

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET

DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou

Faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques

Département de Biochimie et Microbiologie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Intitulé

**Isolement et Identification des bactéries à partir des
Hémocultures au CHU Nedir Mohammed de
Tizi-Ouzou**

Présenté et Soutenu par :

M^{elle} BELHADJ Kathia

M^{elle} CHEKIR Ania

Le : 06 /07 /2023

Jury d'évaluation :

Président du Jury : M^{me} IRATNI AICHE Ghenima

M.C.A

Univ de Tizi-Ouzou

Encadrant : M^r HOUALI Karim

Professeur

Univ de Tizi-Ouzou

Examineur: M^r SEBBANE Hillal

M.C.B

Univ de Tizi-Ouzou

Année universitaire : 2022/2023

Remerciements :

On Tient à remercier en premier lieu, notre encadrant Professeur *HOUALI Karim* pour tout son soutien, et ses efforts élaborés pour réaliser ce travail. On le remercie de nous avoir fait confiance, et de nous avoir très bien orientés.

Nos très sincères remerciements s'adressent également aux membres de jury, le fait d'avoir accepté de juger ce travail.

Madame *IRATNI-AICHE Ghénima* Maitre de Conférence Classe « A » qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury et Monsieur *SEBBANE Hillal* Maitre de Conférence Classe « B » d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous voudrions présenter nos remerciements et notre gratitude au chef de service du laboratoire de microbiologie du CHU Nedir Mohamed de Tizi-Ouzou Docteur *CHERFI* et Madame *KOULALI* d'avoir accepté de nous recevoir dans le laboratoire et d'avoir mis tous les outils à notre disposition.

Un grand Merci aux médecins et à tous les techniciens du laboratoire de microbiologie pour leur patience, leur générosité et tous leurs conseils.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans associer toutes les personnes qui nous ont aidés d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Louange à ALLAH le tout puissant, qui m'a permis de voir ce jour tant attendu

A Maman, Papa,

*Etre parents est une grande science dont vous êtes les savants
Par amour vous avez fait de moi le plus heureux des enfants
maman, papa je vous remercie jamais assez. Je vous aime.*

A mes sœurs et frère,

*Qui n'ont pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études.
Que Dieu les protège et leurs offre la chance, la santé et le bonheur. Merci de me procurer la
joie et la bonne humeur tous les jours.*

A mes très chères nièces, étaient d'un support moral et une tendresse irréprochable.

A Toute ma famille, grands-parents, oncles, tantes, cousins, cousines

*Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour votre soutien et
encouragements. Je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que vous m'offrez
quotidiennement et votre bonté exceptionnelle. Que Dieu le Tout Puissant vous garde et vous
procure santé et bonheur.*

A la mémoire de mon grand-père et mon oncle .Que Dieu les accueille en paradis.

A mon binôme, dans ce mémoire de recherche, je te souhaite la grande réussite.

A mes amies et amis,

*Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées.
Je vous souhaite une réussite extraordinaire.*

A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment.

ANIA



Louange à ALLAH le tout puissant, qui m'a permis et faciliter d'en arriver là

Merci pour tout

A la mémoire de mon cher Papa,

Sache que je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain, tu as toujours cru en moi, tu es et tu resteras ma source de motivation. Tout ce que je fais est dans le but que de là-haut, tu sois fière de moi. Tu es tout le temps dans mes pensées et tu resteras gravé

A ma chère Maman,

Honorable, paisible, aimable et très patiente, tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, tu as tout fais pour qu'on soit ce qu'on est aujourd'hui.

Je ne vous remercierai jamais assez. Je vous aime

A ma chère sœur Warda,

La personne la plus compréhensive et la plus innocente.

Merci pour ton écoute, pour tout ce que tu faisais

et tout ce que tu me disais. Tu étais là a tous moments.

Sans toi je n'aurai jamais pu le faire

A mon cher mari Lyes,

Bosseur, ambitieux et toujours présent,

Je te dédie ce travail en te disant

mission accomplie. Je te remercie pour

tes efforts, tes encouragements, ta patience et

ta compréhension

A mon cher frère Imad,

Tellement sage malgré ton très jeune âge.

Merci pour ta gentillesse et la bonne humeur que

tu m'apportes

A mon binôme Ania,

Une boule d'énergie, réussite méritée je te souhaite la meilleure des continuités, Merci pour tout

A toute ma famille et mes amies,

Ces dédicaces ne seront pas complets sans vous

remercier pour tout le soutien que vous m'aviez

apportés

KATHIA



Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction 2

Partie théorique

1	Définition de la bactériémie et septicémie ou sepsis.....	4
2	Classification des bactériémies	4
2.1	Les types de la bactériémie.....	4
2.1.1	Bactériémies transitoires	4
2.1.2	Bactériémies intermittentes	5
2.1.3	Bactériémies continues.....	5
2.2	Le contexte d'apparition.....	5
2.2.1	Les bactériémies communautaires	5
2.2.2	Les bactériémies nosocomiales	5
2.3	L'origine de la bactériémie.....	5
2.3.1	Bactériémie primaire	5
2.3.2	Bactériémie secondaire	5
2.3.3	Pseudo bactériémie.....	5
3	Physiopathologie des bactériémies.....	6
3.1	Portes d'entrées.....	6
3.2	Schémas physiopathologiques	7
3.2.1	Bactériémie à point de départ thrombophlébitique	7
3.2.2	Bactériémie à point de départ lymphatique.....	7
3.2.3	Endocardite infectieuse	8
4	Principaux germes responsables de bactériémies.....	8
4.1	Les bactéries Gram positif.....	8
4.1.1	Staphylocoques.....	8
4.1.2	Streptocoques	9
4.1.3	Entérocoques	9
4.1.4	Listeria.....	10
4.2	Les bactéries Gram négatif.....	10
4.2.1	Les entérobactéries.....	10
4.2.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10

Table des matières

4.2.3	<i>Brucella</i>	11
5	Aspect clinique	11
Partie pratique : Hémoculture		
1	Définition	13
2	Réalisation du prélèvement	13
2.1	Le moment du prélèvement	13
2.2	Les règles à respecter lors du prélèvement	13
2.3	Nombre de prélèvements à effectuer	13
2.3.1	Milieus de culture servant aux prélèvements	13
2.4	Étiquetage et acheminement	15
3	Etude bactériologique	15
4	Interprétation d'une hémoculture	15
Partie pratique : Résistance des bactéries aux antibiotiques		
1	Définition des antibiotiques	16
2	La résistance aux antibiotiques	16
2.1	Définition	16
3	Les Types de la résistance aux antibiotiques	16
3.1	La résistance naturelle	16
3.2	La résistance acquise	16
4	Mécanismes de la résistance acquise aux antibiotiques	17
Partie pratique : Matériels et Méthodes		
1	L'objectif et lieu, période d'étude	18
2	Matériels non biologiques	18
3	Méthodes	18
4	Enregistrement des échantillons	18
5	Incubation des flacons	18
6	Détection de la croissance bactérienne	19
6.1	Système manuel	19
6.2	Système automatisé :	19
7	Isolement des bactéries	19
7.1	Les milieux d'isolement	19
7.1.1	Gélose au sang cuit (GSC)	19
7.1.2	Gélose au sang frais (GSF)	19

Table des matières

7.1.3	Milieux Chapman :	20
7.1.4	Milieu Sabouraud-Chloramphénicol :	20
7.1.5	Gélose Hektoen :	20
7.1.6	Gélose Columbia	20
7.1.7	Gélose Muller Hinton	21
7.2	Technique d'ensemencement	21
8	Identification des bactéries	21
8.1	Aspect macroscopique des colonies	21
8.2	Tests d'orientation	22
8.2.1	Etat frais	22
8.2.2	Test de catalase :	23
8.2.3	Test de l'oxydase :	23
8.2.4	Test de la coagulase :	24
8.2.5	Coloration de Gram	24
8.3	Identification biochimique	25
8.3.1	Galleries biochimiques classiques (macro-galleries)	25
8.3.2	Galleries API (micro-galleries)	28
8.4	Tests particuliers	30
8.4.1	Test d'agglutination (Staphaurex)	30
8.4.2	Test de Satelletisme	31
8.4.3	Camp test	31
8.4.4	Agglutinations salmonelle (sérogroupage)	32
8.4.5	Test de sensibilité à l'Optochine	33
8.4.6	Sérogroupage des streptocoques	33
8.4.7	Test de synergie	33
8.4.8	Test de filamentation	34
8.5	Antibiogramme	34
8.6	Technique de CMI (E-Test)	35
8.7	Identification bactérienne par les méthodes automatisées	36
Résultats et Discussions		
1	Caractéristiques de la population étudiée	39
1.1	Répartition des hémocultures selon l'âge	39
1.2	Répartition des hémocultures par services	39

Table des matières

1.3	Résultats globaux des hémocultures.....	40
1.4	Répartition des hémocultures positives selon la tranche d'âge.....	41
1.5	Répartition des hémocultures positives par services.....	42
2	Profil bactériologique des bactériémies.....	42
2.1	Répartition des bactéries isolées selon la coloration de Gram.....	42
2.2	Répartition des bactéries isolées selon l'espèce bactérienne.....	43
3	Résultats des antibiogrammes.....	43
3.1	Profil de résistance des entérobactéries.....	43
3.1.1	<i>Escherichia coli</i>	44
3.1.2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	45
3.1.3	<i>Serratia</i>	45
3.1.4	<i>Proteus</i>	46
3.1.5	<i>Salmonella</i>	46
3.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	46
3.3	<i>Acinetobacter baumannii</i>	47
3.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	48
3.5	<i>Staphylococcus</i> à coagulase négative.....	48
3.6	<i>Enterococcus</i>	49
3.7	<i>Streptococcus</i>	50
3.8	<i>Listeria</i>	50
3.9	<i>Haemophilus parainfluenza</i>	51
3.10	<i>Candida</i>	51
3.11	<i>Brucella</i>	51
3.12	Les anaérobies.....	51
	Discussions.....	52
	Conclusion.....	59
	Références bibliographiques.....	60
	Annexes.....	65
	Résumé.....	72
	Abstract.....	73

Liste des figures

Figure 1: Mécanisme des bactériémies à point de départ thrombophlébitique	7
Figure 2: <i>Staphylococcus aureus</i> sur milieu Chapman.....	8
Figure 3 : flacon du bouillon hémoculture	14
Figure 4: Aspect des colonies des principales familles des bactéries isolées	22
Figure 5: Technique de recherche de la catalase.....	23
Figure 6: Technique de l'oxydase.....	23
Figure 7: Des tests de coagulase positifs.....	24
Figure 8: Citrate de Simmons (Sur la gauche : négatif ; sur la droite : positif)	26
Figure 9: l'interprétation du TSI.....	27
Figure 10: Test de Satelletisme	31
Figure 11: L'interprétation du Camp-Test.....	32
Figure 12:Test d'agglutination <i>Salmonella</i>	32
Figure 13: Répartition des hémocultures selon la tranche d'âge	39
Figure 14: Répartition des hémocultures par services	40
Figure 15: Répartition des hémocultures globale.....	41
Figure 16: Répartition de l'hémoculture positive selon la tranche d'âge	41
Figure 17: Répartition des hémocultures positives par service.....	42
Figure 18: Répartition des hémocultures positives selon la coloration de Gram.....	42
Figure 19: Répartitions des hémocultures positives selon les genres et espèces	43
Figure 20: Répartitions des entérobactéries selon l'espèce.....	44
Figure 21: Le comportement des isolats d' <i>E.coli</i> vis-à-vis des ATB testés.....	44
Figure 22: Le comportement de <i>Klebsiella pneumoniae</i> vis-à-vis des ATB testés	45
Figure 23: Le comportement des souches de <i>Serratia</i> vis-à-vis des ATB testés	46
Figure 24: Le comportement des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vis-à-vis des ATB testés.....	47
Figure 25: Le comportement des souches d' <i>Acinetobacter baumannii</i> vis-à-vis des ATB testés.....	47
Figure 26: Le comportement des souches de <i>Staphylococcus</i> vis-à-vis des ATB testés	48
Figure 27:Le comportement des souches <i>Staphylococcus</i> à coagulase négative(SCN) vis-à-vis des ATB testés	49
Figure 28 : Le comportement des souches <i>Enterococcus</i> vis-à-vis des ATB testés	49
Figure 29: Le comportement des isolats de <i>Streptococcus</i> vis-à-vis des ATB testés	50
Figure 30:Le comportement des isolats de <i>Listeria</i> vis-à-vis des ATB testés	50
Figure 31: BacT/ALERT 3D (incubateur et surveillance des hémocultures)	65
Figure 32: Etuve d'incubation des hémocultures (flacons classiques) à 37°C	65
Figure 33: Poste de sécurité microbiologique classe II.....	66
Figure 34: Système d'identification automatique VITEK2	66
Figure 35:Incubation des anaérobies.....	67
Figure 36: Test de synergie	71

Liste des tableaux

Tableau 1: Portes d'entrées de certaines bactéries et leurs localisations secondaires	6
Tableau 3: Profil bactériologique des isolats de Salmonella.....	46
Tableau 4: Comportement de <i>H.parainfluenza</i> vis-à-vis des ATB testés	51
Tableau 1: Matériels non Biologiques	67

Liste des abréviations

AARN: Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques
ACCP: American College of Chest Physicians
ADH : L'arginine-dihydrolase
API : Analytical Profil Index.
ASM : Société Américaine de Microbiologie
ATB : Antibiotique.
BGN : Bacille à Gram Négatif.
BGT: Bouillon Glucosé Tamponné
BHIB: Brain Heart Infusion
BLSE : Béta-lactamase à spectre élargi.
C1G : Céphalosporines première Génération
C2G :Céphalosporines deuxième Génération
C3G :Céphalosporines troisième Génération
CASFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CC : Centimètre Cube
CHU : Centre Hospitalo-universitaire
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
CO₂ : Di-oxyde de Carbon
CRBSI : Catheter Related Blood Stream Infection
CVC:Catheter Related Central.
GN: Gram Négatif
GP: Gram Positif
GSC : Gélose au sang cuit
GSF : Gélose au sang frais
HACEK : Haemophilus, Actinobacillus , Cardiobacterium , Eikenella et Kingella
HK : Gélose hektoen
K.E.S :*Klebsiella Enterobacter Serratia*.
MH: Muller- Hinton.
ML: Mililitres
ONPG: Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside
ORL : Oto-Rhino-Laryngologie
PAV: Pneumonies Associées à la Ventilation
PLP : Protéines liant les Pénicillines
PSM : Poste de Sécurité Microbiologique

Liste des abréviations

R : Résistant.

S : Sensible.

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline.

SCN : *Staphylococcus* à coagulase négative

SCP : *Staphylococcus* à Coagulase Positive.

SDMV:Syndrome de Défaillance Multi-Viscérale

SFM : Société Française de MICROBIOLOGIE

SGA : Streptocoques du Groupe A

SRIS : Un syndrome de réponse inflammatoire systémique.

SSCM: Society of Critical Care Medecine

UFC : Unité Formant Colonies

VP : Voges-Proskauer

Les abréviations des antibiotiques

Béta-LACTAMINES

Pénicilline : PEN G

Oxacilline : OXA

Ampicilline : AMP

Amoxicilline : AMX

Amoxicilline+Ac.clavulanique : AMC

Ticarcilline : TIC

Ticarcilline +Ac.clavulanique : TCC

Pipéracilline : PIP

Céfazoline : CFZ

Céfoxitine : FOX

Céfotaxime : CTX

Ceftriaxone: CRO

Ceftazidime : CAZ

Aztréonam : ATM

Imipénème : IPM

Ertapénème : ERT

AMINOSIDES

Gentamicine : GEN

Streptomycine Haut Niveau : STH

Kanamycine : K

Liste des abréviations

Amikacine : AMK

Tobramycine : TOB

Nétilmicine : NET

CYCLINES

Tétracycline : TCY

Doxycycline : DOX

MACROLIDES

Erythromycine : ERY

Clindamycine : CLI

Pristinamycine : PRI

PHENICOLES

Chloramphénicol : C

POLYPEPTIDES

Colistine: COL

GLYCOPEPTIDES

Vancomycine : VAN

Teicoplanine : TEC

SULFAMIDES ET ASSOCIES

Triméthoprim+ sulfaméthoxazol : SXT

QUINOLONE

Acide nalidixique AN

Ofloxacin OFX

Ciprofloxacine : CIP

Lévofloxacine : LEV

NITROFURANTOINES

Furanes : NIT

AUTRES

Acide fusidique : AF

Rifampicine : RIF

Fosfomycine : FOS

Introduction

Il convient de noter que le sang humain est normalement stérile, c'est-à-dire dépourvu de bactéries. Les infections bactériennes dans le sang sont souvent le résultat d'une intrusion de bactéries provenant d'autres parties du corps ou de sources externes.

La présence de ces bactéries dans le sang peut être un signe d'infection bactérienne grave, telle que la septicémie qui peut être une condition médicale grave.

Les bactériémies sont responsables d'une morbidité et d'une mortalité élevée. Les hémocultures restent la méthode de référence pour le diagnostic de ces bactériémies. Les infections avec hémocultures positives nécessitent une prise en charge diagnostique et thérapeutique rapide avec l'instauration d'une antibiothérapie probabiliste de manière à limiter leurs conséquences et améliorer le pronostic des patients **(Donnars et Eveillard., 2023)**.

Selon SFM, l'évolution clinique des bactériémies est améliorée lorsque l'agent pathogène causal est identifié et lorsqu'il l'est d'autant plus rapidement.

La détection et l'identification des bactéries problématiques, couplées à des études de sensibilités aux antibiotiques, permettront aux cliniciens de mener une prise en charge thérapeutique optimale.

Durant cette étude, nous avons voulu montrer et expliquer les techniques d'hémoculture pour le diagnostic des bactériémies et sepsis par analyse des statistiques d'hémocultures à 3 mois au Centre Hospitalier Universitaire de TIZI-OUZOU dont le but est l'isolement et l'identification des bactéries pathogènes et la description des caractéristiques de leurs profils épidémiologiques.

I. Partie Théorique

1 Définition de la bactériémie et septicémie ou sepsis

C'est le passage répété des bactéries dans le sang à partir d'un foyer tissulaire de multiplication microbienne. Ce foyer s'est constitué lors de la pénétration des bactéries exogènes par une porte d'entrée muqueuse ou cutanée, ces bactéries régulièrement véhiculées par le sang peuvent aller ensemencher d'autres tissus, créant alors des foyers secondaires ou métastases infectieuses qui peuvent à leur tour, ensemencher le sang circulant. (Michel, 2013)

La bactériémie se définit par la présence de bactéries dans le sang, authentifiée par des hémocultures positives. Elle est de gravité variable, allant de l'état fébrile non compliqué à l'état de choc (Bryan ; Schouheyder et Sogaard., 1989, 2010)

Le terme septicémie n'est plus utilisé, il est remplacé par l'expression « bactériémie associé à un sepsis ».

La notion de sepsis a été définie par l'American College of Chest Physicians (ACCP) et la Society of Critical Care Medicine (SSCM) en 1992. Le sepsis correspond à l'association d'une infection présumée et d'un Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique (SRIS). Ce syndrome est composé de quatre variables (température, fréquence cardiaque, fréquence respiratoire, nombre de leucocytes)

Le sepsis comporte 3 stades de gravité croissante : le sepsis simple ; qui est une réaction de l'organisme à une infection. Ce syndrome associe au moins deux signes du SRIS, le sepsis sévère qui correspond à un sepsis avec une hypotension conduisant ainsi à une mauvaise alimentation des organes se traduisant par la défaillance d'au moins un organe (rein, foie, cerveau... etc.), et enfin le choc septique stade ultime qui se différencie du sepsis sévère par une hypotension persistante malgré un traitement adéquat. Il s'accompagne en général d'un syndrome de défaillance multiviscérale (SDMV).

2 Classification des bactériémies

Plusieurs classifications sont utilisées selon :

2.1 Les types de la bactériémie

2.1.1 Bactériémies transitoires

Elles correspondent à des décharges brèves de bactéries dans le sang, et sont généralement asymptomatiques, fréquentes, communes et spontanément résolutive (Françoise Guillet *et al.*, 2016, 2023)

2.1.2 Bactériémies intermittentes

Elles se caractérisent par des décharges bactériennes irrégulières et répétées dans le sang et souvent associées à une infection focale (**Françoise Guillet *et al.*., 2016, 2023**)

2.1.3 Bactériémies continues

Elles correspondent à une décharge continue de microorganismes dans la circulation sanguine.

Qu'elles soient continues ou intermittentes, les bactériémies constituent toujours un état grave et redouté. Une fois entrée dans la circulation sanguine, la bactérie est susceptible de se propager et de s'installer dans d'autres sites (**François *et al.*, 2016**).

2.2 Le contexte d'apparition**2.2.1 Les bactériémies communautaires**

L'origine de la bactériémie est définie comme communautaire lorsque le diagnostic est posé à l'admission ou dans les 48 heures après l'hospitalisation (**Aiche., 2022**).

2.2.2 Les bactériémies nosocomiales

L'origine de la bactériémie est définie comme nosocomiale lorsque le diagnostic est posé sur des hémocultures prélevées les premières 48 heures après hospitalisation, chez un patient sans signe clinique infectieux à son admission (**Aiche., 2022**).

2.3 L'origine de la bactériémie**2.3.1 Bactériémie primaire**

Le germe pathogène isolé dans l'hémoculture n'est pas impliqué dans l'infection d'un autre site.

2.3.2 Bactériémie secondaire

Le micro-organisme isolé dans l'hémoculture est déjà impliqué dans l'infection d'un autre site de l'organisme (**Aiche., 2022**).

2.3.3 Pseudo bactériémie

Présence d'une hémoculture positive pour un ou plusieurs germes mais dont la croissance ne reflète pas la réalité clinique : contamination. (**EL Bouderkouï., 2015**)

3 Physiopathologie des bactériémies

La porte d'entrée des micro-organismes survient à partir d'un foyer infectieux primaire localisé.

Le système immunitaire est activé pour tenter d'éliminer ces microorganismes, mais devant une charge bactérienne élevée, ce système risque d'être dépassé, ce qui provoque la formation de foyers infectieux secondaires. (Fraperie et Lasserre., 2016-2023)

3.1 Portes d'entrées

La recherche d'une porte d'entrée est un élément clé lors de suspicion des bactériémies, car elle permet d'orienter la recherche de l'étiologie bactérienne et de traiter l'infection selon le site identifié (Aiche., 2022).

Les germes responsables de bactériémie et de septicémie peuvent avoir différentes portes d'entrées par les quelles peuvent pénétrer dans l'organisme pour gagner leur foyer secondaire dont l'infection. Ces portes d'entrées sont différentes selon l'origine de la bactériémie ; soit communautaire ou bien associé au soin (nosocomiale).

