 4\mu g/l$



Figure 15: Bandelette E.test pour détermination de CMI des souches BHR carbapénimase positive.

4.3.2 Répartition des BMR et BHR isolées selon le service

Les malades du service de la réanimation présentent le nombre le plus élevé des souches de BMR et BHR isolées par rapport aux autres services (Figure 16).

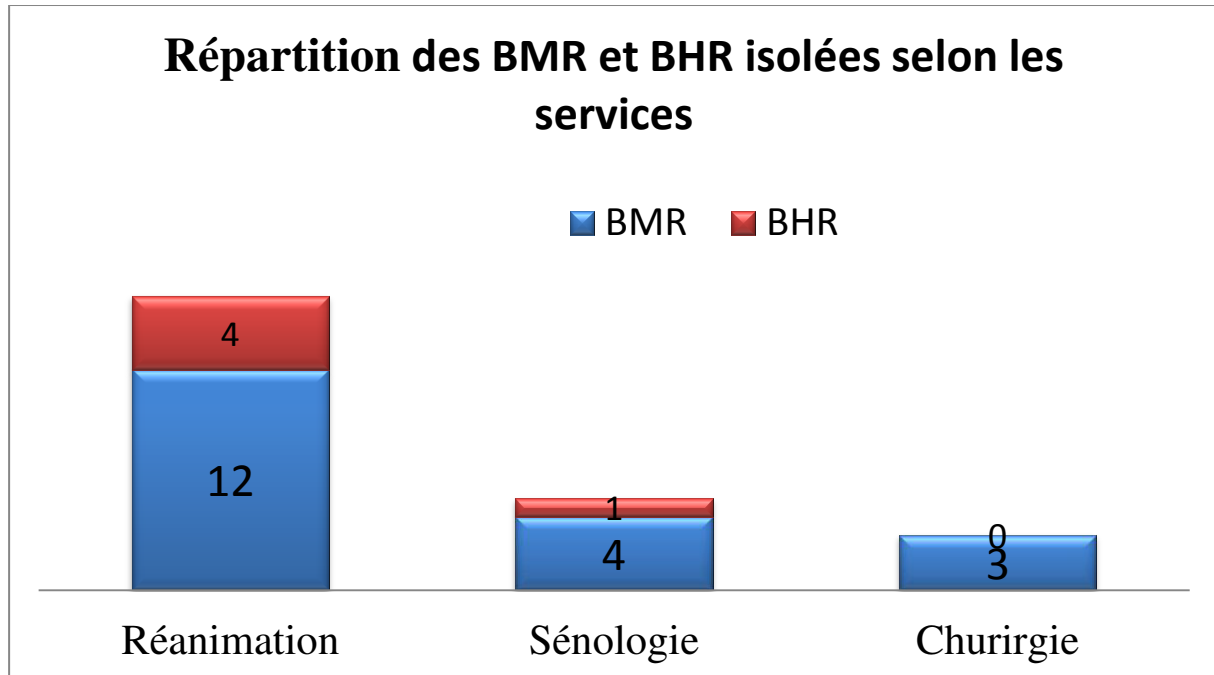


Figure 16 : Répartition (en nombre) des souches BMR et BHR isolées selon les services de l'établissement public hospitalier Bachir Ben Nacer Biskra

D'après la figure 16 les souches isolées de service réanimation composés essentiellement de de BLSE et autre BHR. Sur un total de 16 souches isolées de ce service, les bactéries ont été identifiées comme suivant :

- *E. coli*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Klebsiella pneumoniae*

Les pourcentages de chaque espèce sont présentés dans la figure 17.

