UNIVERSITÉ MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU, ALGÉRIE

Mémoire pour l'obtention du

DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenu publiquement le 13/09/2022

par

Monsieur Nazim AICHE

Bactériémies au CHU de Tizi-Ouzou : Aspect bactériologique et résistance aux antibiotiques

Membres du jury :

Président du jury : Taoufik DJERBOUA (Maître assistant au CHU de Tizi-Ouzou)

Directeur du mémoire: Fella BOUBRIT (Maître assistante au CHU de Tizi-Ouzou)

Membre du jury : Lynda CHERIFI (Maître assistante au CHU de Tizi-Ouzou)

REMERCIEMENTS

A mon président de jury :

Monsieur le Docteur Taoufik DJERBOUA ;

Vous me faites l'honneur de présider ce jury et je vous en remercie. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma gratitude et de mon plus grand respect.

A ma juge :

Madame le Docteur Lynda CHERIFI ;

Vous avez accepté avec bienveillance d'évaluer cette thèse. Merci pour votre aide au cours de ce travail. Soyez assurée de ma reconnaissance et de toute ma considération.

A ma directrice de thèse :

Madame le Docteur Fella BOUBRIT ;

Un grand merci pour vos conseils, votre bienveillance et votre accompagnement tout au long de ce travail. Je vous suis très reconnaissant.

A ma Tante :

Madame le Docteur Farida HAMDAD ;

Qui m'a consacré beaucoup de son temps pour m'appuyer dans mes recherches. Je la remercie de m'avoir corrigé et transmis les nouvelles avancées dans le domaine.

Au laboratoire de microbiologie :

Je remercie toute l'équipe du laboratoire qui n'a ménagé aucun effort pour m'apporter aide et soutien toutes les fois que je l'ai solicitée.

DÉDICACES

Je dédie ce travail à :

Ma mère

La mémoire de mon père, le Dr Madjid AICHE

Mes deux sœurs

Mes grands parents maternels

La mémoire de mes grands parents Paternels

Ma famille

Mes oncles et tantes

La mémoire de mon oncle, le Dr Mohammed Cherif HAMDAD

Tous ceux et celles qui m'ont soutenu dans la quête des informations nécessaires à l'élaboration de ce modeste travail

Table des matières :

LISTE DES FIGURES V
LISTE DES TABLEAUX VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS VIII
INTRODUCTION 2
PARTIE THÉORIQUE
CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS SUR LES BACTÉRIÉMIES
I. DÉFINITIONS ET CLASSIFICATION 5
1. Classification des bactériémies 5
1.1. Le type de la bactériémie 5
1.2. Le contexte d'apparition 6
1.3. L'origine de la bactériémie 6
II. ÉPIDÉMIOLOGIE 6
III. MICRO-ORGANISMES LES PLUS FRÉQUEMMENT RENCONTRÉS 8
IV. PHYSIOPATHOLOGIES DES BACTÉRIÉMIES 8
1. Porte d'entrée 9
2. Les mécanismes physiopathologiques 9
2.1. Bactériémies à point de départ thromboembolique 10
2.2. Bactériémies à point de départ lymphatique 10
2.3. Bactériémies à point de départ circulatoire 11
V. ASPECT CLINIQUE 11
VI. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE 12
1. Hémocultures 12
1.1. Indications des hémocultures 12
1.2. Milieux d'hémocultures 13
1.3. Systèmes d'hémocultures 14
2. Prélèvement 16
2.1. Site de prélèvement 16
2.2. Mode de prélèvement 16