La porte d'entrée et le foyer secondaire se diffèrent aussi en fonction de bactérie responsable de la bactériémie. Comme le tableau I l'indique

Tableau 1: Portes d'entrées de certaines bactéries et leurs localisations secondaires

	Bactérie	Porte d'entrée	Localisation secondaire
Gram Négatif	<i>Escherichia coli</i>	Digestive, urinaire	Endocardie, extra-digestive
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Associé à des matériaux étrangers (sonde urinaire)	Endocardie, abcès, poumons, arthrite
GramPositif	Sthaphylocoques	Cutanée (gestes invasifs, cathéter périphérique ou central)	Endocardie, rate, foie, arthrite (os, articulaire), méninge
	<i>Streptococcus bêta hémolytique</i>	Digestive	Endocardie, arthrite
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Pulmonaire, méninge	Méninge, arthrite, endocardie
	<i>Enterococcus</i>	Digestive	Endocardie
	<i>Streptococcus oraux</i>	Bucco-dentaire	
<i>Streptococcus du GB</i>	Digestive		

La porte d'entrée des bactériémies communautaires est majoritairement urinaire, digestive ou pulmonaire et plus rarement cutanée, respiratoire ou dentaire, une part importante des portes d'entrée reste inconnue. A l'inverse, la principale porte d'entrée des bactériémies nosocomiales : urinaire avec la présence d'une sonde dans la moitié des cas. Les microorganismes pénètrent aussi par le biais de dispositifs intravasculaires (cathéters, chambre implantée).

3.2 Schémas physiopathologiques

3.2.1 Bactériémie à point de départ thrombophlébitique

L'entrée est le plus souvent épidermique (lésion cutanée traumatique ou chirurgicale).

La lésion se forme près de l'entrée et consiste en un coagulum de fibrine infiltré par du sang et des cellules immunitaires et colonisé par des bactéries (thrombus infecté). Des fragments (micro-emboles septiques) se détachent irrégulièrement d'un thrombus qui migre en grand nombre dans le sang. Les métastases sont fréquentes et concernent principalement les poumons, les nerfs, les tissus rénaux et le système réticulo-endothélial.

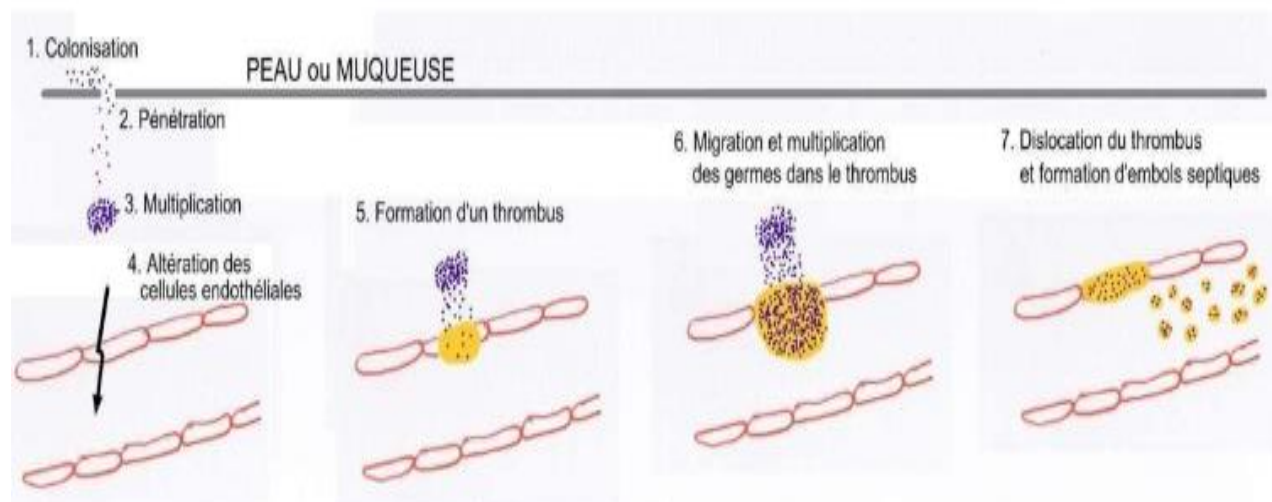


Figure 1: Mécanisme des bactériémies à point de départ thrombophlébitique

3.2.2 Bactériémie à point de départ lymphatique

La porte d'entrée est généralement digestive.

Les bactéries pathogènes pénètrent dans la muqueuse intestinale et se multiplient notamment au niveau des ganglions lymphatiques mésentériques qui en constituent le

foyer. A partir de ces lésions méésentériques, certaines bactéries peuvent atteindre le sang par le canal thoracique et former des métastases, notamment dans le tissu réticulo-endothélial. Souvent, cependant, les bactéries restent dans les ganglions lymphatiques ou leur lyse libère de grandes quantités d'endotoxines dans le sang.

3.2.3 Endocardite infectieuse

C'est une infection bactérienne de la couche interne du cœur ou des valves cardiaques. Les bactéries pénètrent dans le sang, les agents pathogènes s'enchevêtrent dans la fibrine et plaquettes pour former des végétations, qui sont attachées aux valves cardiaques, et l'endocarde qui se forme sur la prothèse matérielle tel que des prothèses valvulaires, des conduits vasculaires, des sondes de stimulateur cardiaque (pacemaker) ou cathéters. (Matthew *et al.*, 2022)

4 Principaux germes responsables de bactériémies

4.1 Les bactéries Gram positif

4.1.1 Staphylocoques

Ce sont des cocci qui fermentent le glucose, sont catalase-positives et oxydase-négatives. Ce sont des aéro-anaérobies facultatifs immobiles et des halophiles, ce qui explique leur présence sur gélose de Chapman.

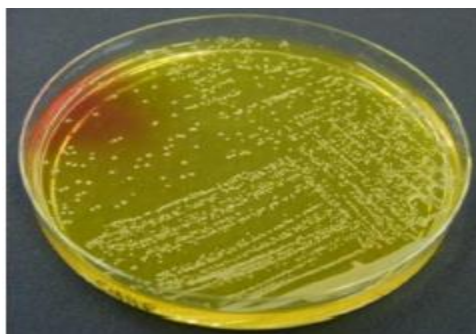


Figure 2: *Staphylococcus aureus* sur milieu Chapman.

Le genre *Staphylococcus* comporte deux espèces :

- *Staphylococcus* à coagulase négative (SCN)

Les espèces de *Staphylococcus* à coagulase négative sont fréquemment trouvées dans la flore normale de la peau humaine et les organismes responsables les plus courants d'infections de la circulation sanguine liée au cathéter (CRBSI). Sa pathogénicité est favorisée par la formation de biofilms qui est l'un des principaux facteurs de virulence de ces bactéries qui favorise l'adhérence et la colonisation sur le CVC. (Sohani., 2022)

- *Staphylococcus aureus*

C'est le staphylocoque à coagulase positive, il est impliqué dans de nombreuses infections communautaires et nosocomiales, et considéré comme étant un véritable pathogène en raison de son potentiel de pathogénicité élevé (**Bousekraoui et al., 2017**).

4.1.2 Streptocoques

Ce sont des bactéries du genre *Streptococcus*, qui ont une morphologie cocci en chainettes, Gram positif, et se caractérisent par la présence de catalase, ce qui les distingue des staphylocoques. Certaines espèces du genre *Streptococcus* appartiennent à la flore oropharyngée humaine et font partie de la flore commensale, alors que d'autres sont pathogènes :

- *Streptococcus pyogenes*

C'est un streptocoque Béta- hémolytique du groupe A (SGA), il se propage uniquement d'une personne à l'autre. Elle provoque de fréquentes infections bénignes et non invasives, mais aussi des infections invasives graves : bactériémies, infections cutanées nécrosantes, infections du post-partum, pleuropneumonie, méningite, qui peuvent être associées à des streptocoques associés à un syndrome de choc toxique.

- *Streptococcus pneumoniae*

Ces pneumocoques sont des diplocoques Gram positif, alpha-hémolytiques.

La bactériémie pneumococcique peut survenir principalement pendant ou en même temps que la phase aiguë de l'infection pneumococcique. Les complications peuvent résulter d'une septicémie et d'un choc. Dans le cas d'une bactériémie, la dissémination secondaire à partir de sites distants peut entraîner des infections telles que l'arthrite septique, la méningite et l'endocardite. (**Tony et al., 1999**)

4.1.3 Entérocoques

Les entérocoques sont des cocci à Gram positif qui forment des chaînes et sont des aéro-anaérobies facultatifs qui font partie de la flore intestinale normale. Anciennement classé comme streptocoque du groupe D, il est maintenant considéré comme un genre distinct. Ces bactéries se caractérisent par la présence d'enzymes aescinases positives, de réactions ADH et VP positives.

Il existe plusieurs espèces, mais *E faecalis* et *E.faecium* sont celles qui causent le plus souvent des infections chez l'humain. (**Larry et Bush., 2021**)

4.1.4 Listeria

Sont des bacilles de petite taille, mobiles à 20 °C (grâce à des flagelles), Gram positif. Toutes les espèces sont catalases positives, non sporulées, et anaérobies facultatifs. Ce sont des bactéries ubiquistes qu'on trouve presque partout, très résistantes.

4.2 Les bactéries Gram négatif

4.2.1 Les entérobactéries

Les *Enterobacteriaceae* forment une grande famille de bactéries Gram négatif qui fermentent le glucose, réduisent le nitrate en nitrite, manquent d'oxydases et sont responsables de sévérités de maladies très différentes en raison de mécanismes pathogènes différents. Cependant, toutes ces bactéries sont souvent favorisées par le système digestif et sont présentes dans l'environnement, même si certaines font partie de la flore normale.

- *Escherichia coli*

C'est un bacille à Gram négatif de la famille des entérobactéries, c'est une bactérie commensale de l'intestin de l'homme et des animaux elle est aérobic strict et immobile. Cette espèce est responsable de nombreuses infections, ainsi que certaines bactériémies. Elles peuvent également se manifester chez le nouveau-né, les nourrissons prématurés en particulier (**Bakhoun, 2004**)

- *Klebsiella, Enterobacter, Serratia* (KES)

Ce sont des bacilles à Gram négatif qui appartiennent à la famille des entérobactéries, et qui exprime les mêmes caractéristiques biochimiques de cette famille à l'exception de certaines espèces.

Ces trois genres sont des germes hospitaliers qui peuvent provoquer des infections nosocomiales (**Bousekraoui et al., 2017**)

4.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

C'est une bactérie bacille aérobic gram négatif mobile qui ne fermente pas le lactose.

P.aeruginosa est un agent pathogène opportuniste qui peut provoquer une infection chez les patients dont les mécanismes de défense sont altérés.

P.aeruginosa est l'un des agents étiologiques les plus fréquents dans les pneumonies nosocomiales dont en particulier les pneumonies associées à la ventilation (PAV), les

bactériémies et les infections des voies urinaires liées aux cathéters vésicaux (**Díaz Santos., 2022**)

4.2.3 *Brucella*

Les bactéries de ce genre sont d'origine zoonotique, des coccobacilles à Gram négatif de petite taille, intracellulaires facultatives, non capsulés. Aérobie strictes, catalase positive, oxydase habituellement positif ainsi qu'un nitrate réductase positive. La plus part des souches isolées en pathologie humaine produisent une uréase d'action rapide et intense (**Nauciel et Vildé., 2005**).

5 Aspect clinique

En présence de foyers infectieux multiples, de neutropénie ou de présence d'un corps étranger en particulier un CVC, la fièvre peut être associée à des frissons sévères, qui sont des signes cliniques fréquents. Dans certains cas, comme la bactériémie à entérobactéries, une hypothermie peut être observée.

En particulier, les personnes âgées, immunodéprimées et les patients recevant une corticothérapie ou un traitement antipyrétique peuvent ne pas développer des signes cliniques de bactériémie. Cependant, des signes graves doivent être recherchés, notamment de sepsis et/ou de choc septique.

II. Partie Pratique

1 Définition

L'hémoculture est un examen microbiologique au cours duquel du sang généralement stérile est mis en culture dans des milieux adaptés afin d'identifier la présence d'une bactériémie voir septicémie.

L'hémoculture est une technique de laboratoire visant à détecter la présence ou l'absence de microorganismes (bactéries et levures) dans le sang et à étudier leur sensibilité à différents antibiotiques selon le cas.

2 Réalisation du prélèvement

2.1 Le moment du prélèvement

Les prélèvements d'hémocultures doivent être effectués conformément à la prescription médicale et préalablement à toute prescription d'antibiothérapie.

Les échantillons seront prélevés pendant les frissons, c'est-à-dire lorsque la fièvre se déclare.

2.2 Les règles à respecter lors du prélèvement

- Contrôler la date de péremption et l'état des flacons de prélèvement (la couleur doit être claire et non endommagée).

- Homogénéiser juste après la fin du prélèvement.

- Acheminer le prélèvement le plus rapidement possible au laboratoire.

2.3 Nombre de prélèvements à effectuer

Classiquement toute hémoculture comprend une mise en culture en aérobiose et une mise en culture en anaérobiose, en conséquence, on dispose de 2 flacons.

Généralement 2 à 3 hémocultures par 24 heures suffisent pour poser un bon diagnostic bactériologique.

Il est recommandé d'attendre entre 30 à 60 minutes entre 2 prélèvements.

2.3.1 Milieux de culture servant aux prélèvements

2.3.1.1 Types de flacons

De manière générale, et malgré la diversité des flacons sur le marché, les tests sanguins microbiologiques sont réalisés par ensemencement sur des milieux bactériologiques standards, qui tiennent compte de la respiration des micro-organismes.

1. Flacons aérobies

Ces flacons ont une atmosphère oxygénée qui favorise la croissance et la reproduction des bactéries aérobies strictes et aérobies facultatives.

2. Flacons anaérobies

Grâce au bouillon spécial qu'ils contiennent, ces flacons favorisent la croissance de bactéries anaérobies strictes. Un flacon anaérobie doit être inoculé en même temps qu'un site d'infection anaérobie lorsque des foyers anaérobies d'infections sont suspectés.

2.3.1.2 Les systèmes disponibles

➤ Systèmes manuels

Ces différents flacons en verre contiennent un milieu liquide nutritif et sont incubés à 35°C - 37 °C à l'étuve pendant 7 jours en général voir 10 jours.



Figure 3 : flacon du bouillon hémoculture

➤ Systèmes automatisés : BacT/ALERT 3D (**Annexe 1 figure1**)

Ce système réserve des flacons spécifiques de couleurs différentes pour adulte vert en aérobie, orange en anaérobie et d'autres pour enfant (jaune en aérobie) **Figure3**.

Il assure aussi en continu et simultanément la surveillance, l'agitation, et l'incubation, de tous flacons d'hémocultures introduits. Le BacT/ALERT3D permet de détecter plus facilement la croissance bactérienne tout en diminuant le temps d'incubation. La bactérie produit du CO₂, induisant une baisse du pH, qui sera détectée par l'automate à l'aide d'un sensor par réflectométrie.

Les principaux additifs contenus dans ses milieux sont : anticoagulant (inhibe l'activité des agents bactéricides contenus dans le sérum et neutralisation de l'activité de certains antibiotiques), des concentrations du saccharose qui empêche la lyse de certaines bactéries à paroi déficiente, du thiol qui favorise la croissance de certains streptocoques, vitamines : K3, B et l'hémine, utilisées comme facteurs de croissance pour les *Haemophilus*, des résines (utilisées comme inhibiteurs), un atmosphère en pression réduite et du CO₂, utilisés pour favoriser la culture des *Brucella*, *Neisseria*, *Campylobacter*, *Streptococcus*...

2.4 Étiquetage et acheminement

Pour une prise en charge rapide des flacons d'hémoculture, ils doivent être acheminés au laboratoire de bactériologie le plus rapidement possible. Il est important d'étiqueter correctement chaque flacon et de remplir une demande détaillant le prénom, le nom, l'âge, le service hospitalier, la date, l'heure, la méthode de prélèvement et le diagnostic déclaré du patient surtout si le patient est suspecté d'endocardite infectieuse, de brucellose ou de leptospirose, et s'il est sous traitement ou sous antibiothérapie datant de moins de 7 jours. Ces informations cliniques sont importantes pour une gestion optimale des hémocultures.

3 Etude bactériologique

Les Laboratoires de Bactériologie clinique permettent une aide au diagnostic par isolement et identification d'un agent pathogène à partir des échantillons biologiques, mais aussi une aide à la thérapeutique par l'évaluation de la sensibilité des agents pathogènes aux différentes molécules antimicrobiennes.

4 Interprétation d'une hémoculture

Le diagnostic est aisé lorsque plusieurs hémocultures sont positives au même micro-organisme pathogène ou quand la bactérie isolée est un pathogène connu. Cela est plus difficile lorsque seule une hémoculture est positive, en particulier lorsque le micro-organisme isolé est connu comme pouvant être un germe de contamination.

Une hémoculture positive polymicrobienne oriente plutôt vers une contamination du prélèvement, le plus souvent par des bactéries de la flore cutanéomuqueuse (staphylocoque à coagulase négative, *Bacillus spp*, *Corynebacterium spp*, *Propionibacterium spp*, *Micrococcus spp*). Cependant, dans certains cas, une véritable septicémie peut survenir (**Philippon ; Reimer 1979, 1997**).

Une hémoculture négative indique soit l'absence de bactériémie soit une bactériémie non décelable. Une bactériémie est non décelable en cas d'hémocultures réalisées sous antibiothérapie, de bactéries intracellulaires et de bactéries à croissance lente.

Toutefois, l'hémoculture peut être faussement négative par la suite au non-respect des conditions de sa réalisation c'est pour ça il est recommandé de répéter les hémocultures chez les malades et surtout en tenant compte de la clinique (immunodéprimé, pathologie digestive) (**Tattevin,2015**).

1 Définition des antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances antibactériennes d'origine biologique dont les dérivés entièrement synthétiques ou semi synthétiques, capable d'inhiber certaines voies métaboliques des bactéries ou même les détruire sans exercer habituellement un effet toxique sur les organismes supérieurs.

2 La résistance aux antibiotiques

2.1 Définition

Selon la définition du terme microbiologie, un microorganisme est considéré comme "résistant" lorsque sa concentration minimale inhibitrice (CMI) est supérieure à la concentration qui inhibe la croissance de la plupart des autres souches de la même espèce.

Selon la définition clinique, une souche est qualifiée de résistante lorsqu'elle survit à l'antibiothérapie appliquée. De plus, il est important de souligner que dans des conditions in vivo, la résistance ou la sensibilité de la souche à la thérapie antimicrobienne administrée dépendra de divers paramètres tels que l'emplacement de la bactérie, la dose, le mode d'utilisation des antibiotiques, et l'état du système immunitaire de la personne traitée. Parfois, la résistance à un antibiotique entraîne une résistance à un autre, c'est ce qu'on appelle la résistance croisée.

Une fois que la résistance s'est développée chez une ou plusieurs de ces espèces bactériennes, elle peut être transmise à d'autres espèces et contribuer ainsi à son expansion et à sa propagation. En conséquence, les antibiotiques deviennent inefficaces et ne peuvent plus nous traiter contre les infections causées par des bactéries résistantes. (Cyclamed, 2018)

3 Les Types de la résistance aux antibiotiques

3.1 La résistance naturelle

La résistance naturelle est une caractéristique que l'on retrouve dans toutes les souches d'une même espèce. L'absence ou la réduction de sensibilité à un antibiotique peut être due à l'inaccessibilité de la cible pour l'antibiotique, à un manque d'affinité de la cible pour l'antibiotique ou encore à l'absence de la cible. Cette résistance est permanente et d'origine chromosomique. Elle est stable, transmise à la descendance (transmission verticale) lors de la division cellulaire, mais elle n'est généralement pas transférable d'une bactérie à l'autre (transmission horizontale).

3.2 La résistance acquise

La résistance acquise est définie comme une résistance propre à certaines souches de bactéries d'un genre ou d'une espèce particulière,

C'est l'acquisition de nouveaux gènes capables de rendre les bactéries insensibles à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotiques. Ce nouveau gène peut être obtenu par mutation au niveau chromosomique, ce qui est un phénomène rare, ou au niveau extra-chromosomique par transfert d'ADN à partir de plasmides conjugatifs ou de transposons (le mécanisme le plus courant).

4 Mécanismes de la résistance acquise aux antibiotiques

Il existe quatre mécanismes principaux par lesquels les micro-organismes acquièrent une résistance.

- Le mécanisme de résistance le plus courant est la production d'enzymes qui inactivent ou détruisent les antibiotiques. C'est ce qu'on appelle l'inhibition enzymatique.
- Diminution de la perméabilité cellulaire due à une perméabilité altérée des parois ou membranes bactériennes. Cela empêche le médicament d'atteindre sa cible.
- Modifications des sites de liaison ciblés par les antibiotiques. Le résultat est une affinité réduite pour le site d'action de l'antibiotique.

1 L'objectif et lieu, période d'étude

L'objectif de notre étude est d'isoler, identifier les germes qui sont responsables des bactériémies voir les septicémies isolés à partir des hémocultures, établir le profil bactériologique et d'étudier la résistance de ces bactéries aux différents antibiotiques au niveau du laboratoire de Microbiologie médicale du CHU Nedir Mohamed de Tizi-Ouzou.

Durant une période de 3 mois (mars-avril-mai) on a étudié 1323 cas, parmi eux 310 sont trouvés positifs.

Les variables recueillent à la fin de recherches sont :

- Répartition des hémocultures selon la tranche d'âge,
- Répartition des hémocultures par services,
- Résultats globaux des hémocultures,
- Répartition des hémocultures positives selon la tranche d'âge,
- Répartition des hémocultures positives selon la coloration de Gram,
- Répartition des hémocultures positives selon l'espèce.

2 Matériels non biologiques

Le matériel non biologique est représenté par les instruments, les appareillages, les réactifs, les milieux de cultures et les disques d'antibiotiques utilisés.

3 Méthodes

Dans le but d'affirmer la présence de bactéries dans le sang, et de l'impliquer dans une bactériémie, la méthode d'hémoculture est utilisée. Généralement au niveau du laboratoire central du CHU de Tizi-Ouzou, les séries d'hémoculture reçues étaient constituées de deux, trois à quatre flacons voir six en aérobie et anaérobie.

4 Enregistrement des échantillons

Les flacons sont rapidement acheminés au laboratoire puis enregistrés à la réception sur le logiciel IKOLAB en leurs attribuant un code et ils sont immédiatement incubés.