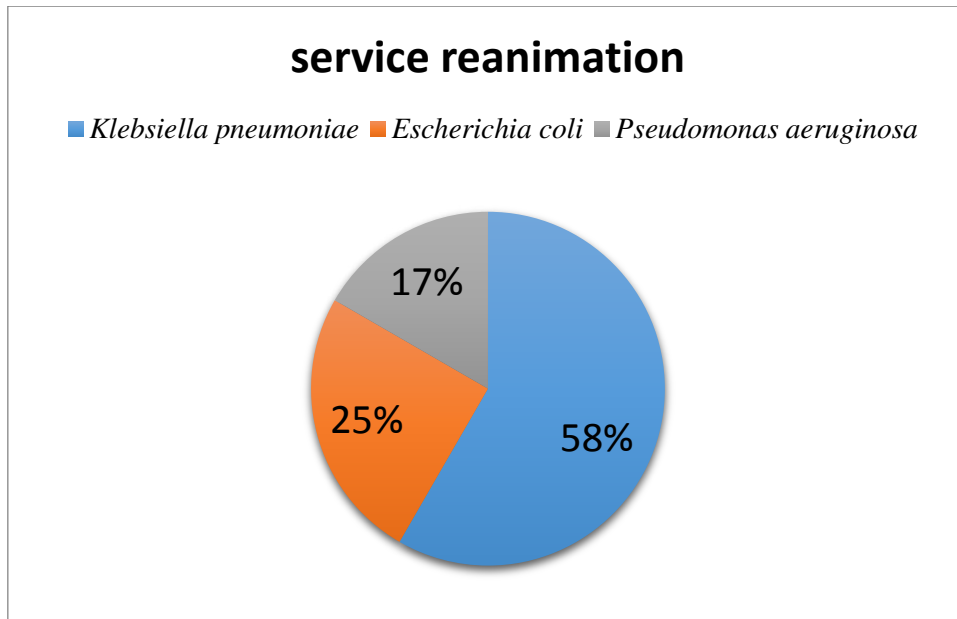


Figure 17 : Les pourcentages des espèces de BMR et BHR isolées au service réanimation dans l'établissement public hospitalier Bachir Ben Nacer Biskra

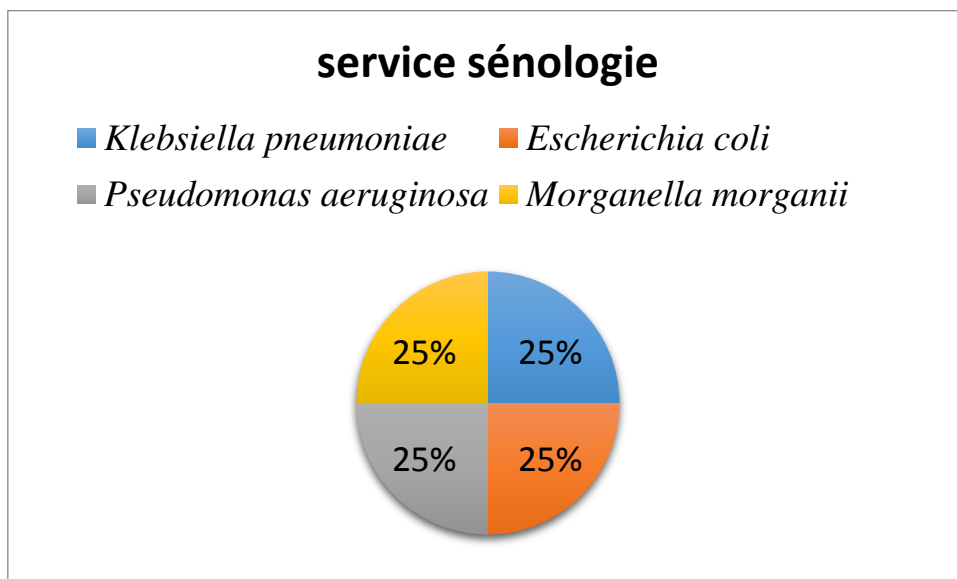


Figure 18 : Les pourcentages des espèces de BMR et BHR isolées au service sénologie dans l'établissement public hospitalier Bachir Ben Nacer, Biskra

Les patients de service réanimation sont traités par antibiothérapie au cours de leur séjour au service ce qui favorise l'apparition de mécanisme de résistance aux antibiotiques.

La fréquence le plus élevés des BMR et BHR isolées est au service de la réanimation car la transmission croisée dans l'acquisition des BMR endémiques hospitalières et en réanimation est très facile selon Tschudine et al (Tschudine et *al.*, 2012)

Harris et al ont évalué dans une cohorte prospective sur trois ans, selon des critères épidémiologiques et après analyse des souches bactériennes par électrophorèse en champs pulsé, que la transmission croisée d'*E. coli* BLSE était seulement responsable de 13 % des acquisitions de BMR (Harris et *al.*, 2007) alors la première cause d'acquisition de BMR en réanimation est donc a priori une acquisition endogène par sélection d'un mutant résistant liée à la forte pression des antibiotiques.

Alors ces résultats obtenues sont similaires et compatible avec l'étude de Harris et al (2007).