2.3. Moment de prélèvement 17
2.4. Volume de sang prélèvement 17
2.5. Stratégie de prélèvement 18
2.6. Étiquetage et acheminement 19
3. Démarches diagnostics 19
3.1. Durée d'incubation des hémocultures 20
3.2. Détection de la croissance bactérienne 20
3.2.1. Examen macroscopique 20
3.2.2. Examen microscopique des flacons positifs 21
3.2.3. Repiquage et isolement des microorganismes 22
3.2.4. Méthodes d'identification des bactéries isolées 22
3.2.4.1. Aspect macroscopique des colonies 23
3.2.4.2. Test d'orientation 24
3.2.4.3. Identification biochimique (Galerie biochimique) 25
3.2.4.4. Identification bactérienne par les méthodes automatisées 25
3.2.4.5. Identification par spectrométrie de masse 26
3.2.4.6. Identification par les méthodes moléculaires 27
3.3. Test de sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme) 28
3.4. Interprétation des résultats 30
3.4.1. Hémocultures positives 30
3.4.2. Hémocultures négatives 33
VII. PRISE EN CHARGE THÉRAPEUTIQUE DES PATIENTS 33
1. Définition d'antimicrobiens et antibiotiques 33
2. Antibiothérapie 34
CHAPITRE II : RÉSISTANCE AUX ANTIBIOQUES
I. RÉSISTANCEX AUX ANTIBIOTIQUES 38
1. Définition 38
1.1. Résistance naturelle ou intrinsèque 38
1.2. Résistance acquise 38

2. Mécanisme de résistance 38
2.1. Mécanisme génétique de résistance 38
2.1.1. La résistance chromosomique acquise 39
2.1.2. La résistance extra-chromosomique 39
2.1.3. Les plasmides 39
2.1.4. Les éléments génétiques transposables 40
2.1.5. Les intégrons 40
2.1.6. Les bactériophages 41
2.2. Mécanismes biochimiques de résistances 41
2.2.1. L'inactivation de l'antibiotique par production d'enzymes 42
2.2.2. La modification de la cible 42
2.2.3. Le mécanisme d'efflux actif 42
2.2.4. Une diminution de la perméabilité de l'antibiotique 43
2.2.5. Protection de la cible par encombrement ribosomal 43
2.2.6. Le piégeage de l'antibiotique 43

PARTIE PRATIQUE

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Présentation de l'étude 47
II. Souches bactériennes étudiées 47
III. Matériel et méthodes 47
1. Analyse microbiologique 47
1.1. Phase pré-analytique 47
1.2. Phase analytique 48
1.2.1. Tests complémentaire pour les Staphylococcus et les entérobactéries 50
1.2.1.1. Détection de la résistance à l'oxacilline des Staphylococcus spp 50
1.2.1.2. Détection de la résistance des entérobactéries BLSE 50
1.3. Phase post-analytique 51
2. Analyse statistique 51
2.1. Logiciel WHONET 51