La nature des flacons d'hémocultures utilisés au CHU de Tizi-Ouzou est en fonction de la disponibilité. Deux types de flacons sont utilisés : flacons Bact/Alert 3D ou flacons en verre avec un bouillon citrate.

5 Incubation des flacons

Les flacons sont incubés à 37°C soit classiques qui sont incubés 7 jours voir 10 jours dans une étuve (**Annexe 1 figure 2**) ou des flacons spécifiques en utilisant un automate spécifique

qu'on appelle le Bact/Alert 3D qui est constitué d'une étuve, possède un système d'agitation automatique muni d'un système de lecture optique chaque 10 min qui est capable de détecter automatiquement la poussée des micro-organismes dans le bouillon.

6 Détection de la croissance bactérienne

6.1 Système manuel

La manipulation se fait en présence du bec bunsen et avec le port des gants et masque médical pour éviter toute contamination, le prélèvement de l'échantillon à partir des flacons classiques se fait par ponction aseptique à l'aide d'une seringue stérile.

Deux types de repiquage :

➤ Repiquage suite à l'apparition de signes de positivité (coagulum, dépôt,...) : effectué à la moindre suspicion de culture positive. (**Annexe2 figure 1**).

➤ Repiquage systématique : en l'absence de signe de culture : le J1, J6 et J10 voire au J15 s'il y a la suspicion d'une endocardite infectieuse.

6.2 Système automatisé :

La détection se fait par un système automatique. Les flacons détectés positifs sont déchargés de l'automate pour un examen bactériologique complet.

7 Isolement des bactéries

7.1 Les milieux d'isolement

Le milieu d'isolement d'hémoculture doit être spécifique qui permet la multiplication des micro-organismes exigeants.

7.1.1 Gélose au sang cuit (GSC)

Elle est composée de gélose de base (gélose Mueller –Hinton, ou gélose Columbia), ajouté au moment de l'emploi à la gélose fondue 5 à 10% de sang frais à environ 80°C et le mélanger jusqu'à ce que le milieu devienne chocolat brun, c'est un milieu d'isolement enrichie contient des facteurs de croissance libérés à cette température varié par la présence d'un mélange de peptone, et de l'amidon de maïs neutralisé les substances toxiques libérées par les cultures.

7.1.2 Gélose au sang frais (GSF)

A 45°C, mélanger de manière homogène 5 à 10 % de sang défibriné stérile à une gélose sang base ou à la gélose Muller Hinton, après agitation, en évitant d'inclure des bulles d'air, répartir en boîtes de pétri. Il permet de déterminer les réactions hémolytiques.

7.1.3 Milieux Chapman :

La gélose Chapman ou gélose au sel de mannitol est un milieu sélectif utilisé pour l'isolement, le dénombrement et la différenciation des *Staphylococcus*.

7.1.4 Milieu Sabouraud-Chloramphénicol :

Le milieu gélosé de Sabouraud est un milieu sélectif pour la culture fongique et principalement utilisé pour l'isolement, des levures et de divers autres champignons pathogènes et non pathogènes.

L'ajout d'antibiotiques au milieu acide inhibe les bactéries dans les versions actuellement utilisées.

Les antibiotiques couramment utilisés sont la gentamicine, qui inhibe les bactéries Gram-négatives, et/ou le chloramphénicol, qui inhibe une large gamme de Gram-positifs et de Gram-négatifs.

7.1.5 Gélose Hektoen :

C'est un milieu sélectif permettant l'isolement et la différenciation des entérobactéries. Il repose sur l'utilisation de sels biliaires pour l'inhibition sélective et de deux systèmes indicateurs (système indicateur de pH) :

Le bleu de bromothymol et la fuchsine acide comme indicateurs de la dissimilation des glucides (lactose, saccharose, salicine)

Le fer ferrique comme indicateur de la formation d'hydrogène sulfuré (H₂S) à partir de thiosulfate.

La gélose Hektoen est un milieu différentiel modérément sélectif servant à l'isolement et à la culture de microorganismes entériques à Gram négatif, en particulier à l'isolement des espèces *Shigella* et *Salmonella*.

7.1.6 Gélose Columbia

C'est un milieu très nutritif permettant la culture et l'isolement d'une grande variété de microorganismes.

Depuis que les milieux déshydratés sont devenus disponibles, les 2 types de base de gélose au sang les plus fréquemment utilisés sont l'hydrolysate de caséine ou les milieux d'infusion de viande. Cette gélose combine les vertus de ces deux types de milieu pour donner une performance globale améliorée.

Par addition de sang, d'agents sélectifs ou d'accélérateurs de croissance, il est possible de préparer une grande diversité de milieux adaptés à des utilisations spécifiques.

7.1.7 Gélose Muller Hinton

La gélose Mueller-Hinton est un milieu standardisé recommandé pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries peu exigeantes.

Ce milieu est pauvre en sulfamides, triméthoprimine et inhibiteurs de la tétracycline, et permet une croissance satisfaisante de la plupart des agents pathogènes non exigeants tout en démontrant une reproductibilité d'un lot à l'autre.

7.2 Technique d'ensemencement

C'est l'ensemencement en surface avec la technique des quatre quadrants.

Pour le faire, une goutte du bouillon d'hémoculture prélevée avec une ponction aseptique est étalée à la surface de la GSF et la GSC à l'aide d'une pipette pasteur ou d'une anse en platine sous une hotte à flux laminaire (Post de Sécurité Microbiologique de classe II (PSM) (**Annexe 1 figure3**)) ou en présence du bec Bunsen, puis les boîtes sont incubées dans une jarre puis dans une étuve à 37°C. Pour les anaérobies on réalise la culture sur Muller-Hinton au sang frais et on les mets dans un sachet d'anaérobiose en ajoutant un catalyseur.

8 Identification des bactéries

L'identification précise est réalisée sur toutes les souches isolées.

L'identification est basée sur les caractères morphologiques, cultureux, biochimiques et éventuellement antigéniques.

Plusieurs méthodes d'identification sont utilisées ; les tests rapides d'orientation (oxydase, catalase, coagulase), les galeries API ou les cartes Vitek (bioMérieux) en fonction de la disponibilité des réactifs.

8.1 Aspect macroscopique des colonies

Afin de s'orienter vers la famille de la bactérie, le microbiologiste se base sur l'aspect macroscopique des colonies (taille, pigment, contour, consistance, et relief des colonies).

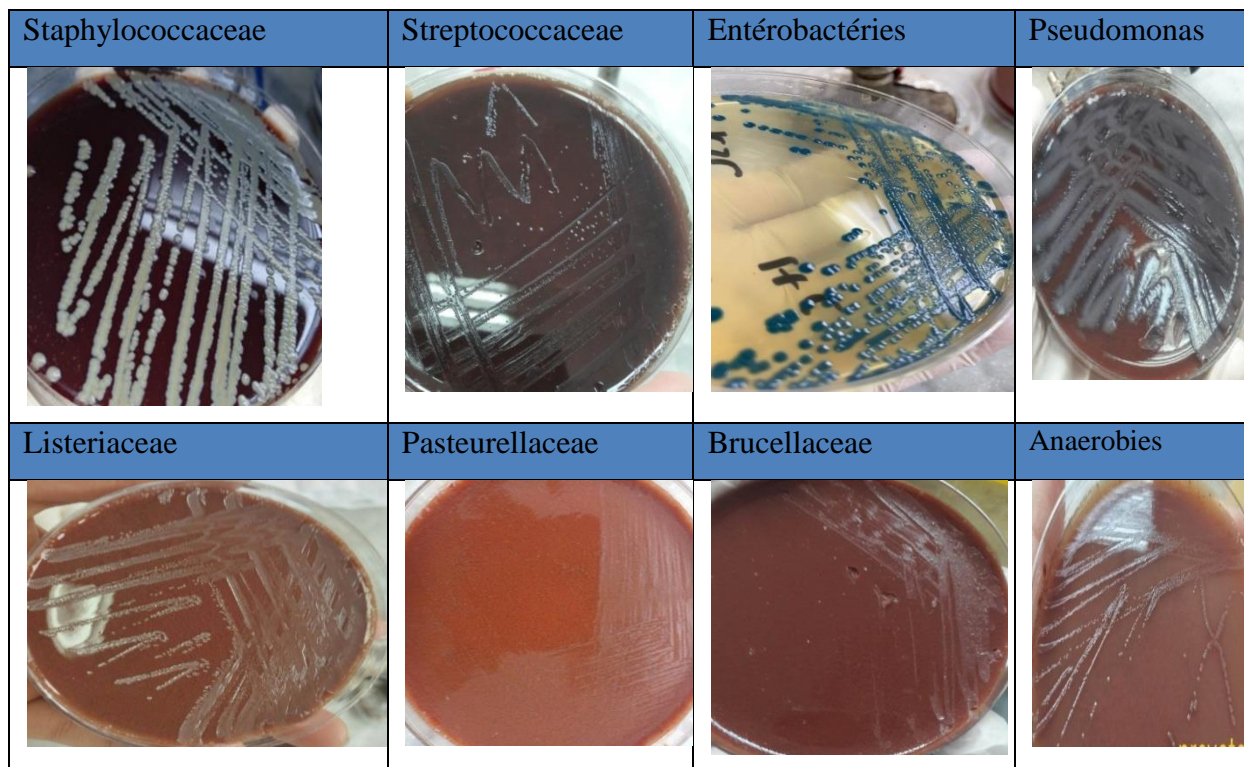


Figure 4: Aspect des colonies des principales familles des bactéries isolées

8.2 Tests d'orientation

Plusieurs tests d'orientation sont réalisés à partir des colonies

8.2.1 Etat frais

L'examen microscopique présente un outil indispensable au laboratoire d'analyse médicale de façon générale et particulièrement dans la bactériologie.

C'est une technique sans fixation ni coloration qui permet de voir la bactérie vivante et d'apprécier sa mobilité, sa morphologie (cocci ou bacille) et son mode de groupement (diplo, amas, chaînette,...)

La préparation se fait soit à partir d'une suspension bactérienne après culture, soit à partir du produit pathologique directement

- **Technique :**
 - Déposer une goutte d'eau stérile sur une lame.
 - A partir d'une culture, prélever une colonie avec une pipette pasteur.
 - Homogénéiser puis déposer une lamelle en dessus de la lame
 - L'observation se fait à l'objectif $\times 40$ avec un diaphragme quasiment fermé pour augmenter le contraste. Il est conseillé d'attendre quelques dizaines de secondes jusqu'à disparition des mouvements liquidiens. (**Annexe 3 figure1**)

8.2.2 Test de catalase :

Ce test consiste à mettre en contact la colonie avec le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Si elle possède la catalase, elle dégrade le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la formation de bulles.

Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram +

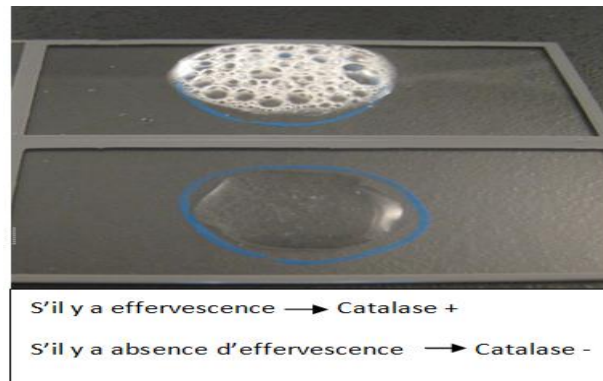
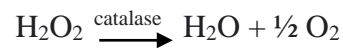


Figure 5: Technique de recherche de la catalase

8.2.3 Test de l'oxydase :

C'est un test de détection de l'enzyme cytochrome oxydase chez les bactéries Gram négative qui produisent cette enzyme. Il consiste à déposer la colonie sur le disque d'oxydase.

Les Disques Oxydase (OX) sont des disques de papier absorbant imprégnés de N,N,N',N'-Tetraméthyl-p-phenylene diaminedihydrochloride. En présence de cette enzyme, le N,N,N',N'-Tetraméthyl-p-phenylenediaminedihydrochloride (incolore) forme un composé coloré en bleu.

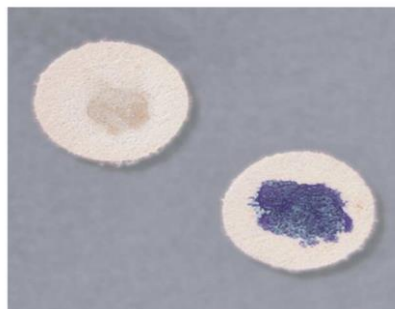


Figure 6: Technique de l'oxydase

8.2.4 Test de la coagulase :

Ce test est réalisé pour les staphylocoques.

Dans un tube d'hémolyse on met une quantité du plasma et une autre du bouillon BHIB ou BGT avec la colonie à tester.

- **Lecture :**
 - Un test positif : formation d'un coagulum lié à la transformation du fibrinogène en fibrine, spécifique à *S. aureus*.
 - Un test négatif : pas de coagulation, bactérie définie en tant que staphylocoque à coagulase négative (SCN)

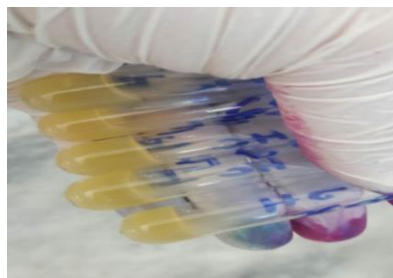


Figure 7: Des tests de coagulase positifs.

8.2.5 Coloration de Gram

C'est la coloration différentielle microbiologique la plus importante et la plus largement utilisée, elle permet de différencier les bactéries selon 2 principaux critères : leur forme et leur affinité pour les colorants :

- ✓ **Forme** : Paires, Tétrades, Groupes, Chaînes, Lancettes...
- ✓ **Affinité pour les colorants** : Gram positif ou Gram négatif
 - Mode opératoire :
 - ✓ Réalisation du frottis : sur une lame on dépose une goutte de l'eau distillée stérile on ajoute la souche à colorer et on étale, puis le sécher à l'air et le fixer à la chaleur.
 - ✓ Inondation du frottis avec le réactif de coloration violet de Gentian pendant 1 minute.
 - ✓ Rinçage de la lame.
 - ✓ Inondation du frottis avec le fixateur Lugol pendant 1 minute puis rinçage.
 - ✓ Décoloration du frottis avec de l'alcool 30 secondes puis rinçage.
 - ✓ Coloration du frottis avec de la Fuschine phénique 1minute puis rinçage et séchage.
 - ✓ Observez les résultats de la procédure de coloration sous immersion dans l'huile.

✓ Examiner au microscope, objectif x100. (**Annexe 3 figure 2**)

À la fin, les bactéries à Gram négatif tacheront le rose / rouge et les bactéries à Gram positif tacheront le bleu / violet.

8.3 Identification biochimique

L'identification bactérienne constitue une étape importante dans le diagnostic microbiologique d'une infection. L'identification doit être à la fois fiable et rapide. L'identification bactérienne peut être réalisée à l'aide de méthodes phénotypiques, immunologiques et/ou moléculaires.

8.3.1 Galeries biochimiques classiques (macro-galeries)

Les méthodes phénotypiques sont les plus anciennes et reposent le plus souvent sur des tests biochimiques comme des tests de fermentation des glucides, des tests enzymatiques ou des tests de croissance en milieu minimum dans des tubes.

8.3.1.1 Test de l'uréase

Les bactéries possèdent de l'uréase transforment l'urée en carbone d'ammonium. Le test se fait sur milieu urée. Quelques colonies sontensemencées dans un tube à hémolyse contenant le milieu urée et incubées pendant 24 heures à 37°C.

On considère le test positif si une couleur rouge violacé apparaît suite à l'hydrolyse de l'urée et formation de carbone d'ammonium.

8.3.1.2 Test de citrate de Simmons

La gélose citrate de Simmons est un milieu de culture pour la différenciation des bactéries Gram-négatives sur la base de l'utilisation du citrate. Le milieu teste la capacité des organismes à utiliser le citrate comme la seule source de carbone.

La pente estensemencée par une strie longitudinale, réalisée à l'anse, à partir d'une suspension de la culture solide en eau distillée stérile.



Figure 8: Citrate de Simmons (Sur la gauche : négatif ; sur la droite : positif)

- ⇒ Virage de l'indicateur de pH au bleu : il y a eu alcalinisation du milieu et la souche est citrate de Simmons +.
- ⇒ Pas de virage de l'indicateur de pH : il n'y a pas eu alcalinisation et le milieu ne présente pas de culture. La souche est citrate de Simmons -.

8.3.1.3 Le test Clark et Lubs :

Ce milieu permet l'étude de la voie de fermentation du glucose.

Il est également appelé milieu RM-VP, Rouge de Methyl (RM) ou Voges-Proskauer (VP).

En milieu stérile, il faut rajouter 2-3 gouttes de suspension bactérienne à analyser puis laisser incuber de 24 à 48 heures à la température 37°C.

La révélation du test VP se fait en ajoutant 2 gouttes de base forte (soude ou potasse) et d' α -naphthol au milieu en laissant le milieu oxygéné. Si le milieu se colore en rouge, la souche est VP+. Sinon, la souche est VP-.

8.3.1.4 Le test TSI

La Triple SugarIron Agar contient trois glucides (glucose, lactose et saccharose).

Cette gélose est utilisée pour l'identification basée sur la fermentation du glucose, du lactose, du saccharose et sur la production de gaz et d' H_2S .

A l'aide d'une pipette on réalise des stries sur la pente et une piqure centrale dans le culot

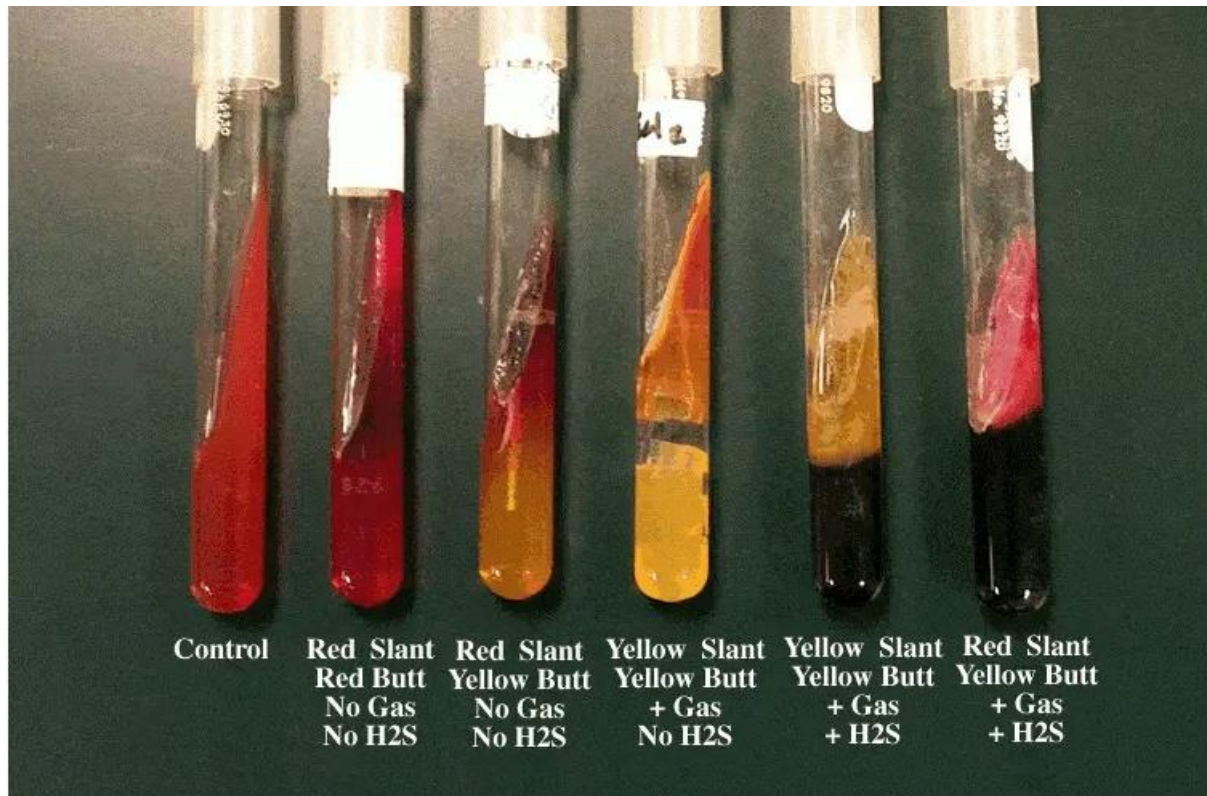


Figure 9: l'interprétation du TSI

⇒ L'interprétation :

1- Si la bactérie n'utilise que le glucose : le culot devient jaune et la pente rouge

La bactérie métabolise rapidement le glucose, donnant initialement une pente acide et un culot acide (acide sur acide A/A) avec production du pyruvate. Après une incubation plus poussée (18 heures), le glucose sera consommé, et comme les bactéries ne peuvent pas utiliser le lactose et le saccharose, les peptones (acides aminés) seront utilisées comme source d'énergie aérobie (la pente) ce qui provoque la libération d'ammoniac (NH_3) augmentant le pH, faisant virer l'indicateur de pH, le phénol rouge, du jaune au rouge (alcalin sur acide k/A).

2- Si la bactérie utilise le glucose, saccharose et /ou lactose : le culot et la pente devenant jaunes.

Après consommation du glucose, la bactérie poursuit la consommation du saccharose et /ou du lactose donnant une pente jaune et un culot jaune (acide sur acide (A/A)). NB : Si on incube le milieu plus longtemps, plus de 48 heures, le lactose et le sucrose seront épuisés, et là il reviendra à un pH alcalin en raison du métabolisme des peptones.

3- Si la bactérie n'utilise aucun des sucres : Dans ce cas la bactérie consommera les peptones

- Si la bactérie peut métaboliser les peptones à la fois en aérobiose et en anaérobiose, la pente et le culot seront rouges (alcaline sur alcalin ; K/K).

- Si les peptones ne peuvent être métabolisées qu'en aérobiose, la pente sera rouge et le culot ne présentera aucun changement (K/NC)

4- Production de gaz

La production de gaz (CO₂ et O₂) est détectée par la division (décollement) de la gélose

5- production H₂S

Le précipité noir indique que les bactéries ont été capables de produire du sulfure d'hydrogène (H₂S) à partir du thiosulfate de sodium. Comme le H₂S est incolore, le citrate d'ammonium ferrique est utilisé comme indicateur de formation de sulfure ferreux insoluble. La formation de H₂S nécessite un environnement acide ; ceci veut dire que même si la couleur du culot ne peut pas être vue à cause du noircissement du milieu, la bactérie est glucose (+) car s'il n'y avait pas consommation de glucose et acidification du milieu la formation de l'H₂S ne pourrait pas avoir lieu.