4.3.3 L'incidence de portage des BMR et BHR selon les facteurs de risques chez les patients étudiés:

Dans notre étude on a basé sur 2 principaux facteurs de risques :

- Antibiothérapie (prise d'antibiotique)
- Chimiothérapie

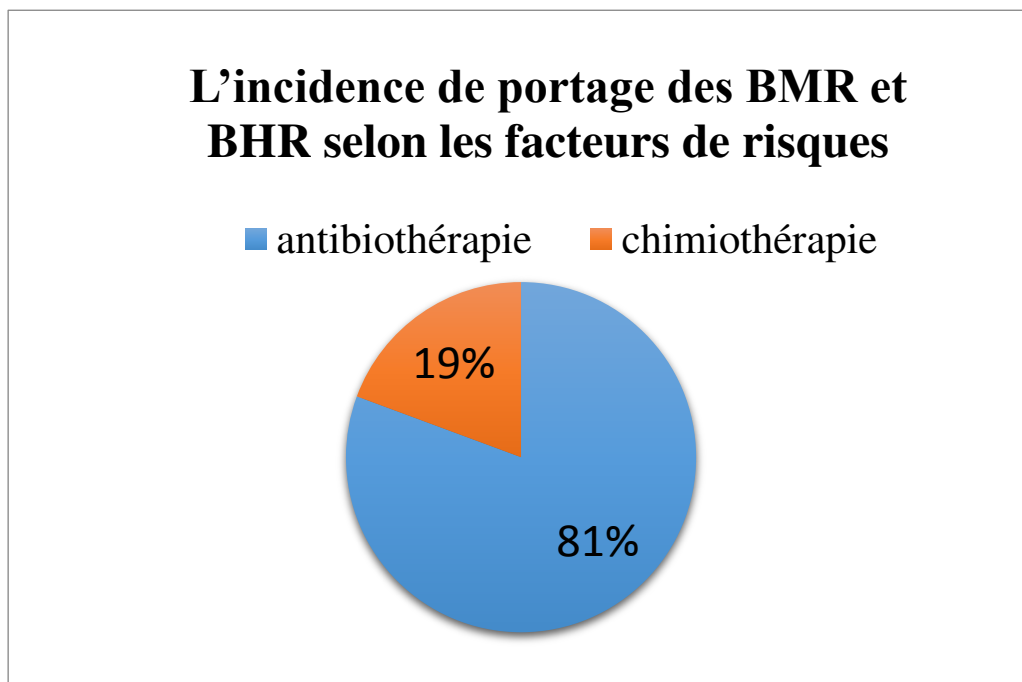


Figure 19 : L'incidence de portage des BMR et BHR selon les facteurs de risques

Selon Lepelletiers et al les patients ayant des antécédents d'hospitalisation sont des patients ciblés pour le portage de BHR, alors les patients de service sénologie sont des cibles pour le portage vu des antécédents d'hospitalisation à des établissements hospitaliers hors la Wilaya de Biskra (motif de Chimiothérapie).

En effet il apparaît un mécanisme de résistance induit par la chimiothérapie chez les patients de service sénologie, ceci favorise l'apparition de nouvelles résistances (Lepelletiers et al., 2013)

De plus, les bactéries résistantes sont aisément transmises d'un malade à l'autre par les mains des soignants (transmission croisée) avec parfois relais par l'environnement.

Alors les sujets contacts des patients deviennent porteurs de BHR et eux-mêmes devenus porteurs de BHR mais non détectés, on les appelle les porteurs sains qui ont pu être à l'origine de transmission croisée lors de leur réadmission dans un autre établissement de santé que celui de la transmission initiale.

En fin, l'analyse de ces pourcentages permettra de dire que l'antibiothérapie et l'automédication aux antibiotiques ainsi que les différences de pratique d'antibiothérapie sont des facteurs sélectifs favorisant la résistance.

C'est pour ces raisons il faut rapidement de trouver les moyens de lutte et de suivre les précautions et les recommandations.

Conclusion

L'analyse phénotypique des BMR et BHR isolées est en faveur d'une production de β -lactamase à spectre étendu (BLSE) avec une fréquence élevée au service réanimation alors que le phénotype carbapénimase est moins élevé. En ce qui concerne la présence des MRSA n'a pas été retrouvée dans notre série.