2.1.1. Les avantages du WHONET 52

RÉSULTATS

I. Résultats globaux 54

1. Nombre d'hémocultures et taux de positivité 54

2. Bactériémies en fonction du sexe des patients 54

3. Principales bactéries isolées 55

4. Taux de résistances des principales bactéries isolées selon les données du laboratoire (WHONET) 58

4.1. Taux de résistance des souches de *staphylococcus aureus* 58

4.2. Taux de résistance aux antibiotiques des entérobactéries 59

4.3. Taux de résistance aux antibiotiques des *Pseudomonas aeruginosa* 60

II. Résultats par services 61

1. Nombre d'épisode de bactériémies par service 61

2. Principales bactéries isolées dans les principaux services 63

3. Principales bactéries résistantes isolées dans les principaux services 66

III. Résultats des bactériémies pendant la période pré-COVID et COVID 66

1. Nombre de bactériémies 66

2. Principales bactéries isolées pendant la période pré-COVID et COVID 67

3. Principaux phénotypes et taux de résistance des principales bactéries isolées pendant les deux périodes de l'étude 73

DISCUSSION 75

CONCLUSION 78

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXE

RÉSUMÉ

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Physiopathologie des bactériémies 9
Figure 2: Mécanisme des bactériémies d'origine thromboembolique 10
Figure 3: Automate d'incubation des flacons d'hémocultures (Biomerieux – Bact/Alert® 3D) Gamme de flacons pour Bact/Alert 15
Figure 4: Automate d'incubation des flacons d'hémocultures (BD BACTEC® FX / Gamme de flacons pour BACTEC) 15
Figure 5: Automate d'incubation des flacons d'hémocultures (VersaTREK, automate de détectionmicrobienne) 15
Figure 6 : Procédure de prélèvement des hémocultures 16
Figure 7: Prélèvement multiple et prélèvement unique chez un adulte 18
Figure 8: Principe de détection du système automatisé 20
Figure 9: Technique de recherche de la catalase 24
Figure 10: Test de l'oxydase 24
Figure 11: Galerie miniaturisées API 25
Figure 12: VITEK® 2 Compact 25
Figure 13: Spectrométrie de masse Bruker 26
Figure 14: Voies d'acquisition de résistance aux antibiotiques 39
Figure 15: Structure des intégrons 41
Figure 16: Principales cibles des antibiotiques 41
Figure 17: Flacons d'hémocultures utilisés au CHU de Tizi-Ouzou 48
Figure 18 : Gestion et analyse des résultats avec WHONET 52
Figure 19: Taux de positivité des hémocultures au CHU de Tizi-Ouzou 54
Figure 20: Taux de bactériémie en fonction du sexe 55
Figure 21: Taux de positivité des bactériémies en fonction des caractères morpho-tinctoriaux des Bactéries 55
Figure 22: Taux de positivité des hémocultures en fonction des espèces bactérienne 56
Figure 23: Principales entérobactéries responsables de bactériémies au CHU de Tizi-Ouzou 57
Figure 24: Principaux Cocci à Gram positif responsables de bactériémies au CHU de 57
Tizi- Ouzou 62
Figure 25: Nombre de Bactériémie par service 63

Figure 26: Principales bactéries responsables de bactériémie dans les principaux services de soins 64
Figure 27: Principales bactéries responsables de bactériémie par unité de soin en pédiatrie.. 65
Figure 28: Principales bactéries isolées de bactériémies dans les principaux services adultes 66
Figure 29: Principales bactéries multi résistantes dans les principaux services de soin..... 67
Figure 30: Nombre de bactériémies pendant la période pré COVID et COVID 67
Figure 31: Évolution du taux des principales bactéries isolées pendant la période pré-COVID et COVID..... 69
Figure 32: Prinipales bactéries isolées par période..... 70
Figure 33: Évolution des principales bactéries à Gram négatif isolées pendant la période de l'étude 70
Figure 34: Évolution des principaux Cocci à Gram positif isolés pendant la période de l'étude 70
Figure 35: Principales bactéries isolées par unité de soin pendant la période pré-COVID (2019) et COVID (2020-2021)..... 72
Figure 36: Évolution des principales bactéries isolées pendant la période de l'étude..... 72
Figure 37: Évolution des principaux phénotypes de résistance des principales bactéries isolées 73
Figure 38: Évolution des entérobactéries BLSE et des souches de Staphylocoques réistantes à la méticilline 74

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Agents pathogènes le plus fréquemment en cause (en pourcentage des épisodes de bactériémies)..... 8
Tableau 2: Caractéristiques, avantages et inconvénients des protocoles de prélèvements d'hémocultures 19
Tableau 3: Aspects microscopiques des principales bactéries responsables de bactériémies . 21
Tableau 4: Aspects des colonies des principales bactéries isolées 23
Tableau 5: Caractéristiques des principales méthodes d'antibiogramme 29
Tableau 6: Interprétation des hémocultures positives sur prélèvements multiples 30
Tableau 7: Interprétation des résultats d'hémocultures avec le prélèvement unique 32
Tableau 8: Antibiothérapie probabiliste en présence de signes de gravité 35
Tableau 9: Antibiothérapie selon l'examen direct et le caractère communautaire ou associé .... aux soins de la bactériémie 35
Tableau 10: Antibiothérapie selon l'agent pathogène 36
Tableau 11: Principales bactéries isolées dans les bactériémies au CHU de Tizi-Ouzou……56
Tableau 12: Taux de résistance aux antibiotiques des souches de *S. aureus* isolées 58
Tableau 13: Taux de résistance aux antibiotiques des entérobactéries..... 60
Taleau 14: Taux de résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* 60
Tableau 15: Nombre de bactériémie par service 61
Tableau 16: Nombre de bactériémies pendant la période pré-COVID et COVID 66
Tableau 17: Tendance de l'évolution des principales bactéries pendant les périodes pré-COVID et COVID..... 68
Tableau 18: Principaux phénotypes de résistance des principales bactéries isolées 73