8.3.2 Galeries API (micro-galeries)

C'est une galerie miniaturisée et standardisée de tests biochimiques utilisée dans le but de caractériser et d'identifier précisément une bactérie à l'aide d'une série de tests biochimiques. (**Annexe 3 figure3**)

La galerie API se présente sous la forme d'une série de petits tubes appelés tubules, chacun correspondant à un test biochimique spécifique. Chaque tube est ouvert à son sommet avec une ouverture de puits (cupules) et peut ou non être rempli de liquide pour adapter le tube à des conditions spécifiques. Chaque tube contient un substrat défini (ONPG, ADH, GEL...) auquel les micro-organismes réagissent différemment.

- **Technique :**

Préparation de la galerie :

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation
- Ouvrir une ampoule de Suspension Medium (ou un tube d'eau distillée stérile)
- Prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé
- Réaliser une suspension bactérienne faible (opacité 0,5 sur l'échelle Mc Farland)

Inoculation de la galerie :

Le remplissage se fait en posant la pipette contre la paroi de la cupule, il est important de veiller à ne pas créer de bulles lors de l'inoculation qui pourraient fausser le résultat. De plus l'apparition de bulles après incubation apportera un caractère d'identification supplémentaire (GAZ+)

On remplit les tubules et les cupules des tests du type CIT .En ce qui concerne les tests du type ADH, on remplit les tubules et les cupules avec de l'huile de paraffine / vaseline pour créer l'anaérobiose. Pour le reste des tests on remplit uniquement les tubules.

➤ API 20E :

L'API 20 E est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif fastidieux, comporte 21 microtubes contenant des substrats déshydratés (20 tests biochimiques). Après incubation, les réactions produites se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

➤ API 20NE :

C'est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (ex. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc...) contenant 20 tests biochimiques, combinant 8 tests conventionnels inoculés avec une suspension bactérienne saline, et 12 tests d'assimilation inoculé avec la suspension bactérienne saline mélangée au medium (milieu minimum).

➤ API Staph :

C'est un système standardisé pour l'identification des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Kocuria*, elle comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans APIStaph Medium qui reconstitue les tests.

➤ API Strept :

C'est un système standardisé associant 20 tests biochimiques. Il permet de faire un diagnostic de groupe ou d'espèce pour la plupart des streptocoques, entérocoques. Elle comporte 20 microtubes contenant les substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activités enzymatiques ou de fermentation de sucres. Les tests de fermentation sont inoculés avec un milieu enrichi (contenant un indicateur de pH) qui réhydrate les sucres.

➤ API A20 :

Le système API A20 permet de rechercher rapidement et facilement 21 caractères pour l'identification biochimique des bactéries anaérobies. La galerie API 20 A comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. L'inoculation de la galerie se fait avec le medium ensemencé.

➤ API NH :

API NH est un système standardisé pour l'identification des *Neisseria*, *Haemophilus*.

La galerie API NH comporte 10 microtubes contenant des substrats déshydratés, pour réaliser 12 tests d'identification (réactions enzymatiques ou fermentations de sucres), ainsi que la recherche d'une pénicillinase (notamment chez *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Moraxella catarrhalis* (*Branhamella catarrhalis*) et *Neisseria gonorrhoea*.

• La lecture des API :

Après incubation en aérobiose à 37°C, pendant 24h, quelques tests nécessitent l'ajout de réactifs pour révéler le résultat. La lecture de la galerie se fait par comparaison des couleurs obtenues aux couleurs définissant le résultat positif ou négatif, Nous obtenons un code dit « Profil Numérique » qu'on introduit dans l'Api Web qui nous donne l'espèce correspondante au code introduit. (Lagha., 2015)

8.4 Tests particuliers**8.4.1 Test d'agglutination (Staphaurex)**

Staphaurex est une procédure rapide d'agglutination pour la différenciation des staphylocoques possédant la coagulase et/ou la protéine A. (en particulier *Staphylococcus aureus*, des staphylocoques ne possédant aucun de ces facteurs).

Il a été démontré que les cultures de *S. aureus* possédant le facteur d'agglutination et la protéine A pouvaient être identifiées à l'aide de particules de latex recouvertes de plasma humain qui s'agglutinent dans un test rapide. Le réactif Staphaurex contient des particules de latex au polystyrène qui ont été recouvertes de fibrinogène et d'IgG. S'il est mélangé avec une suspension d'organismes de *S. aureus*, la réaction du facteur d'agglutination avec le fibrinogène et/ou celle de la protéine A avec l'IgG provoque une agglutination rapide et forte des particules de latex.

Ce test consiste à mettre en contact une colonie de staphylocoques avec une goutte de ce réactif sur une plaque spéciale fournie avec le kit accompagné d'une agitation par mouvements de rotation des suspensions de latex puis on interprète le résultat comme ceci :

La lecture est faite dans les 30 secondes suivant l'homogénéisation du réactif avec la colonie.

- Le test est positif : S'il ya agglutination des cellules bactériennes, *S. aureus* confirmé.
- Le test est négatif : si aucune agglutination ne se forme.

8.4.2 Test de Satellitisme

La plupart des souches d'*Haemophilus* spp ne poussent pas sur la gélose au sang frais, qui contient de l'hémine (facteur X) mais manque de NAD (facteur V).

Haemophilus influenzae utilise le facteur X pour produire des enzymes respiratoires essentielles comme les cytochromes, les catalases et les peroxydases. Le facteur V est utilisé comme vecteur d'électrons dans le système d'oxydation-réduction de l'organisme.

Le staphylocoque doré produit la NAD comme sous-produit métabolique lorsqu'il pousse dans un milieu de culture contenant du sang. Par conséquent, *Haemophilus* spp peut croître sur la gélose au sang de mouton très près des colonies de *Staphylococcus aureus* (car il produit le facteur NAD), ce phénomène est connu sous le nom de Satellitisme.

On mélange des colonies suspectes d'*Haemophilus* dans 2 ml de solution saline stérile. À l'aide d'un écouvillon stérile, on inocule la suspension de l'organisme sur une boîte de gélose au sang frais (GSF) puis on réalise un trait une culture pure de *S. aureus* sur la boîte inoculée. Après incubation dans la jarre puis l'étuve à 37°C on détecte la croissance des colonies satellites.

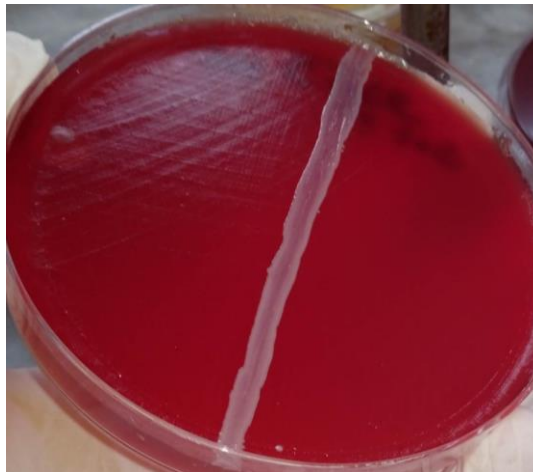


Figure 10: Test de Satellitisme

8.4.3 Camp test

C'est un test qui met en évidence la Co-hémolyse entre *Staphylococcus aureus* et *Listéria monocytogène*. Cette hémolyse des hématies exaltées par la présence d'une toxine staphylococcique.

Ce test est réalisé ainsi :

- Faire une strie de *Staphylococcus aureus* .

- Faire des stries de la souche à tester d'une façon perpendiculaire à la strie de *S.aureus*.
- Incuber 24h en aérobiose.
- Lecture : un Camp-test positif se traduit par l'observation d'un croissant d'hémolyse franche à bords nets entre le disque et la strie du streptocoque ou dans la zone d'intersection des deux stries ce qui donne l'image en pèle (**Annexe 3 figure4**).

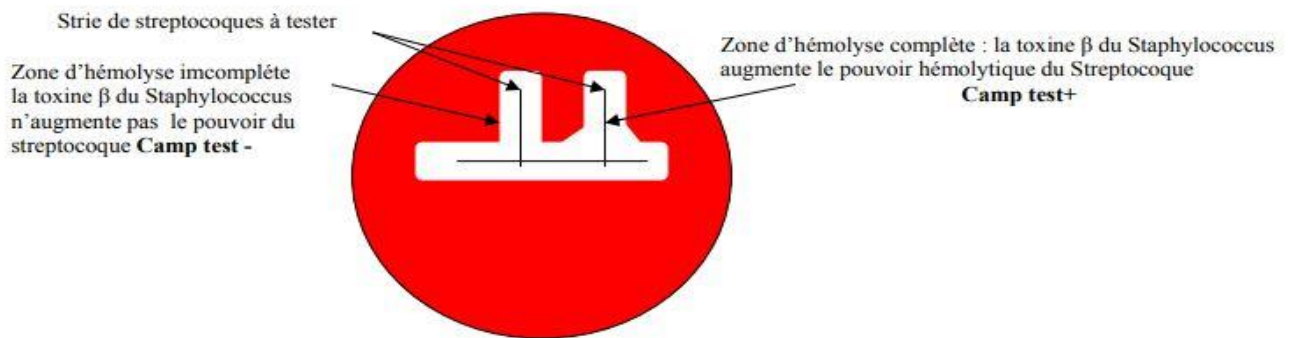


Figure 11: L'interprétation du Camp-Test

8.4.4 Agglutinations salmonelle (sérogroupe)

C'est une technique immunologique consistant en la détection d'antigènes structuraux bactériens, permettant le diagnostic de sérogroupe ou sérotypes.

Une technique de lame est utilisée pour le sérogroupe de *Salmonella*.

Après avoir vérifié que la souche n'est pas auto-agglutinable en mettant en suspension une colonie dans une goutte d'eau distillé des bactéries prélevées sur des colonies sont directement mises en suspension dans 1 goutte d'immun-sérum. Le sérogroupe repose sur la recherche d'antigènes communs à de nombreux BGN.

L'identification biochimique préalable des souches à tester est obligatoire. (**Larcher., 2016**)

On recherchera le groupe d'appartenance à l'antigène O seulement.

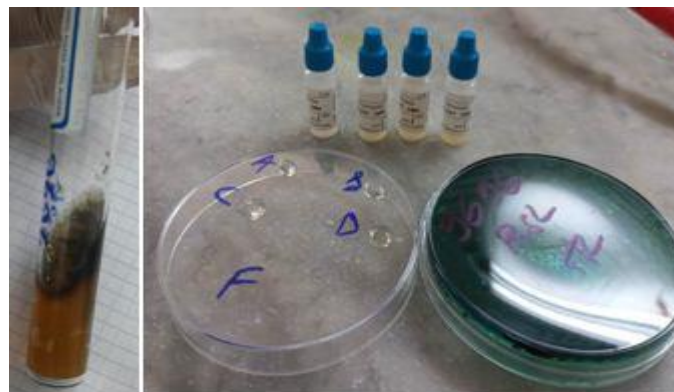


Figure 12: Test d'agglutination Salmonella

8.4.5 Test de sensibilité à l'Optochine

Utilisé afin de différencier entre *Streptococcus pneumoniae* qui est sensible à l'optochine, et les autres Streptocoques résistants à cet antibiotique.

- **Technique :**

Une boîte de gélose au sang frais est inoculée avec le germe isolé. On dépose un disque imprégné de 5µg d'Optochine. Après incubation à 37°C pendant 18 heures, on recherche l'existence ou l'absence d'une zone d'inhibition.

- **La lecture :**

Pour les pneumocoques, on observe une zone d'inhibition supérieure à 12mm.

Les autres streptocoques : absence de la zone d'inhibition.

8.4.6 Sérogroupage des streptocoques

L'identification des streptocoques repose sur la détermination de leur groupe, par des réactions immunologiques. Ce groupage est basé sur la recherche d'antigènes polysaccharidiques de paroi : le polyside C.

Après extraction enzymatique, le polyside C des Streptocoques est mis en évidence par l'agglutination de particules de latex sensibilisées par des immunoglobulines de lapin spécifiques de groupe.

- **Technique :**

- A partir d'une gélose Columbia au sang, prélever 2 à 3 colonies et les émulsionner dans 0,4 ml d'enzyme d'extraction (pronase).
- Incuber 10 à 15 min à 37°C
- Effectuer le groupage sur lame en mettant en contact une goutte de l'extrait préparé avec une goutte de chaque latex correspondant aux groupes suspectés. Réaliser parallèlement un témoin négatif dans de l'eau distillée.
- Agiter par rotation

- **Résultats :**

Lire le témoin et noter si une agglutination franche apparaît en moins de 30 s, significative de l'appartenance au groupe correspondant.

8.4.7 Test de synergie

Permettant de détecter une Béta-lactamase à spectre élargi (BLSE), qui est une enzyme entraînant une diminution de l'activité des céphalosporines de 3ème génération (C3G), et des

monobactames, généralement recherchée chez les souches isolées des entérobactéries, *Pseudomonas* et *Acinetobacter*.

- **Technique**

Ce test se fait pour les entérobactéries, dans les conditions standards de l'antibiogramme en déposant un disque d'amoxicilline+acide clavulanique (AMC 20/10µg) à 30mm centre a centre d'un disque de C3G (cefotaxime : CTX 30µg). Pour les *Pseudomonas* et *Acinetobacter*, il se fait en déposant un disque de ticarcilline+ acide clavulanique (TCC 75/10µg) à 30mm d'un disque de C3G : ceftazidime (CAZ 30µg) ou aztreonam (ATM 30 µg).

- **Lecture :**

Elle se fait après 24h d'incubation à 37°C, en notant la production d'enzyme qui peut se traduire par l'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre les disques. (Annexe 3 figure 5)

8.4.8 Test de filamentation

C'est un test pour l'identification des levures dans lequel on réalise un ensemencement du sérum à partir de colonies suspectes et on incube à 37°C durant 2h, puis on effectue un état frais afin de rechercher les bourgeonnements de *Candida albicans*.

8.5 Antibiogramme

Technique de diffusion des disques sur milieu solide.

La technique utilisée pour tester la sensibilité aux antibiotiques, est celle de diffusion des disques sur milieu solide.

Les antibiotiques testés étaient choisis pour chaque famille suivant la septième édition de la standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale.

- **Technique :**

Milieu : La gélose Mueller-Hinton (MH) est employée lors de la méthode de diffusion en gélose pour les bactéries autres que celles exigeantes et à croissance lente.

L'épaisseur de la gélose doit être de 4 mm ± 0,5 mm (approximativement 25 ml pour une boîte de 90 mm de diamètre). La surface de la gélose doit être séchée avant emploi.

Inoculum : Une suspension bactérienne en solution salée est réalisée à partir d'une culture visible, pure et jeune, par la mise en suspension les colonies avec une pipette pasteur stérile ou un écouvillon en coton jusqu'à atteindre une densité de 0,5 McFarland mesurée par le densitomètre.

Insemencement et dépôt de disque : l'insemencement se fait à l'aide d'écouvillon stérile qu'on trempe dans la suspension et qu'on essore sur les parois du tube avec des mouvements rotatoires avant de le décharger en stries condensées sur toute la surface du milieu solide, de haut en bas trois fois en faisant tourner la boîte de 60° à chaque fois, et finir l'insemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Les disques d'antibiotique de 6 mm, sont fermement déposés à la surface de la gélose inoculée et séchée, et une fois déposés ne peuvent pas être déplacés car la diffusion des antibiotiques est très rapide.

Lecture et interprétation des zones d'inhibition : la lecture peut être effectuée après 16 à 24h d'incubation en atmosphère aérobie ou aérobie enrichi en CO₂ pour les bactéries exigeantes, à une température de 37°C. Les diamètres sont mesurés au millimètre le plus proche avec un pied à coulisse, et interprétés par référence aux tableaux de CASFM 2022 où figurent les valeurs critiques permettant de catégoriser la souche en tant que Sensible, Intermédiaire ou Résistante (**Rahal et al., 2014**).

8.6 Technique de CMI (E-Test)

Pour certaines souches la sensibilité envers un antibiotique ne peut être testée que par détermination de concentration minimale inhibitrice (CMI), par exemple le cas des Béta-lactamines pour *Streptococcus pneumoniae* (la Céfotaxime, Ampicilline, Imipénème). La CMI était déterminée par E-Test.

- **Technique :**

Les critères du milieu, de l'inoculum et de la technique de l'insemencement sont similaires à ceux de la méthode de diffusion des disques sur milieu solide. Prélever la bandelette à l'aide de pinces bactériologiques préalablement flambées au bec Bunsen, puis la déposer délicatement sur la surface gélosée, en commençant par l'extrémité correspondant aux concentrations les plus faibles de l'antibiotique testé puis en progressant jusqu'aux concentrations les plus élevées, en évitant la formation de bulles d'air entre la gélose et la bandelette, une fois appliquée la bandelette ne peut pas être déplacée.

- **Lecture :**

Elle se fait à l'œil nu après 18-24h d'incubation en atmosphère requise, et la CMI correspond à la graduation, située à la jonction entre l'ellipse et la bandelette E-test. Les valeurs lues sont interprétées en les comparant aux valeurs critiques, permettant de classer la souche dans la catégorie Sensible, Intermédiaire ou Résistante. (**Annexe3 figure 6,7,8**) (**Rahal et al., 2014**).

8.7 Identification bactérienne par les méthodes automatisées

Une évolution des supports de tests biochimiques a consisté en un couplage avec un automate réalisant l'ensemencement des supports des tests biochimiques et la lecture associée à un logiciel d'interprétation.

Le Vitek2 utilise des cartes plastiques renfermant des microcupules (carte Gram+/Gram-, carte anaérobies /corynébactéries, *Neisseria/Haemophilus*), contenant un substrat spécifique déshydraté. Le choix des cartes s'établit sur la base de la coloration de Gram et des tests d'orientation. Les cartes d'identification bactérienne (GP, GN, NH, ANC) sont séparées des cartes d'antibiogrammes sur le système Vitek (**Annexe 1 figure 4**) (**Claudine.,2016**)

Préparation de l'inoculum et sa distribution :

- ✓ Dans des tubes spéciaux à l'appareil Vitek, on remplit ces derniers avec 3CC de la solution saline.
- ✓ On prélève avec une pipette pasteur la souche à identifier et on réalise une suspension de 0.4-0.6 Mc Farland.
- ✓ On dépose la carte nécessaire d'identification ou d'antibiogramme.

Pour la carte GP :

Pour l'identification on utilise le tube à 3ml mais pour l'antibiogramme 3ml de la solution saline additionné 290µl de tube l'identification prélevé avec une micropipette.

Pour la carte GN :

Pour l'identification on utilise le tube à 3ml mais pour l'antibiogramme 3ml de la solution saline additionné 145µl de tube l'identification prélevé avec une micropipette.

Manipulation de l'appareil :

On dépose le portoir qui contient les tubes et les cartes dans l'appareil

- ✓ Remplissage de cartes.
- ✓ Sellage : les cartes seront coupées dedans.
- ✓ Enregistrement des patients avec des codes qui sont été attribués.
- ✓ Lecture et interprétation des résultats.

L'interprétation des tests est automatisée. L'appareil compare le profil obtenu de la souche inconnue avec ceux de sa banque de données. Les résultats test par test sont également disponibles, permettant parfois de les utiliser pour les comparer avec la littérature. Un test positif est toujours plus pertinent qu'un test négatif qui peut résulter d'une croissance ou d'une

« activité » faible de la souche. Les résultats sont exprimés soit en excellente (96 à 99% de probabilité), très bonne (93 à 95%), bonne identification (89 à 92%) et identification acceptable (85 à 88%). **(Riegel., 2016)**

III. Résultats et Discussions

1 Caractéristiques de la population étudiée

Au cours de la période d'étude, le nombre de patients pour lesquels une bactériémie était suspectée, et une hémoculture était effectuée au niveau du laboratoire de Microbiologie était de 1323 patients, hospitalisés dans les divers services du CHU Nedir Mohammed de Tizi-Ouzou, ainsi que certains hospitalisés dans les autres périphéries.

1.1 Répartition des hémocultures selon l'âge

La population d'étude est répartie entre adulte 48% et enfant avec un pourcentage de 50% Et 2% de patient avec tranche d'âge non identifiée.

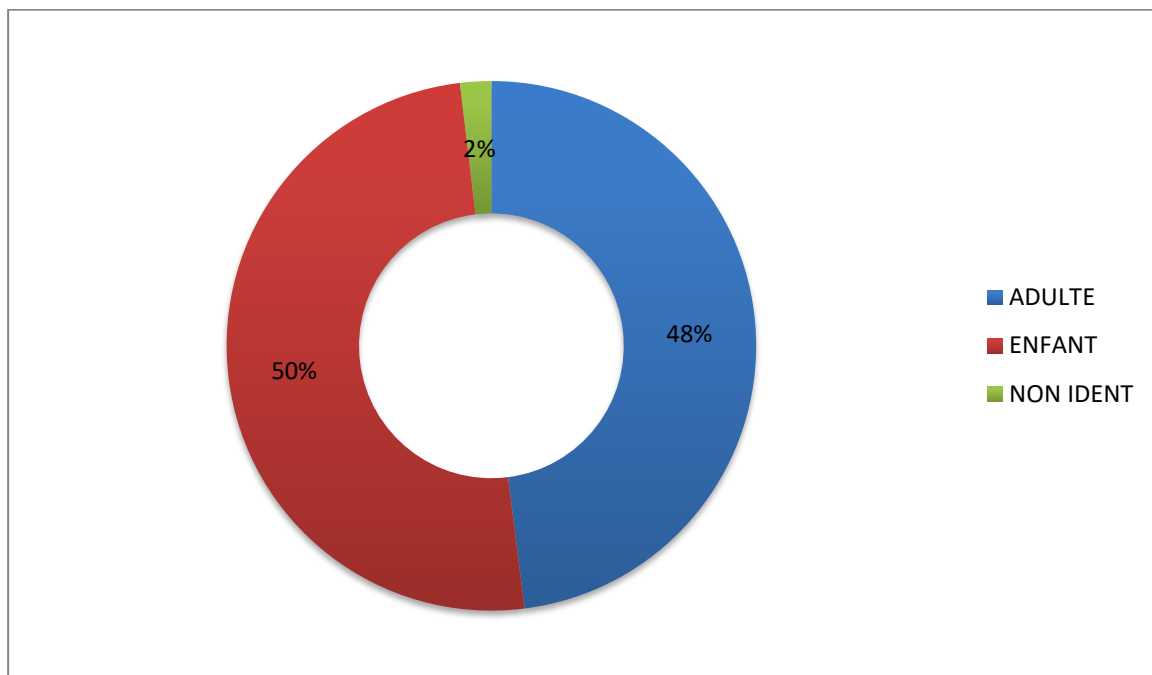


Figure 13: Répartition des hémocultures selon la tranche d'âge

1.2 Répartition des hémocultures par services

La fréquence des demandes d'examen d'hémocultures varie selon le service. La majorité des prélèvements provenait principalement de trois services qui sont le pavillon d'urgences pédiatriques (259 prélèvements), maladies infectieuses (180 prélèvements) et le pavillon d'urgences médicales (147 prélèvements). A partir du service de néonatalogie, de pavillon d'urgences de néonatalogie, d'hématologie, de la réanimation médicale et de l'hématologie pédiatrique (121prélèvements), (115prélèvements), (92 prélèvements), (71 prélèvements) et (55 prélèvements) des hémocultures ont été reçues respectivement. Le reste des services n'ont envoyé que quelques prélèvements.