La maîtrise de la diffusion des bactéries multi- ou hautement résistantes (BMR ou BHR) aux antibiotiques repose sur une double précaution ou une stratégie universelle de réduction de la prescription des antibiotiques et de prévention de la diffusion à partir des patients porteurs.

Pour contrôler le risque de transmission croisée, il est capital d'identifier le réservoir ou le cible ce qui peut être mis en défaut. Puis des mesures dites « barrières » peuvent être associées pour lutter contre le risque de transmission croisée d'agent pathogène entre patients et soignants.

Les précautions standard sont les notions fondamentales de l'hygiène hospitalière et qui sont applicable par tout professionnel de santé lors de la prise en charge de tout patient, alors que autres stratégies plus spécifiques ou complémentaires des précautions standard, sont recommandées pour des patients présentant des maladies contagieuses et qui portent de BMR et BHR en situations sporadique ou épidémique.

Des précautions encore plus ciblées peuvent être proposées à des populations particulièrement à risque, les porteurs sains par BHR

La capacité de détection et d'identification des BMR et les BHR encore joue un rôle très important dans l'évaluation et la prolifération de ces souches. Elle repose essentiellement sur l'identification des malades porteurs BMR et BHR (les réservoirs ou les cibles), les techniques de prévention de la transmission (lavage des mains, politique de désinfection et d'élimination des déchets, antisepsie), mesures techniques dont l'application est favorisée par des décisions organisationnelles (séparation des malades porteurs et des malades indemnes).

Le laboratoire de l'hygiène hospitalier assure ces activités par un groupe des gens compétant. Kim et al ont récemment démontré dans une étude monocentrique son faible impact dans l'acquisition de BMR en cas de bonne application des précautions standard par le

suivie des techniques de surveillance du portage et d'identification phénotypique et génotypique, ceux-ci évaluent l'impact de l'acquisition exogène à 30 % des acquisitions de BMR dans leur unité de réanimation (Kim et *al.*, 2014)

Enfin, cette étude attire l'attention sur l'importance de pratique de laboratoire de l'hygiène hospitalier dans la recherche systématique de portage des BMR et BHR dans tous les établissements publics hospitaliers pour diminuer le risque d'apparition de ces souches .

Une étude épidémiologique adéquate dans les hôpitaux algériens en particulier dans le service de la réanimation afin de géré l'émergence et la dissémination des souches multirésistantes et hautement résistantes.

Références

- Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in microbiology*, 1, 134
- Avril, J. L., Dabernat, H., Denis, F., & Monteil, H. (2000). *Bactériologie clinique*. Ellipses Edition Marketing SA.
- Bambeke, V. F., Balzi, E. & Tulkens, P. M.f (2000). Antibiotic efflux pumps. *Biochemical Pharmacology* 60, 457 –70
- BANIK, Bimal K. (ed.). *Beta-Lactams: Novel Synthetic Pathways and Applications*. Springer, 2017. p291
- Bonomo, R. A. (2017). β -Lactamases: a focus on current challenges. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 7(1), a025239.
- Boutal, H. (2017). Développement et validation de tests de détection rapide de la résistance aux antibiotiques
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(3), 969-976.
- Bustany P, Chaumet R P-D, Philippe C. (1993). *Internat, nouveau programme Tome 17: Pharmacologie*.p67
- Calderon C. B. & Sabundayo B. P. (2007). Antimicrobial classifications: Drugs for bugs. In: Schwalbe R, Steele-Moore L & Goodwin AC (eds). *Antimicrobial susceptibility testing protocols*. CRC Press, Taylor and Frances group. ISBN 978-0 8247-4100-6.
- Camille D.Doc L. (2007) *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire*. p129
- Centre for Clinical Practice at NICE (UK. (2008). Respiratory tract infections- antibiotic prescribing: prescribing of antibiotics for self-limiting respiratory tract infections in adults and children in primary care.
- Drawz, S. M., & Bonomo, R. A. (2010). Three decades of β -lactamase inhibitors. *Clinical microbiology reviews*, 23(1), 160-201
- Drieux, L., Brossier, F., Sougakoff, W., & Jarlier, V. (2008). Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 90-103.7

- EYLER, Rachel F. et SHVETS, Kristina. Clinical Pharmacology of Antibiotics. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 2019, p. CJN. 08140718.
- Fernandes R, Amador P, Prudêncio C. (2013). β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Rev Med Microbiol* 24:7–17.
- Fernandes, R., Amador, P., & Prudêncio, C. (2013). β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Reviews in Medical Microbiology*, 24(1), 7-17
- Françoise P.(2011).Microbes, mi-démons. p 228
- Gauthier, L., Bonnin, R. A., Dortet, L., & Naas, T. (2017). Retrospective and prospective evaluation of the carbapenem inactivation method for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *PloS one*, 12(2), e0170769.
- Gilbert, B., Robbins, P., & Livornese, J. L. (2011). Use of antibacterial agents in renal failure. *The Medical clinics of North America*, 95(4), 677-702.
- Grall, N., Andremont, A., & Armand-Lefèvre, L. (2011). Résistance aux carbapénèmes: vers une nouvelle impasse?. *Journal des Anti-infectieux*, 13(2), 87-102.
- Guy L. Jean.(2010). Microbiologie technique: Tome 2, Documents techniques, 2ème édition.p145
- Harris, A. D., Kotetishvili, M., Shurland, S., Johnson, J. A., Morris, J. G., Nemoy, L. L., & Johnson, J. K. (2007). How important is patient-to-patient transmission in extended-spectrum β -lactamase Escherichia coli acquisition. *American journal of infection control*, 35(2), 97-101.
- Ho, P. L., Wong, R. C., Yip, K. S., Loke, S. L., Leung, M. S., Mak, G. C., ... & COMBAT Study Group. (2007). Antimicrobial resistance in Escherichia coli outpatient urinary isolates from women: emerging multidrug resistance phenotypes. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 59(4), 439-445.
- Hooper, D. C. (2002). Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *The Lancet infectious diseases*, 2(9), 530-538.
- Joly-Guillou, M. L. (2006). Intérêt du E-test dans le suivi de l'antibiothérapie. *Réanimation*, 15(3), 237-240.
- Kim, J., Lee, J. Y., Kim, S. I., Song, W., Kim, J. S., Jung, S., ... & Park, Y. J. (2014). Rates of fecal transmission of extended-spectrum β -lactamase-producing and

- carbapenem-resistant Enterobacteriaceae among patients in intensive care units in Korea. *Annals of laboratory medicine*, 34(1), 20-25.
- Léa C, François, Olivier L. 2001. Gènes de résistance aux antibiotiques et plantes transgéniques Letodé. p31
 - Leclercq, R. (2002). Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clinical Infectious Diseases*, 34(4), 482-492.
 - Leekha, S., Terrell, C. L., & Edson, R. S. (2011, February). General principles of antimicrobial therapy. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 86, No. 2, pp. 156-167). Elsevier.
 - Lepelletier, D., Lucet, J. C., Astagneau, P., Coignard, B., Vaux, S., Rabaud, C., ... & Berthelot, P. (2013). Résultats de l'enquête de la Société Française d'Hygiène Hospitalière sur la prise en charge des patients suspects ou porteurs de bactéries hautement résistantes aux antibiotiques. *Bulletin SF2H*, mars.
 - Leyral, G., & Joffin, J. N. (2001). Microbiologie technique: 2eme Édition. *Collection Biologie technique. Pédagogique d'Aquitaine*. p60
 - Li, X. Z., Elkins, C. A., & Zgurskaya, H. I. (Eds.). (2016). *Efflux-mediated antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, regulation and clinical implications*. p4
 - Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... & Paterson, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, 18(3), 268-281.
 - Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... & Paterson, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, 18(3), 268-281.
 - Nordmann, P., Gniadkowski, M., Giske, C. G., Poirel, L., Woodford, N., Miriagou, V., & on Carbapenemases, E. N. (2012). Identification and screening of

- carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(5), 432-438.
- Ola S. (2010). Antibiotics and Antibiotic Resistance.
 - Owens Jr, R. C., & Shorr, A. F. (2009). Rational dosing of antimicrobial agents: pharmacokinetic and pharmacodynamic strategies. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 66(12_Supplement_4), S23-S30.
 - Owens, R. C., & Lautenbach, E. (Eds.). (2007). *Antimicrobial resistance: problem pathogens and clinical countermeasures*. 169
 - Patrick B. (2007). Une histoire des microbes p. 196
 - Petri, W. A. (2011). Penicillins, cephalosporins, and other β -lactam antibiotics. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 12th ed. New York, NY: McGraw-Hill*, 1477-504.
 - Robert C. Owens, Ebbing L. (2007) Antimicrobial Resistance: Problem Pathogens and Clinical Countermeasures.p169
 - Scheffers, D. J., & Pinho, M. G. (2005). Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 69(4), 585-607
 - Serge B. (2017). Prévention des infections en milieu hospitalier.p187
 - Serge K. (2010). Guide de chimie médicale et médicaments.p636
 - Simonsen, G. S., Tapsall, J. W., Allegranzi, B., Talbot, E. A., & Lazzari, S. (2004). The antimicrobial resistance containment and surveillance approach-a public health tool. *Bulletin of the World Health Organization*, 82, 928-934.
 - Spellberg, B., Powers, J. H., Brass, E. P., Miller, L. G., & Edwards Jr, J. E. (2004). Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clinical infectious diseases*, 38(9), 1279-1286.
 - Talaro K. P. & Chess B. (2008). Foundations in microbiology. 8th Ed. McGraw Hill, New York.
 - Thomas L. Lemke, David A. Williams v.(2002). Fye's Principles of Medicinal Chemistry. p1052.
 - Tschudin-Sutter, S., Frei, R., Dangel, M., Strandén, A., & Widmer, A. F. (2012). Rate of transmission of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae without contact isolation. *Clinical infectious diseases*, 55(11), 1505-1511.
 - Tzelepi, E., Giakkoupi, P., Sofianou, D., Loukova, V., Kemeroglou, A., & Tsakris, A. (2000). Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases in Clinical Isolates of

Enterobacter cloacae and *Enterobacter aerogenes*. *Journal of clinical microbiology*, 38(2), 542-546

- Van der Zwaluw, K., de Haan, A., Pluister, G. N., Bootsma, H. J., de Neeling, A. J., & Schouls, L. M. (2015). The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PloS one*, 10(3), e0123690.
- Van Hoek A. H. A. M., Mevius D., Guerra B., Mullany P., Roberts A. P. & Aarts H. J. M. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: An overview. *Front. Microbiol.* 2:203 doi: 10.3389/fmicb.2011.00203.
- Webber, M. A., & Piddock, L. J. V. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(1), 9-11
- Yves L, Gantier M.2009. *Staphylococcus aureus*.p.114
- Yvon M .2009. Une histoire de la résistance aux antibiotiques: à propos de six bactéries.p.40
- Web : site d'OMS :
 - [ps://www.who.int/fr/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed](https://www.who.int/fr/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed)
 - https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/201402/conseils_prescription_antibiotiques_rapport_d_elaboration.pdf

Milieu de culture gélose DRIGALSKI :

Milieu d'isolement sélectif des bacilles Gram – peu exigeants.

Composition

Composant	Quantité (g/L)	Rôle
EXTRAIT DE VIANDE	3	Apport de facteurs de croissance (bases azotées, acides aminées, vitamines)
Extrait de levure	3	
Peptone	15	Source d'azote, de carbone et d'énergie
Lactose	15	Source d'énergie + lecture d'un caractère biochimique
Désoxycholate de sodium	1	Agents sélectifs
Cristal violet	0.005	
Thiosulfate de sodium	1	Source de soufre
Bleu de bromothymol (BBT)	0,080	Indicateur de pH
Agar	11	gélifiant
pH	7,4	

Principe

Agent sélectif : désoxycholate de sodium (sels biliaires) et cristal violet (colorant)

⇒ Inhibition des bactéries Gram +, sélection des bacilles Gram -.

Caractère biochimique lu : utilisation du lactose comme source de carbone.

⇒ La lecture de l'utilisation du lactose est possible grâce à la présence d'un indicateur de pH, le BBT. L'utilisation du lactose acidifie le milieu, ce qui est révélé par le virage de l'indicateur de pH à sa teinte acide (jaune).