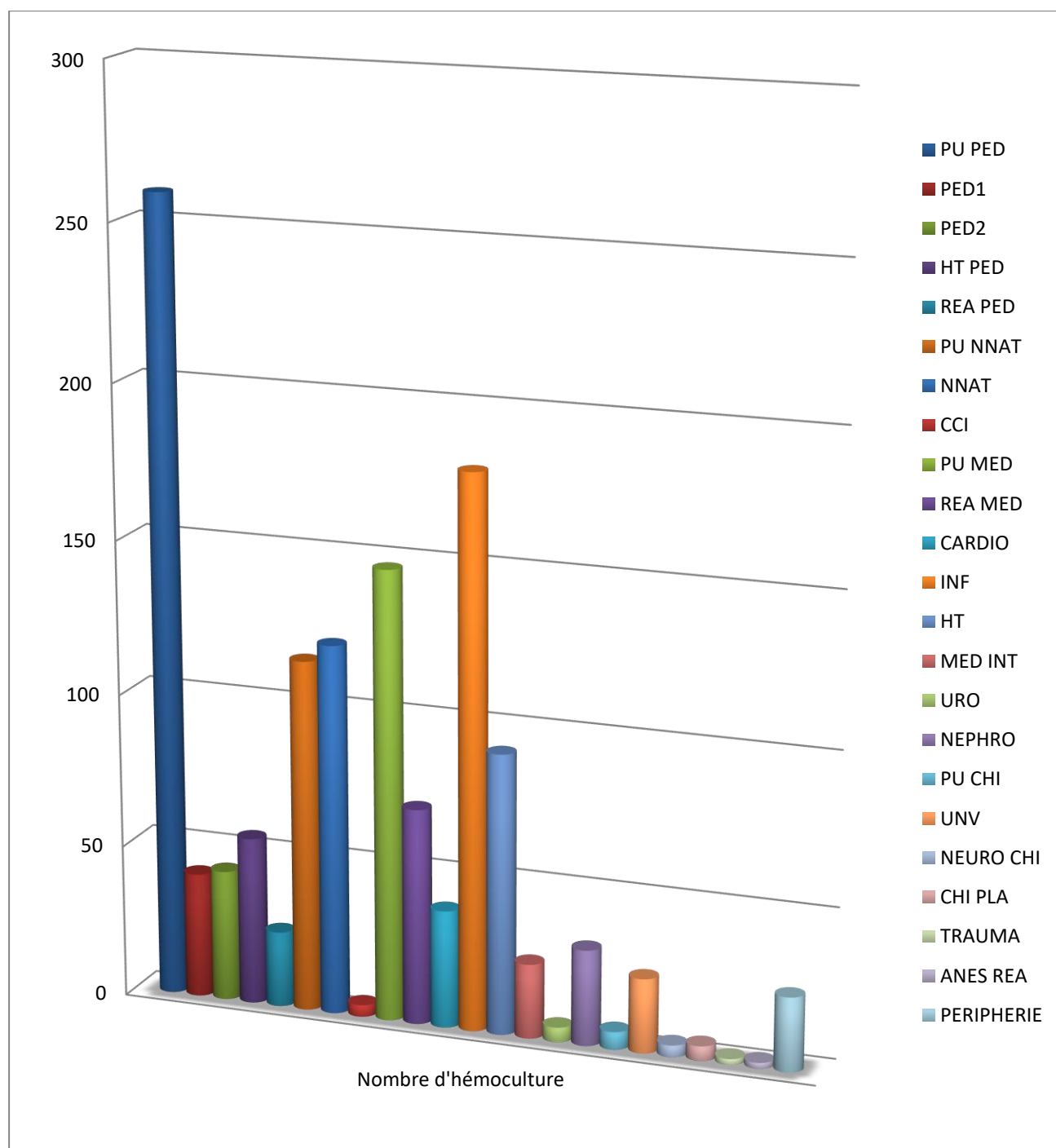


Figure 14: Répartition des hémocultures par services

1.3 Résultats globaux des hémocultures

Parmi les 1323 hémocultures réalisées pendant la période de l'étude, 310 se sont avérées positives dont les contaminants probables et la flore bactérienne polymorphe ; soit un taux de positivité de 23,43%, et 1013 (76,57%) étaient négatives.

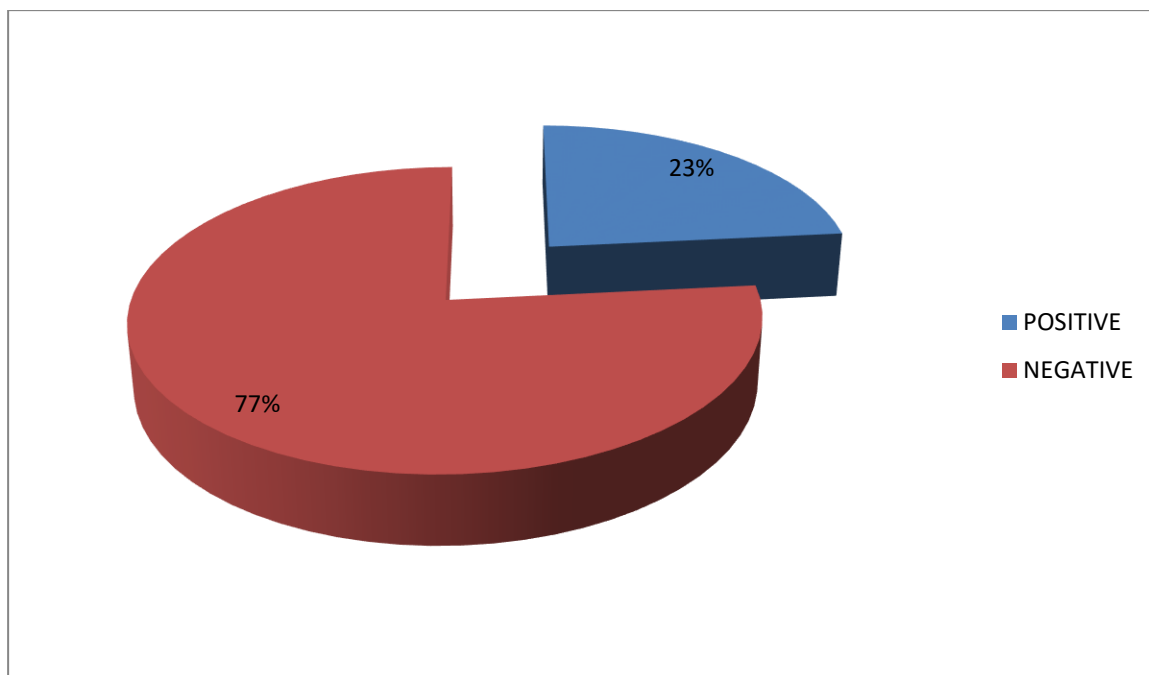


Figure 15: Répartition des hémocultures globale

Les hémocultures ont permis d'isoler 310 souches bactériennes, dont 105 considérées en tant que contaminant, et 205 à signification cliniques.

1.4 Répartition des hémocultures positives selon la tranche d'âge

La prévalence la plus élevée des bactériémies était celle retrouvée chez les adultes avec un taux de 69%, et 31% chez enfants.

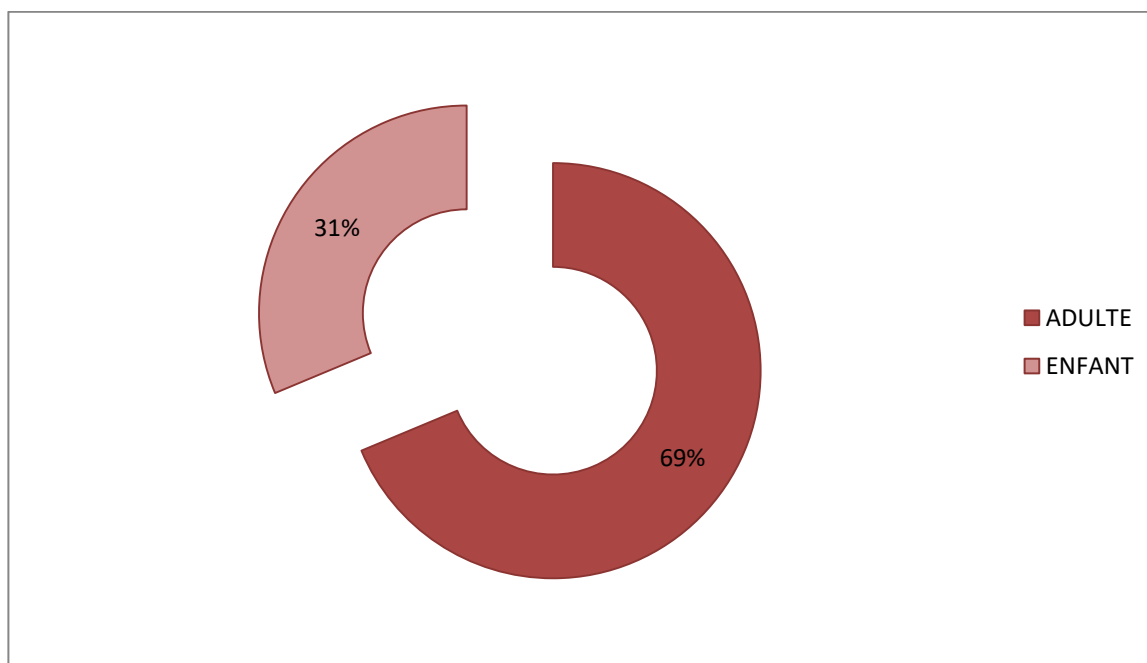


Figure 16: Répartition de l'hémoculture positive selon la tranche d'âge

1.5 Répartition des hémocultures positives par services

Les prélèvements d'hémoculture reçus au niveau du laboratoire de Microbiologie, provenaient des différents services du CHU Tizi-Ouzou (22 services), et de quelques périphéries de Tizi-Ouzou (CHU unité Belloua, EPH Azeffoun, EPH Tizirt, Sbihi, CAC). Le nombre le plus élevé d'hémocultures positives appartenait aux patients hospitalisés au niveau des deux services de maladies infectieuses et celui des urgences médicales, qui ont un taux de positivité de 13,5% suivis respectivement de service de la réanimation médicale (13,2%), de néonatalogie (9,6%), et de l'hématologie avec un taux de 9,03%.

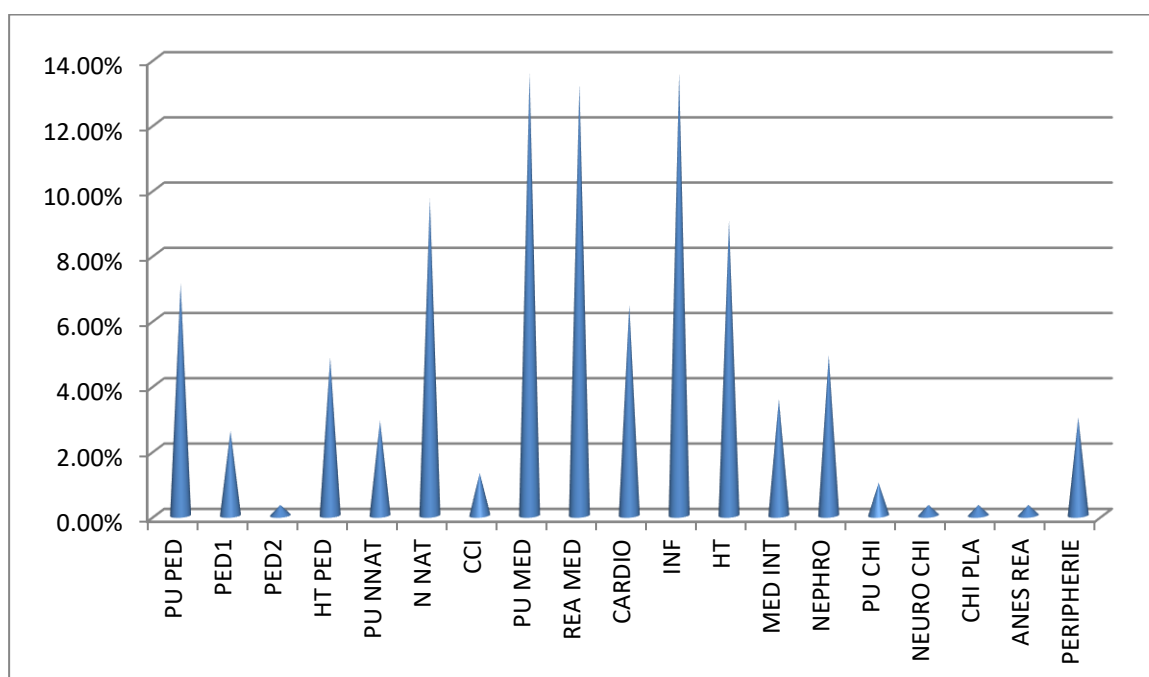


Figure 17: Répartition des hémocultures positives par service

2 Profil bactériologique des bactériémies

2.1 Répartition des bactéries isolées selon la coloration de Gram

Les résultats illustrés dans la figure 6 indiquent que 58% du total des isolats sont des bactéries à Gram positif alors que 40% sont des bactéries à Gram négatif, et 2% des levures.

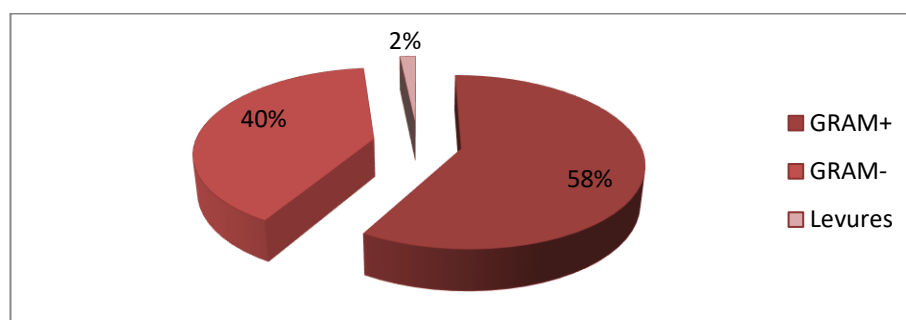


Figure 18: Répartition des hémocultures positives selon la coloration de Gram

2.2 Répartition des bactéries isolées selon l'espèce bactérienne

D'après les résultats de la répartition globale des différentes espèces isolées, nous avons observé que des staphylococques à coagulase négative représentent les souches les plus isolées avec un taux de (32%), suivis des entérobactéries 28% puis de *Staphylococcus aureus* (12%), suivis respectivement de *Acinitobacter baumannii* (6%), *Enterococcus* (5%), *Pseudomonas aeruginosa* (5%) *Streptococcus* (4%), *Brucella* (2%) , *Candida* (2%), Anaérobies (2%) *Listeria* (1%) et une souche de *Heamophilus parainfluenza*.

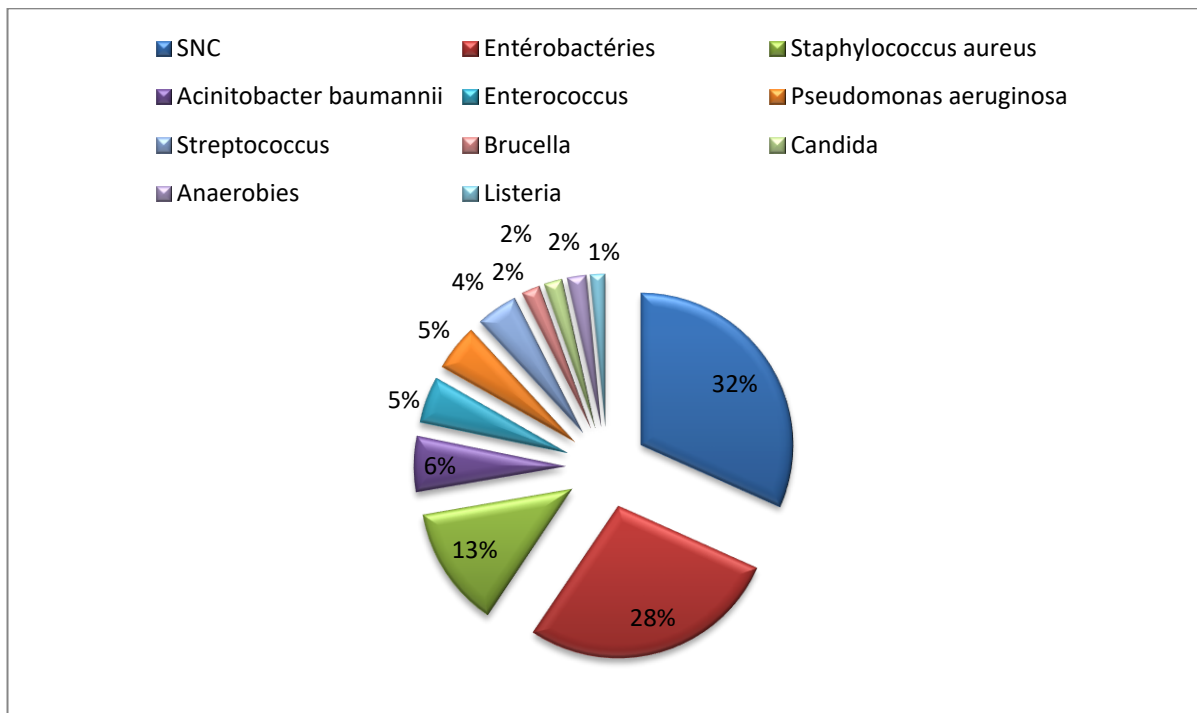


Figure 19: Répartitions des hémocultures positives selon les genres et espèces

3 Résultats des antibiogrammes

Les résultats de l'antibiogramme de différentes espèces identifiées ont été exprimés par la lecture de diamètre d'inhibition et les introduire dans le logiciel WHONET.

Les souches ne sont pas toutes testées vis-à-vis des antibiotiques, c'est selon la disponibilité des ATB.

3.1 Profil de résistance des entérobactéries

Le profil de résistance des 56 souches isolées : *Klebsiella pneumoniae* (41%), *E.coli* (34%), *Serratia* (18%), *Salmonella* (4%), *Proteus* (4%) constituant le groupe des entérobactéries a montré une variabilité du comportement vis-à-vis des ATB testés.

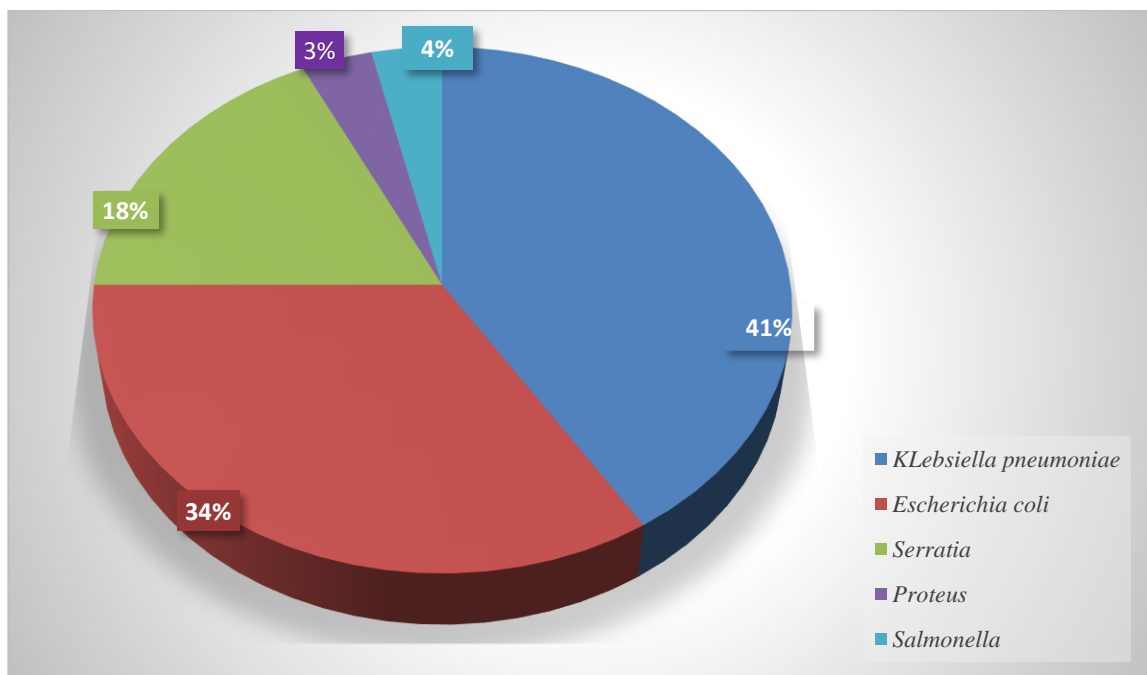


Figure 20: Répartitions des entérobactéries selon l'espèce

3.1.1 *Escherichia coli*

Les isolats d'*E.coli* qui sont testés à L'Imipenème (IPM), à la Gentamycine (GEN), et à la Colistine (COL) ont montré une sensibilité totale.

Les souches d'*E.coli* ont manifesté une résistance modérée à la Cefazoline (CFZ) 47,37% et à l'Amoxicilline (AMX) 31,58%.