الملخص

يركز هذا العمل على دراسة البكتيريا ذات المقاومة المتعددة والبكتيريا ذات المقاومة العالية للمضادات الحيوية، المعزولة من المرضى الذين تم إدخالهم إلى مستشفى. وقد أجريت هذه الدراسة في مختبر علم الأحياء المجهرية خلال فترة 3 أشهر هدفها الرئيسي هو تحديد الطرق الأساسية لانتقال وفقا لبروتوكول منهجي وخطة عمل وفق المعايير الدولية لنظافة المستشفيات انطلاقا من الكشف التلقائي للمرضى عن طريق اخذ عينات من مخاط الانف و مخاط الانبوب الهضمي. 50 عينة اخذت من 25 مريضا في مستشفى بشير بن ناصر بسكرة. من بين 44 سلالة بكتيرية معزولة؛ تم اختيار 19 دراسة البكتيريا ذات المقاومة المتعددة والبكتيريا ذات المقاومة العالية للمضادات الحيوية. يتم تحديد السلالات المقاومة انطلاقا من خلال دراسة الملف التعريفي للمضادات الحيوية لكل سلالة و كذلك النمط الظاهري في وسط زرع للمضادات الحيوية وغيرها من الاختبارات التكميلية لبعض الإنزيمات المسؤولة عن المقاومة للأدوية المتعددة، مثل انزيم البيتاكتماز و الكاربابينيماز. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن البكتيريا ذات المقاومة المتعددة والبكتيريا ذات المقاومة العالية للمضادات الحيوية المعزولة وعبارة عن بكتيريا الانبوب الهضمي المفرزة انزيم البيتاكتماز واخرى مفرزة مثل انزيم الكاربابينيماز التي ترجع آلية مقاومتها دائما إلى التعبير الأنزيمي (وجود بيتالاكتماز و كاربابينيماز). ومع ذلك المكورات العنقودية المعزولة من مخاط الأنف هي سلالات طبيعية تمثل جزء من المخاطية الأنفية الطبيعية لذلك لم يتم عزل أي سلالة من المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميتيسيلين.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا ذات المقاومة المتعددة، البكتيريا ذات المقاومة العالية للمضادة الحيوية البيتاكتماز، الكاربابينيماز، المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميتيسيلين.

Résumés

Ce travail porte sur l'étude des bactéries multirésistantes (BMR) et les bactéries hautementrésistante (BHR), isolées des patients admis au sein d'un établissement public hospitalier. Cette étude qui a eu lieu au laboratoire de microbiologie durant une période de 3 mois dont l'objectif principale est de déterminer les porteurs des BMR et BHR selon le protocole de travail de laboratoire de l'hygiène hospitalière basé essentiellement sur la recherche systématique de portage de BMR et BHR dans la flore nasal et digestive . 50 prélèvements prévenant de 25 patients hospitalisés à l'établissement public hospitalier Bachir Ben Nacer Biskra. Sur un total de 44 souches isolées ; 19 souches ont été sélectionnée pour l'étude de la multirésistance. L'identification des BMR et BHR est effectué par l'étude de profile d'antibiogramme et autres tests complémentaire pour la recherche de certains enzymes responsable de la multirésistance comme les betalactamases et les carbapénimases. Les résultats obtenus ont montré que les BMR et les BHR isolées sont des EBLSE et des EPC dont le mécanisme de résistance est toujours dû à une expression enzymatique (présence de bêtalactamase et carbapénimase). Cependant les Staphylocoques *isolées* à partir de prélèvement nasal sont des souches sauvage fait partie de la flore nasal alors aucun souche MRSA n'a été isolée

Mots clés : bactéries multirésistantes (BMR), les bactéries hautementrésistante (BHR), entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu(EPC), entérobactéries productrices de carbapénèmases (EPC), *Staphylococcus aureus* résistant à

Abstarct

This work focuses on the study of multidrug-resistant bacteria (BMR) and highly-resistant bacteria (BHR), isolated from patients admitted to a public hospital. This study was conducted at microbiology laboratory during a 3-month period whose main objective is to determine BMR and BHR carriers according to the protocol of laboratory work of hospital hygiene based mainly on research. systematic carriage of BMR and BHR in the nasal and digestive flora. 50 samples taken from 25 hospitalized patients at Bachir Ben Nacer Biskra public hospital. Of 44 isolated strains, 19 strains were selected for the study of multidrug resistance. The BMR and BHR are identified by the antibiogram profile study and other complementary tests for certain enzymes responsible for multidrug resistance, such as betalactamases and carbapenimases. The results obtained showed that the isolated BMRs and BHRs are EBLSEs and EPCs whose mechanism of resistance is always due to enzymatic expression (presence of betalactamase and carbapenimase). However, Staphylococci isolated from nasal swabs are wild strains is part of the nasal flora so no MRSA strain was isolated

Key words: multidrug-resistant bacteria (BMR), highly-resistant bacteria (BHR), Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Enterobacteriaceae production of beta-lactamase.