10% des souches isolées sont productrices des Béta-lactamases à spectre élargi (BLSE+)

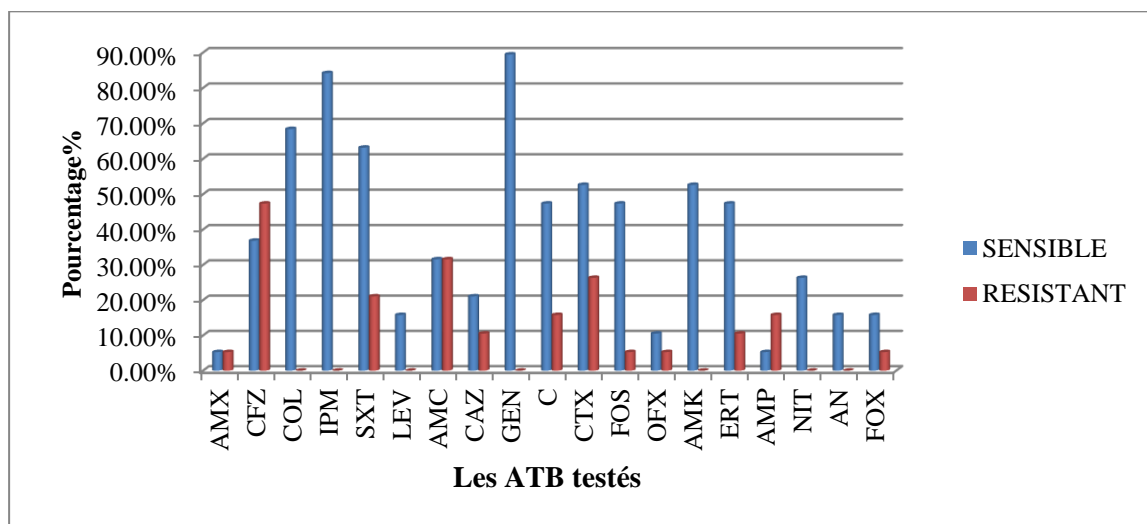


Figure 21: Le comportement des isolats d'*E.coli* vis-à-vis des ATB testés

3.1.2 *Klebsiella pneumoniae*

Les souches de *Klebsiella pneumoniae* testés à la Colistine ont montré une sensibilité totale, une sensibilité modérée à l'Imipénème (IPM) 66,22% et à la Ciprofloxacine (CIP) 56,52% et une résistance accrue à la Ticarcylène (TIC).

8% de ces isolats sont BLSE+ et 8% d'autres sont productrices des carbapénèmases (CARBA+)

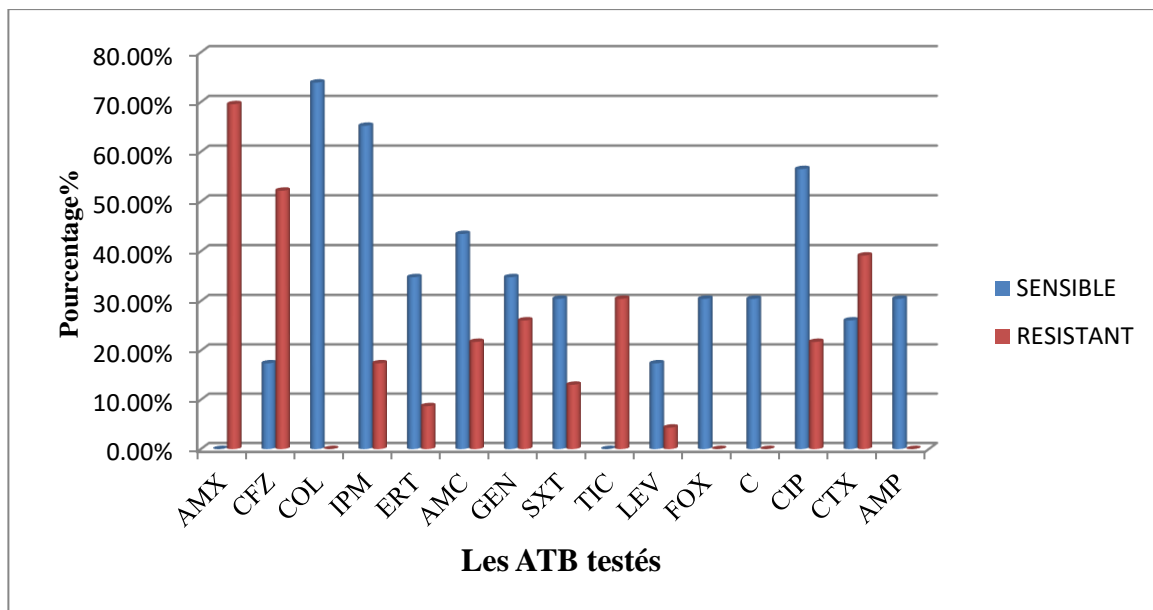


Figure 22: Le comportement de *Klebsiella pneumoniae* vis-à-vis des ATB testés

3.1.3 *Serratia*

60% des souches isolées sont des *Serratia marcescens*

Les isolats qui sont testés à l'Amoxicilline (AMX), à la Céfazoline (CFZ) et à la Colistine (COL) sont totalement résistants, et ceux qui sont testés à l'Imipénème (IPM) ont montré une sensibilité totale.

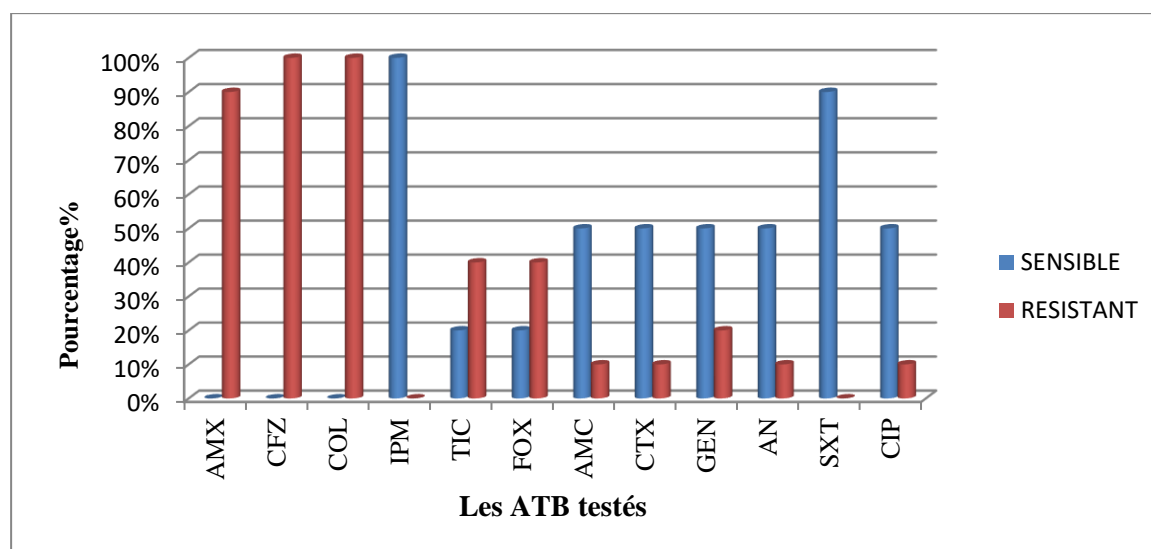


Figure 23: Le comportement des souches de *Serratia* vis-à-vis des ATB testés

3.1.4 *Proteus*

Les 2 souches de *Proteus* isolés sont à 100% résistantes à l'Amoxicilline (AMX), à la Céfazoline (CFZ) et à la Colistine (COL). Ils ont marqué une sensibilité totale à la Céfotaxime (CTX) et à l'Imeipenème (IPM).

L'une des souches c'est *Proteus mirabilis* sensible à la Triméthoprine + Sulfaméthoxazole (SXT) contrairement à *Proteus spp* qui est sensible

3.1.5 *Salmonella*

Les 2 souches isolées ont le même profil

Tableau 2: Profil bactériologique des isolats de *Salmonella*

AMK	AMC	CTX	GEN	OFX	AMX	CFZ	COL	IPM	FOX
R	S	S	R	S	S	R	S	S	R
R	S	S	R	S	S	R	S	S	R

3.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Une sensibilité des souches de *Pseudomonas aeruginosa* pour lesquelles ces ATB ont été testé : la Tobramycine (TOB), la Netilmicine (NET), la Colostine (COL), la Ciprofloxacine (CIP), l'Impèneme (IPM) et la Ceftazidine (CAZ).

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont montré une forte résistance à la Ticarcyline (TIC) 80%, et à la Ticarcyline + l'Acide Clavulanique (TCC) 70%

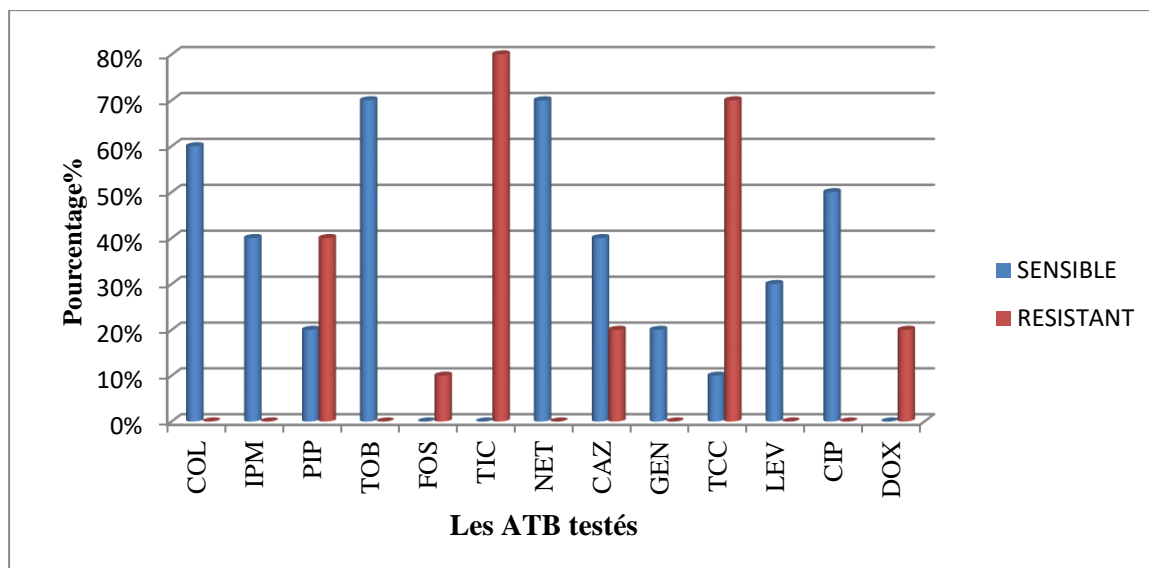


Figure 24: Le comportement des souches de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis des ATB testés

3.3 *Acinetobacter baumannii*

Les isolats d'*Acinetobacter baumannii* ont manifesté une résistance importante à la plupart des antibiotiques testés : 83,3% (Pipéracilline, Imipénème), 75% (Ticarcline + Acide Clavulanique) ainsi que la Ceftazidime, 66,7% (Ciprofloxacine, Tobramycine, et Ticarcilline). 83,3% des isolats ont montré une sensibilité accrue à la Colistine (COL).

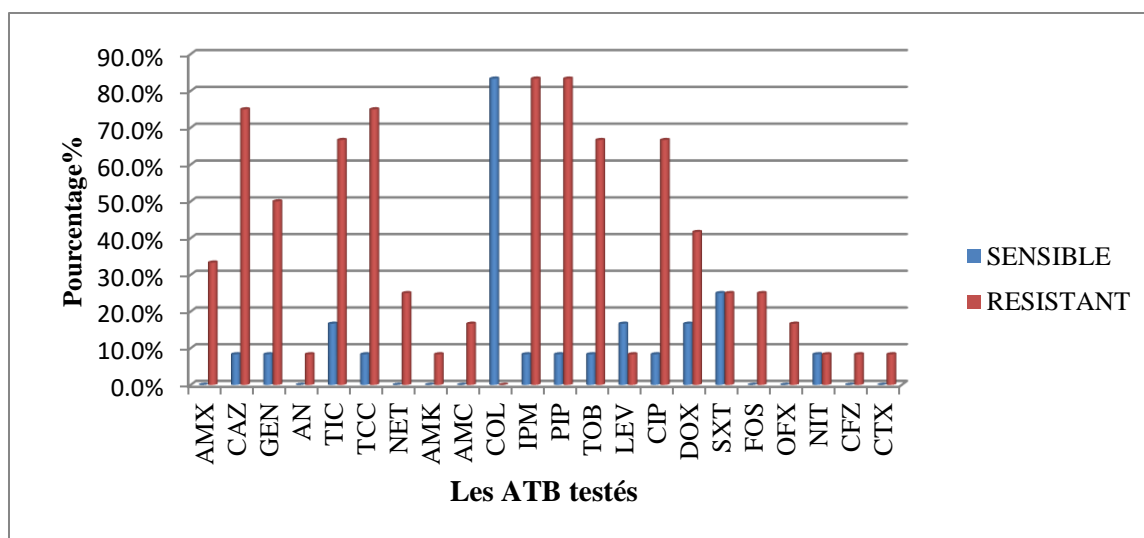


Figure 25: Le comportement des souches d'*Acinetobacter baumannii* vis-à-vis des ATB testés.

3.4 *Staphylococcus aureus*

Le profil de résistance des souches isolées de *Staphylococcus aureus*

Les nombres des isolats sensibles les plus élevés ont été enregistrés pour les ATB à savoir : la Vancomycine (88,46%), suivis de la Teicoplanine (80,77%), la Pristinamycine (57,69%).

D'après nos résultats on signale une résistance élevée à la Pénicilline G (53,85%), à l'Erythromycine (34,62%), l'Oxacilline (30,77%), à la Kanamycine (26,92%).

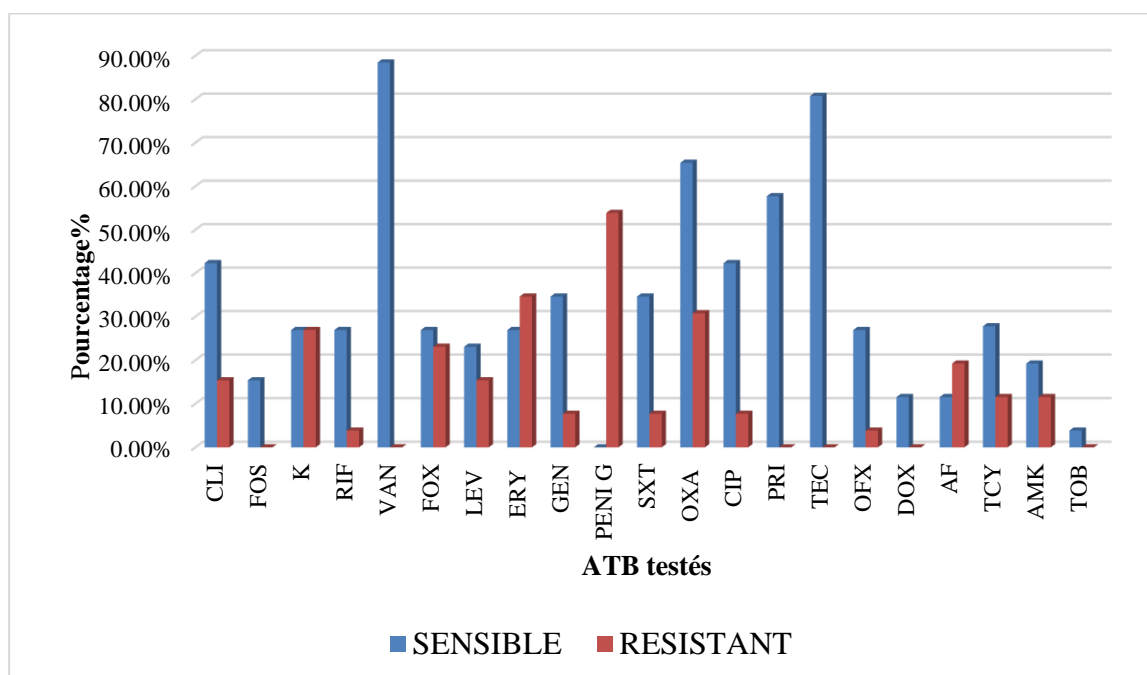


Figure 26: Le comportement des souches de *Staphylococcus* vis-à-vis des ATB testés

3.5 *Staphylococcus* à coagulase négative

Le profil de résistance des souches isolées : *Staphylococcus* à coagulase négative, *S.xylosus*, *S.hominis*, *S.heamoliticus*, *S.saprophyticus* et *S.simulans* dont les contaminants probables ont montré une variabilité du comportement vis-à-vis des ATB testés.

Les nombres des isolats sensibles les plus élevés ont été enregistrés pour les ATB à savoir : la TEC (87,18%), la VAN (79,49%), la PRI (74,36%)

D'après nos résultats on signale une résistance élevée à l'OXA (64,10%), suivi du même taux de résistance pour la Kanamycine ainsi que l'ERY (43,59%).

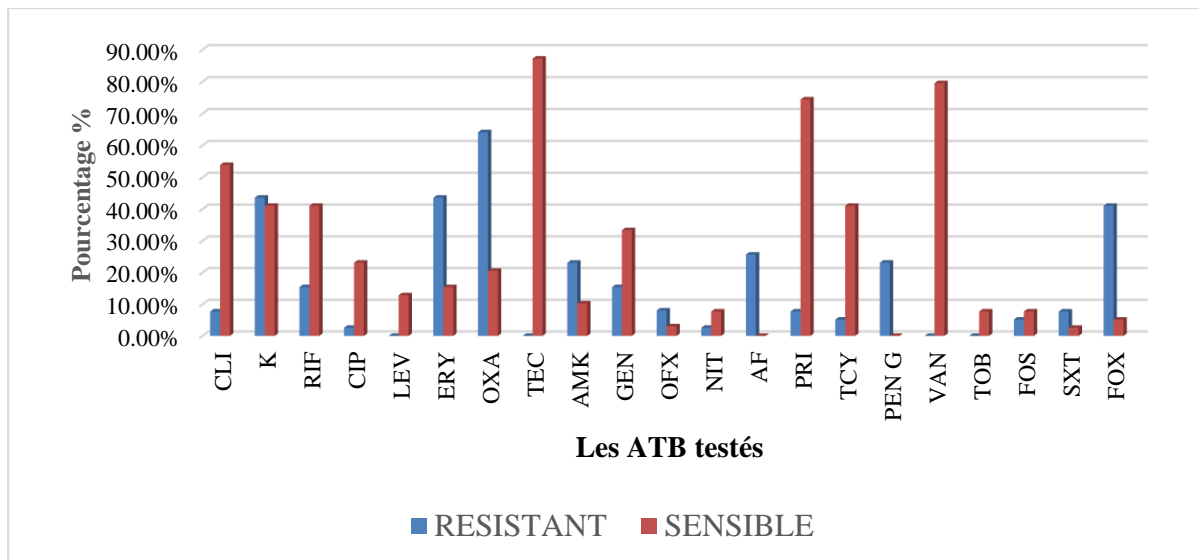


Figure 27: Le comportement des souches *Staphylococcus* à coagulasse négative (SCN) vis-à-vis des ATB testés

3.6 Enterococcus

Le profil de résistance des souches isolées : *E.faecalis*, *E.cloacae*, *Enterococcus* spp et *E.faecium* ont montré une variabilité du comportement vis-à-vis des ATB testés.

Les nombres des isolats sensibles les plus élevés ont été enregistrés pour les ATB à savoir : la Teicoplanine (TEC) 55% suivi de la Ciprofloxacine (CIP) 44% et la Levofloxacine (LEV) 33%.

D'après nos résultats on signale une résistance élevée à la Clindamycine 44%, à Triméthoprine + Sulfanéthoxazole (SXT) 33% et à la Gentamycine (GEN) 22%.

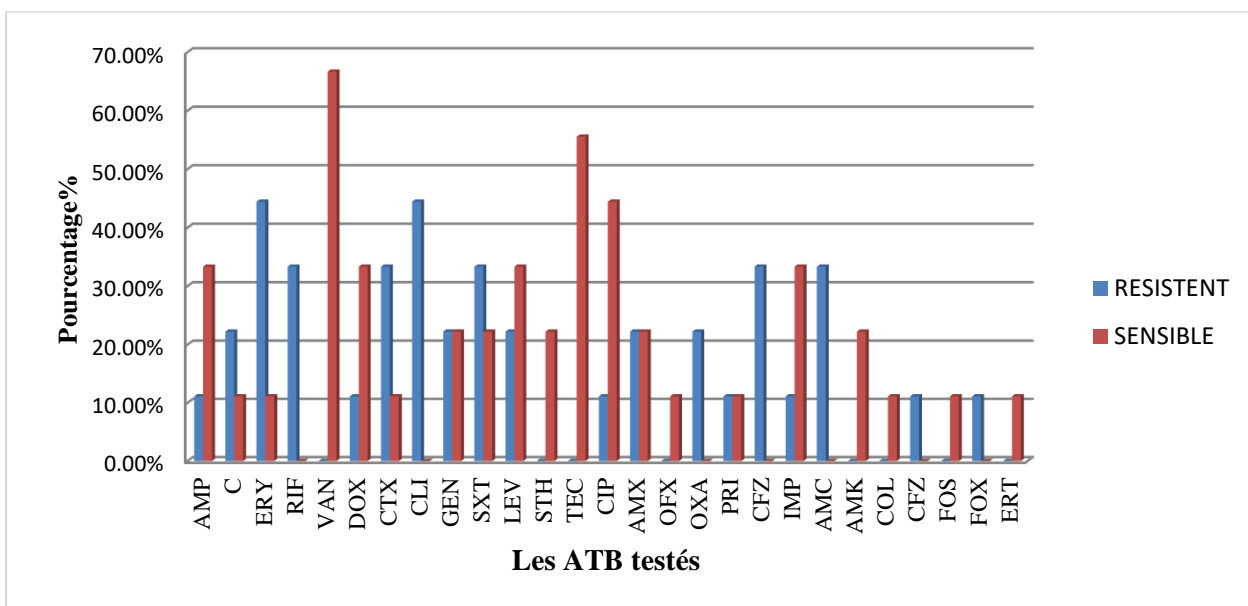


Figure 28 : Le comportement des souches *Enterococcus* vis-à-vis des ATB testés

3.7 Streptococcus

Les isolats de *Streptococcus* marquent une sensibilité accrue à la Teicoplanine (TEC), et à la Vancomycine (VAN), et une sensibilité modérée à la Streptomycine Haute (STH), à l'Amoxicilline (AMX) et à la Gentamycine (GEN) avec un taux de 55,6%.

Aucun isolat résistant à la Teicoplanine (TEC) et à la Vancomycine (VAN).

On a une souche de *Streptococcus pneumoniae* qui est sensible à l'Optochine et à tous les ATB testés sauf à la Céfotaxime (CTX), et à la Tétracycline (TCY).

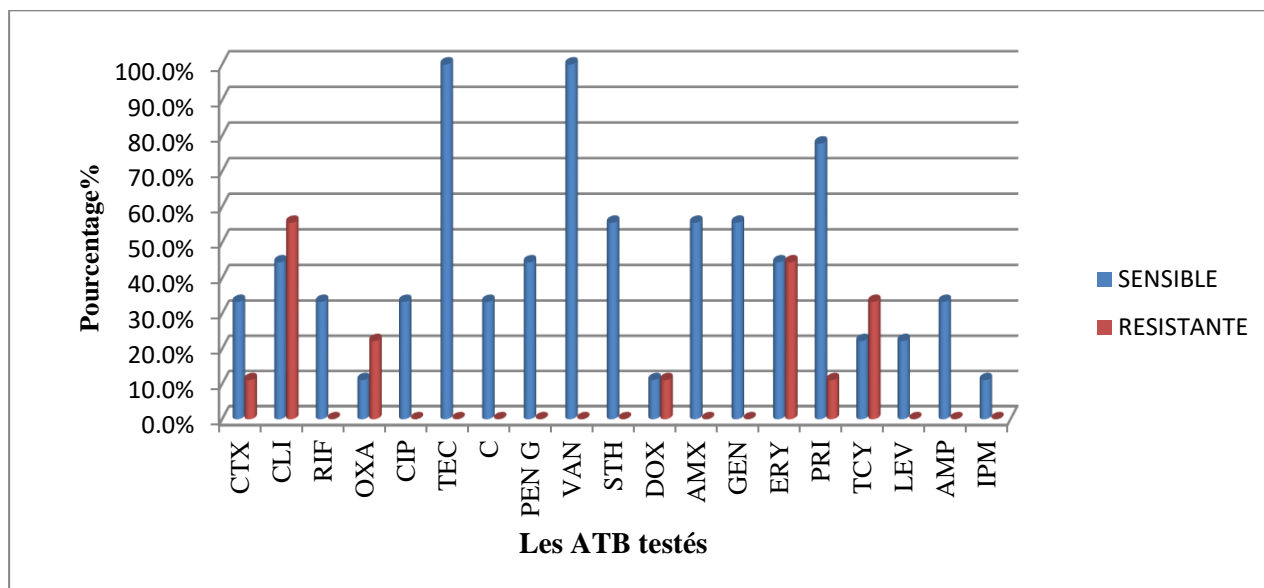


Figure 29: Le comportement des isolats de *Streptococcus* vis-à-vis des ATB testés

3.8 Listeria

On a isolés trois souches qui ont montré une sensibilité accrue à l'Ampicilline (AMP), à la Triméthoprime + Sulfaméthoxazole (SXT), et à la Penicilline G (PEN G) et une résistance avec un taux de 100% à la Fosfomycine (FOS) et à la Céfotaxime (CTX).

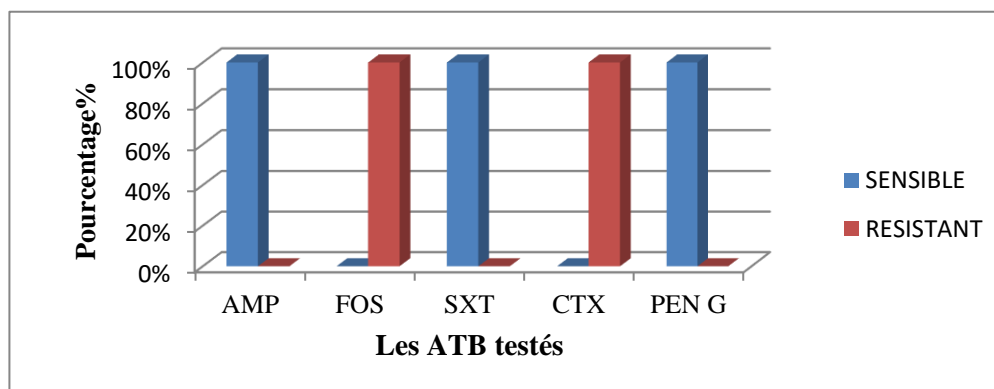


Figure 30: Le comportement des isolats de *Listeria* vis-à-vis des ATB testés

3.9 *Haemophilus parainfluenza*

On a isolé une seule souche qui est sensible à tous les ATB testés.

Tableau 3: Comportement de *H.parainfluenza* vis-à-vis des ATB testés

AMC	CTX	LEV	AMP	AZT	DOX
S	S	S	S	S	S

3.10 *Candida*

Après avoir suspecté la présence des levures dans la culture on réalise un ensemencement sur le milieu Sabouraud Chloramphénicol. Après l'obtention des colonies qui signifient la présence de ces levures et là on effectue un test de filamentation (TF) qui nous oriente.

On a eu 3 *Candida* spp et 1 *Candida albicans*

3.11 *Brucella*

L'obtention de colonies après 24h ou 48h d'incubation, qui oriente vers *Brucella*. La coloration de Gram permet d'observer de petits coccobacilles très courts à Gram négatif. Une recherche d'une uréase sur un milieu urée-indole est effectuée.

L'identification biochimique par galerie miniaturisée API, ainsi que l'antibiogramme ont été réalisés, au niveau du laboratoire de l'institut Pasteur d'Alger.

3.12 Les anaérobies

Après l'obtention des colonies sur la culture réalisée en anaérobiose après incubation 3 à 5 jours on réalise l'identification du genre sur VITEK.

On a eu 4 souches du genre *Prevotella*.

L'identification biochimique par micro-galerie API et l'antibiogramme sont réalisés au niveau de l'institut Pasteur d'Alger.

Discussions

Les hémocultures sont un test important pour diagnostiquer les infections bactériennes. Cependant, le pourcentage de résultats positifs était d'environ 23 %, en raison de la difficulté à détecter la bactériémie, qui est fortement associée à de très faibles concentrations de micro-organismes dans le sang. Parallèlement, les contaminations sont très fréquentes, principalement dues à la flore cutanée ou aux bactéries de la sphère ORL, du fait de la diversité des prélèvements et des défauts dans le respect des règles de stérilité et du transport rapide vers le laboratoire.

Dans notre étude prospective qui a été réalisée au niveau du laboratoire de Microbiologie du CHU Nedir Mohamed de Tizi-Ouzou, sur une période de trois mois, un taux de positivité enregistré de 23% ce qui correspond à 310 d'hémocultures positives qui est supérieur aux résultats de **Chikiken** et **Moussouni 2022**.

Les bactériémies sont plus fréquentes dans certains services de soin, en l'occurrence au service des maladies infectieuses, le pavillon des urgences médicales avec un taux de 13.55%, et 13,22% au service de la réanimation médicale. La prédominance des hémocultures positives dans le service de réanimation médicale. Ceci peut être lié à plusieurs facteurs, dont l'exposition aux agents pathogènes, l'état du système immunitaire, l'alimentation parentérale, le sondage vésical, le cathétérisme, la ventilation mécanique et l'antibio-prophylaxie dans ce service.

D'après les résultats qu'on a pu recueillir durant notre stage, on remarque une prédominance des bactéries Gram positif par rapport aux bactéries Gram négatif ; des résultats pareils avec ceux de **Chikiken** et **Moussouni 2022** au CHU de T.O, et différents de ceux de **Aiche 2022** au CHU de T.O où le pourcentage des bactéries Gram – (66%) est supérieur à celui des bactéries Gram+ (34%).

Les études menées par **Chikiken** et **Moussouni 2022** au CHU de T.O ont rapporté la prédominance des staphylocoques avec un taux de 30,72% puis les entérobactéries avec un taux de 23,57%. Cependant, les travaux réalisés par **Aiche 2022** au CHU de T.O ont trouvé la prédominance des entérobactéries avec un taux de 49,8%, ce qui est proche des résultats de **Chakvetadze et al., 2020** en Géorgie dont la prédominance a été enregistré avec un taux de 59%.

Les souches d'*E.coli* pour lesquelles la Colistine et la Gentamycine ainsi que l'Imipenème ont été testés ont présenté une sensibilité totale, ce qui est similaire aux résultats rapportés par **Aiche 2022** au CHU de T.O et même aux résultats de **Ben mesbah 2019** au CHU de Blida.

Le peptidoglycane est la pièce maitresse de la bactérie *E.coli* ; c'est une bactérie Gram négatif donc elle possède une couche mince de ce peptidoglycane. Les carbapénèmes et les aminosides ont une forte action sur la synthèse de ce dernier ; ce qui explique sa sensibilité à la Gentamycine et l'Imipenème. La sensibilité à la Colistine est expliquée par l'action des polymyxines sur l'enveloppe membranaire. (**Mohammedi., 2023**)

Ainsi une sensibilité complète des souches testées à la Levofloxacin ce qui confirme sa sensibilité naturelle aux Fluoroquinolones qui agissent sur les acides nucléiques donc bloquent la synthèse des protéines selon l'AARN 2015.

Le taux de résistance le plus élevé pour ces isolats est noté pour la Céfazoline 47,37%, ce qui concorde avec les résultats de **Chikiken et Moussouni 2022** au CHU de T.O.

Le faible taux de résistance est marqué pour l'Ampicilline ; elle agit comme un inhibiteur irréversible de la transpeptidase ; une enzyme indispensable aux bactéries pour la synthèse de leurs parois cellulaires. Elle inhibe la troisième et dernière étape de la synthèse de la paroi bactérienne et conduit à la lyse cellulaire.

Selon les résultats de **Benmesbah 2019** aucune souche d'*E.coli* n'est BLSE+ contrairement à nos résultats où 10% des souches sont BLSE+.

Son profil de sensibilité aux Béta-lactamines est en changement perpétuel sous l'effet de facteurs évolutifs.

Certaines souches acquièrent une résistance par mutations de gènes ou par acquisition de matériel génétique mobile. Ainsi, des phénomènes d'imperméabilité, d'excrétion par système d'efflux ou de modification des protéines de liaison aux pénicillines peuvent s'observer mais la production de Béta-lactamases constitue actuellement le mécanisme de résistance le plus rencontré chez *Escherichia coli*. (**Bouabdallah et al., 2008**)

D'après les résultats de répartition des entérobactéries, l'espèce de *Klebsiella pneumoniae* est la plus isolée de cette famille, son taux est de 41% ; des résultats similaires à ceux de **Aiche 2022** avec un pourcentage de 17,5% ainsi que proches à ceux de **AARN 2021** avec un taux de 20,3%.

Les résultats de **Chikiken et Moussouni 2022** révèlent une différence dans leur étude où l'espèce *K.pneumoniae* représente le taux le plus faible d'isolats 2,86%.

Nos isolats testés à la Colistine ont marqué une sensibilité totale ; de mêmes résultats aux travaux d'**Aiche 2022** au CHU de T.O.

Les souches testées à la Céfoxitine (FOX) et au Chloramphénicol n'ont signalé aucune résistance contrairement aux résultats du rapport d' **AARN 2021** (FOX : 30,35% et C : 35%), et celles testés à la Céfazoline ont une forte résistance avec un taux de 52,17%.

Les *K.pneumonia* comme les autres entérobactéries présentent une résistance naturelle à l'Ampicilline et à la Ticarcilline par production de Pinecillinases.

Les souches de *K.pneumononiae* BLSE+ sont 100% sensibles à l'AMC et 100% résistantes à la CTX.

L'émergence des entérobactéries productrices de carbapénémases représente un véritable risque de santé publique. Outre l'inactivité de l'ensemble des molécules thérapeutiques de la classe des bêta-lactames, ces bactéries présentent fréquemment de multiples mécanismes de résistances qui peuvent conduire à une impasse thérapeutique. Dans notre étude présente 8% des isolats de *K.pneumononiae*.

En ce qui concerne le genre *Serratia* on a eu 18% des entérobactéries, les souches testées à la Céfazoline (C1G) et l'Amoxicilline montrent une résistance totale naturelle, des résultats similaires à ceux d'**Aiche 2022** au CHU de T.O mais révèlent une différence en ce qui concerne la Colistine où aucune souche n'est avérée résistante, tandis que nos isolats sont à 100% résistants à la Colistine (Polymixine) qui est une résistance naturelle selon **CASFM 2022**.

On a isolé 4% des entérobactéries du genre *Proteus*, un pourcentage proche de celui des isolats de l'étude d'**Aiche 2022** (4,7%) et différent des résultats des travaux de **Chikiken** et **Moussouni 2022** où aucune souche n'est isolée de ce genre.

On a signalé que nos isolats sont à 100% résistants à l'Amoxicilline, à la Céfazoline, et à la Colistine. Cette résistance à la Colistine est une résistance innée (naturelle), des résultats qui se rapprochent de ceux du rapport **AARN 2021**.

4% des entérobactéries isolées sont du genre *Salmonella*, un taux identique à celui des travaux d'**Aiche 2022**, contrairement à celui de **Chikiken** et **Moussouni 2022** ; ils n'ont isolé aucune souche.

Des isolats résistants à des ATB testés à savoir : les aminosides (AMK et GEN), les C1G(CFZ) et les C2G (FOX).

Ils marquent une sensibilité à l'Amoxicilline, aux C3G (CTX), à l'Ofloxacin, à l'Amoxicilline+ l'Acide Clavulanique, à la Colistine et à l'Imipenème.

Les bactéries Gram négatif naturellement hébergent des gènes de résistance aux antibiotiques de la famille des Béta-lactamines et ont développé divers mécanismes pour limiter leur activité. La résistance est causée par un défaut d'accumulation dû à une imperméabilité ou à un efflux de l'antibiotique, des altérations des protéines liant la pénicilline (PLP), mais surtout par la production de BLSE et de carbapénèmases, des enzymes inactivatrices des Béta-lactamines. Les gènes codant pour ces enzymes sont essentiellement localisés sur des éléments génétiques mobiles ; plasmides et transposons, souvent associés à d'autres gènes de résistance aux autres classes d'antibiotiques. La prescription des carbapénèmes est devenue de plus en plus fréquente dans le cas d'infection documentée à bactérie productrice de BLSE, mais également en traitement probabiliste en cas des infections nosocomiales sévères, ce qui entraîne la sélection des souches résistantes. (**Baba Ahmed-KaziTani et Arlet., 2014**).

L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* présente un taux de 5%, un taux différent de celui : d'**Aiche 2022** (9,2%), de **Chikiken** et **Moussouni 2022** (11,42%) ainsi que celui du rapport d'**AARN 2021** (9,34%).

Les souches de *P.aeruginosa* pour lesquelles COL, IMP, TOB, NET, GEN, LEV, et CIP ont été testées ont montré une sensibilité totale, des résultats identiques avec ceux de l'étude d'**Aiche 2022** en ce qui concerne la Colistine, la Gentamycine, et la Levfloxacin.

Nos isolats testés à la Doxycycline ont manifesté une résistance ce qui est expliqué par sa nature selon **CASFM 2022**

P. aeruginosa est connu pour sa résistance intrinsèque à la plupart des antibiotiques et pour sa capacité à développer une résistance à d'autres antibiotiques. Plusieurs mécanismes contribuent à cette résistance aux antibiotiques, notamment la production d'enzymes capables de dégrader ou d'inactiver les antibiotiques, comme les Béta-lactamases, ainsi que la perte de porines, la régulation des pompes d'efflux et l'altération des cibles des antibiotiques au sein des bactéries. (**Mayan., 2023**).

Le pourcentage des isolats de l'espèce *Acinitobacter bumannii* est de 6 ; un taux proche à celui d'**Aiche 2022** au CHU de TO (5,7%), et à celui de **Ben mesbah 2019** au CHU de Blida (6,3%).

Nos isolats ont marqué des résistances à plusieurs ATB, des résultats similaires à ceux de **Ben mesbah (2019)** au CHU de Blida pour la Céftazidime.

Le taux de bactériémies causées par le *staphylococcus aureus* est de 13%, un résultat proche de celui de l'étude de **Ben mesbah 2019** au CHU de Blida (12,6%).

Les isolats présentent une sensibilité aux glycopeptides : VAN et TEC ce qui concorde avec les résultats de **Moustfaoui et Hadji 2021** et avec ceux de **Ben mesbah 2019** au CHU de Blida ainsi celui du rapport d'**AARN 2021** où aucune souche résistante à la VAN et la TEC n'a été enregistrée.

L'étude des résistances de cette espèce révèle une résistance importante aux Béta-lactames (PENG, OXA), aux macrolides (ERY) et aux aminosides (Kanamycine).

L'étude de l'antibiorésistance des *Staphylococcus* à coagulase négative isolés dans notre travail est comparable à celle rapportée par **Ben mesbah 2019** au CHU de Blida et **Koussa et al., 2019** au CHU de TO.

On assiste à de nombreux isolats fortement résistants à la Céfoxitine, l'Oxacilline, la Kanamycine et à l'Erytromycine, et notre étude montre que les ATB les plus efficaces sur les SCN sont la TEC, et la VAN vu la sensibilité des isolats ce qui convient à leurs résultats.

Les entérocoques isolés durant notre étude sont résistants à ERY, CLI, GEN, des résultats similaires à ceux de **Ben mesbah 2019** pour l'ERY.

Les souches d'*Enterococcus* présentent une forte sensibilité à VAN, TEC, CIP, LEV, STH, un profil bactériologique proche de celui des isolats étudiés par **Ben mesbah 2019** au CHU de Blida pour VAN, TEC, et STH.

Les entérocoques se caractérisent par une résistance naturelle aux pénicillines (possède une PLP à faible affinité aux Béta-lactamines) et ont acquis au cours des années une résistance aux Béta-lactamines par production de pénicillinase. Ils possèdent ainsi une résistance naturelle de bas niveau aux aminosides (anomalie des transporteurs membranaires de ces molécules et production d'enzyme modifiant l'antibiotique). Les entérocoques résistent aux macrolides et apparentés par modification de la cible par méthylation. (**Quincampoix et Mainardi., 2001**).

4% de nos isolats représente l'espèce *Streptococcus*, un taux proche de celui d'**Aiche 2022** au CHU de T.O et de celui de **Ben mesbah 2019** au CHU de Blida.

On a une souche de *Streptococcus pneumoniae* qui est sensible à l'Optochine (test de l'Optochine).

Durant notre étude, on a isolé *Listeria spp*, *Candida spp*, les anaérobies contrairement aux travaux de **Chikiken et Moussouni 2022**, **Aiche 2022**, **Ben mesbah 2019**, et **Koussa et al., 2019** où aucune souche n'a été isolée de ces genres.

I. Conclusion

Conclusion

La bactériémie est consécutive de l'introduction directe de bactéries dans la circulation sanguine suite à un acte médical invasif, ou blessure, ou est secondaire à la dissémination des bactéries à partir d'un foyer infectieux primaire. La bactériémie peut être transitoire et totalement asymptomatique ou au contraire de gravité variable allant d'un sepsis au choc septique, liée à une mortalité élevée nécessitant un diagnostic thérapeutique urgent.

L'hémoculture est basée sur l'isolement et l'identification des bactéries qui agissent comme des portes d'entrée et d'infection, car il existe de nombreux micro-organismes différents dans le sang. Des antibiogrammes doivent ensuite être réalisés pour déterminer la sensibilité de la bactérie et son profil de résistance aux antibiotiques.

Au terme de cette étude, les résultats obtenus durant la notre montrent que les hémocultures ont un taux de positivité de 23%, confirmant le diagnostic de bactériémie chez 310 patients, qui sont majoritairement hospitalisés au niveau du pavillon des urgences et au service des maladies infectieuses (13,5%). L'étude bactériologique des hémocultures nous a permis d'isoler 310 souches bactériennes avec des taux d'isolement des bactéries à Gram positif (58%), à Gram négatif (48%) et (2%) de levures. Les espèces les plus isolées étaient *Staphylococcus* à coagulase négative (32%), les entérobactéries (*K.pneumonia* 41%, *E.coli* 34%) et *Staphylococcus aureus* (12%) avec des profils d'antibiorésistance variés.

L'actualisation des données du profil bactériologique des bactériémies ainsi que du profil d'antibiorésistance des bactéries qui sont impliqués permettrait de mieux diriger l'antibiothérapie empirique, et donc de minimiser l'émergence des bactéries multi résistantes. L'optimisation des techniques du prélèvement et d'étude des hémocultures pourrait améliorer la précision et la fiabilité du diagnostic bactériologique des bactériémies.

Références bibliographiques

-A-

- A .Donnars, M. Eveillard, Diagnostic rapide des bactériémies par identification génomique Rapid diagnosis of bacteremia by genomic identification , Annales Pharmaceutiques Françaises, Mai 2023,volume 81, issue 3, pages 425-432.
- Aiche Nazim, Bactériémies au CHU de Tizi-Ouzou : Aspect bactériologique et résistance aux antibiotiques, Thèse de doctorat en pharmacie. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, Algérie, 2022.
- AIDOUN Meroua, BOULAZERG Amina Farah, Etude rétrospective des hémocultures positives au HMRUC : bilan de l'année 2019 du laboratoire de bactériologie. Mémoire de Master, Université des Frères Mentouri Constantine, 2020.

-B-

- BabaAhmed-Kazi Tani,Z. et Arlet,G.(2014).Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie. *Pathologie Biologie*.V62 :169–178.
- Bakhoum I : contrôle de qualité et validation de différentes méthodes d'identification bactérienne. Thèse pharmacie, 2004.
- Bouabdellah-M, Tagajdid -MR, Zerrouk-A, Benouda-A : Nouveau mécanisme de Résistance d'Escherichia coli aux bêta-lactamines. Vol. 30, No 1 (2008), MAROC MEDICAL.
- Bousekraoui Mohamed, Zouhair Said, Soraa Nabila, Benaouda Amina, Zerouali Khalid, Mahmoud Mustapha: Guide pratique des bactéries pathogènes. Ed 2017. 22, 29, 35, 37, 44, 52, 54, 57.
- Bryan CS. Clinical implications of positive blood cultures. Clin MicrobiolRev 1989;V2 :329-353.

-C-

- Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A. (2015).Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology. Mc Graw-Hill Education, Edition 27, 880p
 - Chantal Bertholom, Bactériémies chez le sujet âgé, Option Bio, 2021, volume 32 : 15-16.
-

Références Bibliographiques

- Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2022/05/CASFM2022_V1.0.pdf

- Colomb-Cotinat M
<https://www.cyclamed.org/la-lutte-contre-lantibioresistance-les-bonnes-pratiques-pour-un-bon-usage-du-medicament-9882/>

-D-

- D.Mohammedi, Classification des antibiotiques
<https://pasteur.dz/aarn/images/pdf/antibiotiques/classification.pdf>
- Djelouat Salim, « SALIM DJELOUAT PUBLICATIONS :L'hémoculture : Prescription et Interprétation », 2 décembre 2011
<http://salimdjelouatpublication.blogspot.com/2011/12/lhemoculture-prescription-et.html>

-E-

- E. Díaz Santos a b, C. Mora Jiménez a, L. del Río-Carbajo c, P. Vidal-Cortés , Treatment of severe multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections, Medicina Intensiva (English Edition),2022, Volume 46, Issue 9, Pages 508-520.
- El Bouderkouï Mohammed, Bactériémies en réanimation : Epidémiologie, traitement et évolution. Thèse de doctorat en médecine, Université CADI AYYAD Marrakech, 2015.

-F-

- François.D , Marie Cecile. P,Christian. M ,Vincent.C. 3èmeédition : Bactériologie Médicale : Techniques usuelles, ELSEVIER Masson,2016, page 123.
<https://fr.scribd.com/document/449983004/Bacteriologie-Medicale-Elsevier-Masson-2016#>
- Fraperie P., Lasserre M. Mécanisme physiopathologique des bactériémies
<https://microbiologiemedicale.fr/mecanismes-physiopathologiques-bacteriemies/>

-H-

- Hedfi.M, Khouni.H, Massoudi.Y, Abdelhedi.C, Sassi.K, Chouchen.A, Epidemiology of nosocomial infections: About 70 cases, la Tunisie Medical,2016,volume94(7):401-406

-J-

Références Bibliographiques

- Jonathan Timothée .Sensibilité des bactéries isolées d'hémocultures au laboratoire CHU point G de 2015 à 2020. Bamako ,2022.

-L-

- Larry M. Bush , le manuel MSD version pour professionnels de la santé. Disponible sur : <https://www.msmanuals.com/fr/professional/maladies-infectieuses/cocci-gram-positifs/infections-%C3%A0-ent%C3%A9rocoques>
- Levinson,W.(2014).ReviewofMedicalMicrobiologyandImmunology.SMARTBOOKTM ,McGraw-Hill Education, Edition 13, page 800.
- Lucas.P, Hélène.P, Helene.DR, Céline.E,Vincent.L.M, Complications infectieuses chez les usagers de drogues injectées (UDI) : focus sur les endocardites et l'usage de cocaïne, Médecine et Maladies Infectieuses Formation,2022,volume1,issue4 ;158-165.

-M-

- Mariam Sékou Koné, Bilan de sept (7) ans d'hémoculture en milieu hospitalier pédiatrique de Bamako, Doctorat en Médecine, Université BAMAKO, Mali 2010
- Matthew P. Kronman and Stephen J. Dolgner, Endocarditis and Other Intravascular Infections, Pediatric Infectious Diseases (sixth Editions), 2022, page 269-278.
- Mayan Gilboa, David van Duin , Dafna Yahav Clinical Microbiology and Infection 31 March 2023,Which trial do we need? How to treat Pseudomonas aeruginosa bacteraemia proposal for an umbrella randomized controlled trial.
- Michel.V. 4eme édition, tome3 : Infectiologie : Pharmacie-Biologie. Paris. Editions Wolters Kluwer SA.2013. page 310-311(Collection le Moniteur internat).
- Mostefaoui, Zohra. Hadji Fatma. Profil bactériologique des bactériémies diagnostiquées au niveau du laboratoire central du CHU Blida et sensibilité aux antibiotiques des bactéries incriminées .Blida, 2021.

-N-

- Nauciel, C. et Vildé, J.L. (2005). Bactériologie médicale : Abrégés. Connaissances et pratique. Masson, Edition 2, page 257.
-

Références Bibliographiques

-P-

- Paul Singleton. 6ème édition : Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies. Angleterre, éditions DONOD, 2005, page 324-325.(Collection Sciences Sup).

-Q-

- Quincampoix, J. C. et Mainardi, J. L. (2001). Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. *Réanimation*. V 10: 267-275.

-R-

- Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA*. 1995, 273(2):117-123.
- Rapport du Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques (AARN 2021) édition 2022.
- Rapport Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques (AARN) 2015

<https://pasteur.dz/aarn/index.php/rapports>

- Ryan,K.J.,Ray,C.G.,Sherris,J.C.(2004).Sherrismedicalmicrobiology:anintroduction to infectious diseases. Lange Basic Science, Mc Graw-Hill, Edition 4, page 979

-S-

- Schønheyder HK, Søgaaard M.Existing data sources for clinical epidemiology: The North Denmark Bacteremia Research Database. Dove Medical Press Ltd, 2010.V2:171-178
- Sohani.M, Thushari.D, Jananie.K, Dhananja.N, Samanmale.G, Gayan.W, Niluka.D, Manjula.W, Biofilm formation and antibiotic resistance among Coagulase Negative Staphylococcus species isolated from central venous catheters of intensive care unit patients, *Indian Journal of Medical Microbiology*, 2022.

-T-

- Thomas L. Holland, Arnold S. Bayer and Vance G. Fowler Endocarditis and Intravascular Infections *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 80, 1068-1108, 2020.
-

Références Bibliographiques

-Z-

- Zidouh, Ali. Le profil bactériologique des bactériémies et l'état de résistance aux antibiotiques. Marrakech, 2019. 97 pages.



Annexes

Annexe 1 : Matériels utilisés dans les hémocultures



Figure 31: BacT/ALERT 3D (incubateur et surveillance des hémocultures)



Figure 32: Etuve d'incubation des hémocultures (flacons classiques) à 37°C



Figure 33: Poste de sécurité microbiologique classe II



Figure 34: Système d'identification automatique VITEK2



Figure 35: Incubation des anaérobies

Tableau 4: Matériels non Biologiques

Appareillages	Outils du Laboratoire	Milieux de culture	Autres produits
<ul style="list-style-type: none"> • Ordinateur de laboratoire munis d'API WEB, IKOLAB, et WHONET. • VITEK. • Bain Marie. • Densitomètre • Microscope optique. • BacT/ALERT 3D • Réfrigérateur du laboratoire. • Etuves d'incubation 37°C. • Vortex 	<ul style="list-style-type: none"> • Jarre à bougie. • Micropipettes. • Pied à coulisse. • Pipettes Pasteur. • Tubes à essais stériles. • Portoir • Lame et lamelle. • Tubes secs. • Pince métallique. • Ecouillons. • Coton/ gaze. • Seringues Stériles. • Poire. • Bec Bunsen. 	<ul style="list-style-type: none"> • Gélose au sang frais et au sang cuit. • Gélose Hektoen. • Gélose Muller-Hinton (MH). • Gélose Muller-Hinton additionnée de sang (MHF). • Sabouraud-Chloramphénicol • Gélose chapman • Gélose colombia 	<ul style="list-style-type: none"> • Alcool à 70° et 90°. • Huile de vaseline. • Huile à immersion. • Eau oxygénée. • Alcool iodé • Eau physiologique ou distillée stérile • Plasma humain. • Disques d'antibiotiques • Désinfectant • Gel hydro-alcoolique • Solution saline

<ul style="list-style-type: none"> • Poste de sécurité microbiologique 	<ul style="list-style-type: none"> • Bocal et eau de javel. • L'ance en platine • Embouts • Jarre d'anaérobiose • Sac d'anaérobiose • Catalyseur 		<ul style="list-style-type: none"> • Cartes VITEK <p>Réactifs :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Réactif de VP(VPI, VPII). • Réactif de Kovacs. • Réactif de James. • Réactif de Grisse (Nitrate I et Nitrate II). <p>Colorants :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Violet de Gentian • Lugol • Fuchine. <p>Les kits :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kit d'agglutination de <i>S. aureus</i>. • Kit d'agglutination de <i>Salmonella</i>. • Kit de sérogroupage de <i>Streptococcus</i>
---	--	--	--

Annexe 2

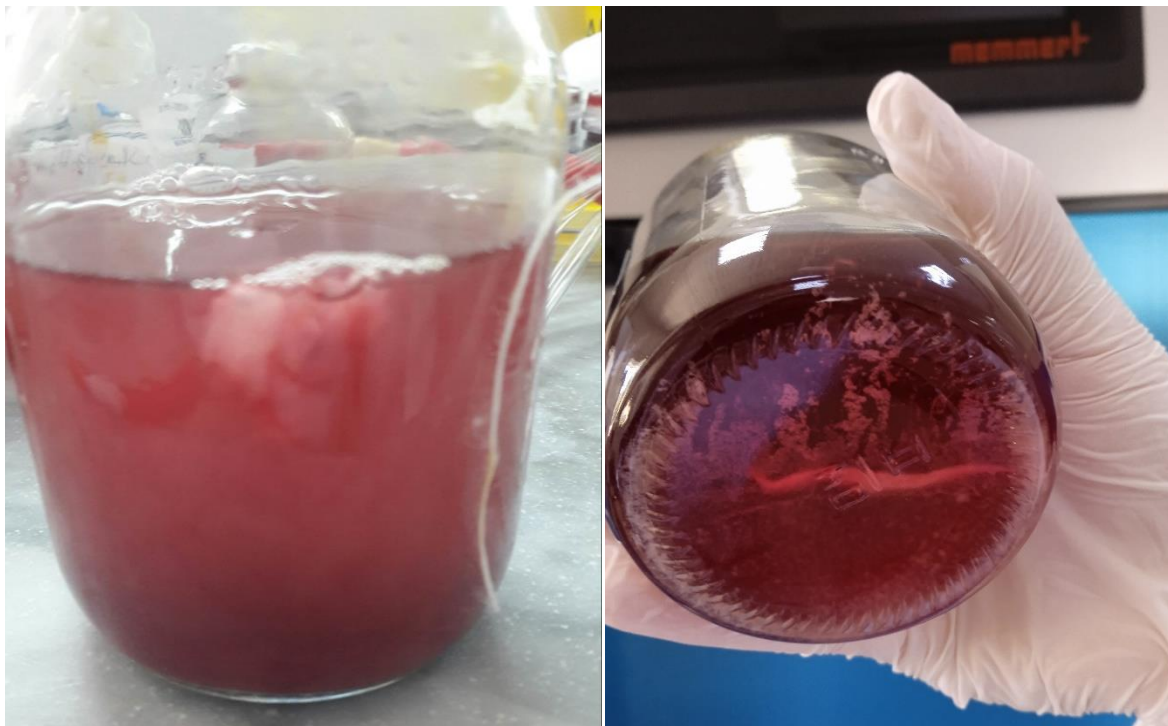


Figure 1 : Signes de Positivité des hémocultures (Flacons classiques)

Annexe 3 : Test d'orientation et d'identification

Etat frais

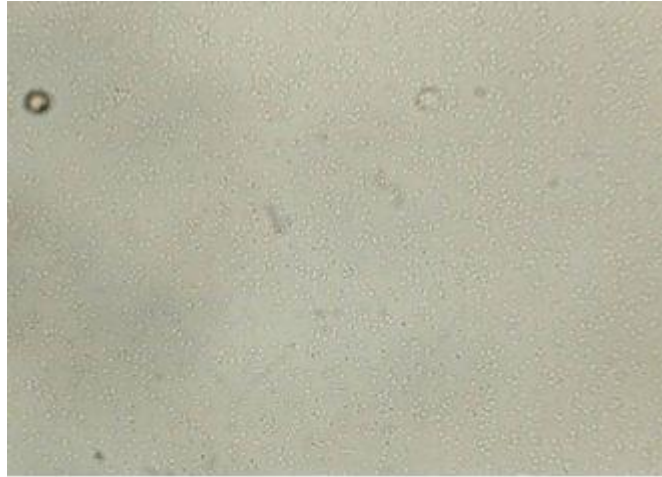


Figure 1 : Observation d'*Acinetobacter bumannii* sous microscope photonique Gx40

Coloration de Gram effectuée à partir des colobies de bactéries

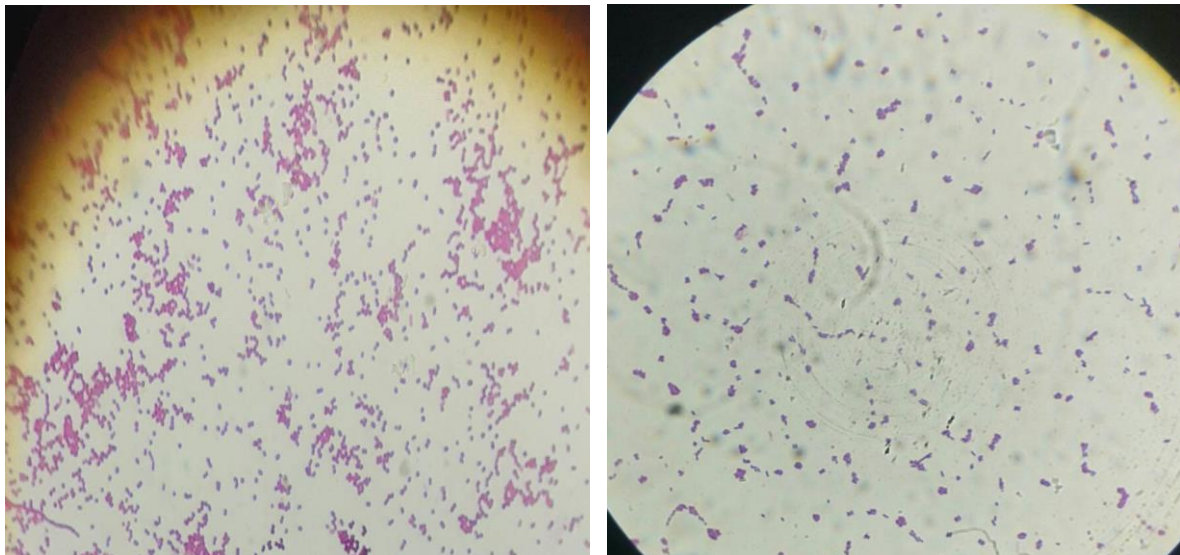


Figure 2: Observation des bactéries avec la coloration de Gram (Gauche : *Acinetobacter bumannii* G-; Droite : *Listeria* G+) sous microscope photonique Gx100 sous immersion

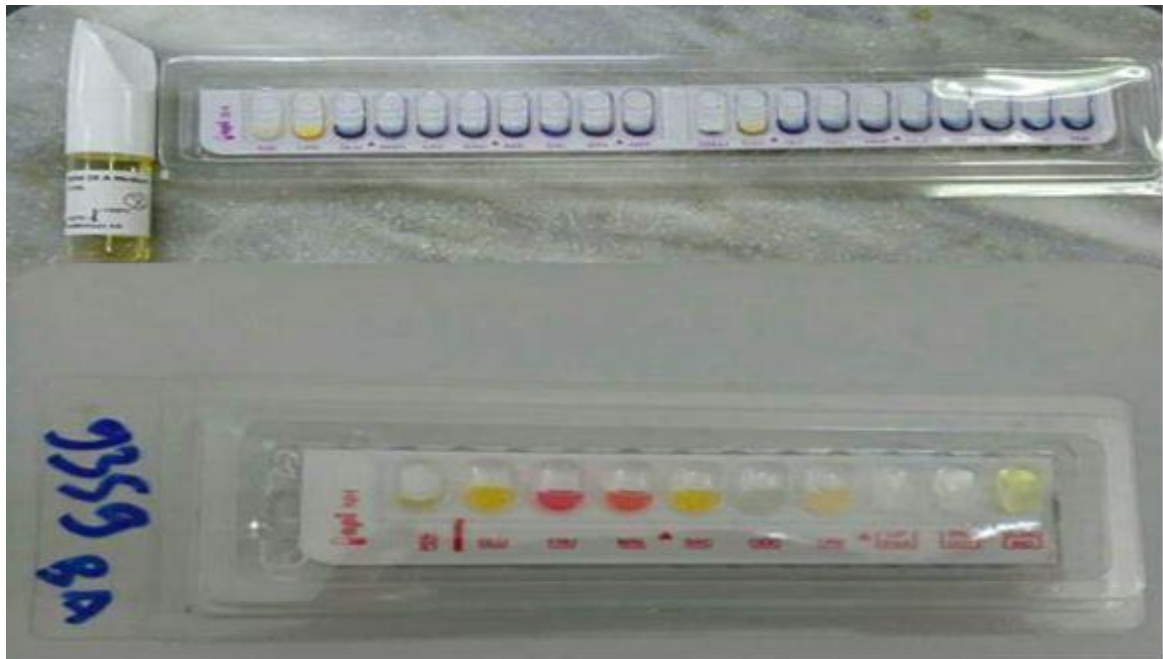


Figure3: Micro-Galleries pour l'identification biochimique (API)



Figure4: Camp-Test (L'image en pèle)

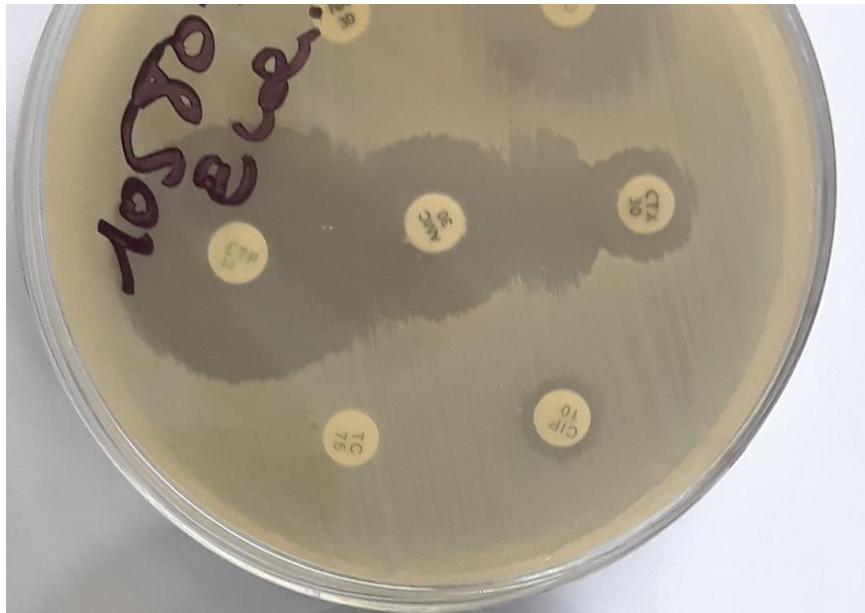


Figure 36: Test de synergie

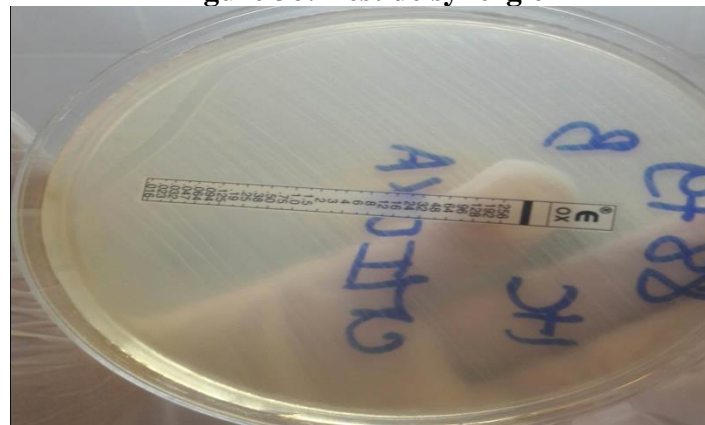


Figure6: E-Test (CMI Oxacilline)



Figure 8: E-Test (VAN, MBL et BLSE)

Résumé

L'objectif de cette étude est de déterminer le profil bactériologique des bactériémies et d'étudier la sensibilité des principales bactéries, en cause, aux antibiotiques. Une étude prospective a été menée au niveau du laboratoire de Microbiologie du CHU Nedir Mohammed de Tizi-Ouzou, sur une période de trois mois, allant du 01 Mars au 01 Juin 2023. Elle porte sur 1323 hémocultures provenant des différents services.

Le taux de positivité était de 23,43% (310/1323). Le service des maladies infectieuses et le pavillon des urgences médicales présentaient les taux les plus élevés avec 13,5% suivi par le service de réanimation médicale (13,2%) et le service de la néonatalogie (9,6%). La majorité des patients positifs étaient des adultes avec 69%. 58% des souches bactériennes isolées sont des bactéries à Gram positif, 40% des bactéries à Gram négatif et 2% de levures. Les espèces les plus fréquemment isolées étaient : les *Staphylococcus* à coagulase négative (32%), les entérobactéries (28%) dont *Klebsiella pneumoniae* (41%), *Escheriachia coli* (34%), *Serratia* (18%) et *Staphylococcus aureus* (12%).

64,10% des *Staphylococcus* à coagulase négative sont résistants à l'Oxacilline et à la Kanamycine ainsi que l'Erytromycine avec un taux de 43,59%. La production de Béta-lactamase à spectre élargi est notée 10% chez *E.coli* et 8% chez *K.pneumoniae*, 8% de ces dernières sont productrices des carbapènèmases. Les bacilles à Gram négatif non fermentaires représentaient 11% de nos isolats (*Acinitobacter bumannii* 6% et *Pseudomonas aeruginosa* 5%), ils ont montré une résistance élevée à la Ticarcyline+ Acide clavulanique. Les souches de *Staphylococcus aureus* ont montré une forte résistance vis-à-vis de la Pénicilline G (53,85%) et de l'Erytromycine (34,62%) cependant aucune souche ne s'est avérée résistante à la Vancomycine et à la Teicoplanine.

Mots clés : Profil bactériologique, Bactériémie, Antibiotiques, Hémoculture.

Abstract

The aim of this study is to determine the bacteriological profile of bacteremias and to study the sensitivity of the main bacteria involved to antibiotics. A prospective study was carried out at the Microbiology Laboratory of the Nedir Mohammed University Hospital in Tizi-Ouzou, over a three-month period from March 01 to June 01, 2023. It involved 1,323 blood cultures from various departments.

The positivity rate was 23.43% (310/1323). The infectious diseases department and the medical emergency had the highest rates, with 13.5%, followed by the medical intensive care department (13.2%) and the neonatology department (9.6%). The majority of positive patients were adults (69%). 58% of bacterial strains isolated were Gram-positive bacteria, 40% Gram-negative bacteria and 2% yeasts. The most frequently isolated species were: coagulase-negative *Staphylococcus* (32%), *Enterobacteriaceae* (28%) including *Klebsiella pneumoniae* (41%), *Escherichia coli* (34%), *Serratia* (18%) and *Staphylococcus aureus* (12%).

64.10% of coagulase-negative *Staphylococcus* are resistant to Oxacillin and Kanamycin, and 43.59% to Erythromycin. Extended-spectrum β -lactamase production is noted in 10% of *E. coli* and 8% of *K. pneumoniae*, while 8% of the latter produce carbapenemases. Non-fermentative Gram-negative bacilli accounted for 11% of our isolates (*Acinetobacter baumannii* 6% and *Pseudomonas aeruginosa* 5%), showing high resistance to Ticarcycline + Clavulanic Acid. *Staphylococcus aureus* strains were highly resistant to Penicillin G (53.85%) and Erythromycin (34.62%), but no strains were resistant to Vancomycin or Teicoplanin.

Keywords: Bacteriological profile, Bacteremia, Antibiotics, Blood culture.