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Abréviations	Définitions
ACCP	American College of ChestPhysiscians
SSCM	Society of Critical Care Medicine
SRIS	Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique
VIH	Virus de l'Immunodéfiscience Humaine
SCN	Staphylococcus Coagulase Négative
qSOFA	Score Sepsis-related Organ Failure Assessments
GCS	Glasgow Coma Scale/Score
Pa	Pression artérielle
FiO_2	Fraction inspire en oxygène
PAM	Pression Artérielle Moyenne
SIDA	Symdrome de l'Immunodefiscience Acquise
CO_2	Dioxyde de Carbone
O_2	Dioxygène
H_2	Dihydrogène
N_2	Diazote
DIV	Dispositif IntraVasculaire
DEL	Diode ÉlectroLuminescence
LED	Light Emitting Diode
API	Appareils et Procédés d'Identification
MALDI TOF	Matrix Assisted Laser DesorptionIonisation/ Time of Flight
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNr	Acide DésoxyriboNucléique ribosomal
PCR	Polymérase Chain Reaction

EMBL	EuropeanMolecularBiologyLaboratory
EBI	EuropeanBioinformaticInstitute
NCBI	National Center for Biotechnology Information
BIBI	Bio InformaticBacteria Identification
SodA	Superoxidedimutase A
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
HACEK	Haemophilus spp, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Cardiobacterium hominis, Eikenella corrodens, Kingella kingae
SFM	Société Francaise de Microbiologie
CA-SFM	Caumité de l'Antibiogramme-Société Française de Microbiologie
BMR	Bactérie Multi Résistante
C3G	Céphalosporine 3ème Génération
AMC	Amoxicilline
CTX	Céfotaxime
CRO	Céftriaxone
CPO	Céfpirome
CAZ	Céftazidime
SI	Séquence d'Insertion
MLS	Macrolides

INTRODUCTION

Les bactériémies sont des infections graves qui peuvent engager le pronostic vital des patients. Le diagnostic requiert un examen minutieux qui passe par la mise en culture du sang (l'hémoculture). Cet examen permet de mettre en évidence le micro-organisme à l'origine de l'infection et par conséquent de la détérioration de l'état clinique du patient.

La détection et l'identification de la bactérie en cause complétés par l'étude de la sensibilité aux antibiotiques permettront une prise en charge thérapeutique optimale par le clinicien.

En effet, la problématique de la résistance bactérienne prend des proportions alarmantes à l'échelle mondiale, induite par l'utilisation abusive et irrationnelle des antibiotiques en santé humaine et surtout animale.

A l'ère où l'Homme est confronté à une menace continuelle des agents infectieux, il est essentiel de connaitre l'écologie bactérienne et les mécanismes de résistance acquis par les bactéries pour une meilleure prise en charge des patients et pour diminuer la consommation des antibiotiques.

Les objectifs de notre travail étaient multiples :

- Étude de l'écologie bactérienne des bactériémies par unité de soin, au CHU de Tizi-Ouzou.
- Appréciation de l'état de la sensibilité et évaluation de la résistance aux antibiotiques des bactéries isolées à partir des hémocultures durant une période de 3 ans.
- Etude des phénotypes de résistance des principales bactéries isolées dans les bactériémies.

PARTIE THÉORIQUE

CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS SUR LES BACTÉRIÉMIES

I. Définitions et classification :

Une 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 [1, 2].

Le terme septicémie n'est plus utilisé, il est remplacé par l'expression « bactériémie associé à un sepsis » [3].

La notion de sepsis a été définie par l'American College of Chest Physicians (ACCP) et la Society of Critical Care Medecine (SSCM) en 1992 [4]. Le sepsis correspond à l'association d'une infection présumée et d'un Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique (SRIS). Le SRIS est composé de quatre variables : température, fréquence cardiaque, fréquence respiratoire et nombre de leucocytes dans le sang circulant. Il s'agit d'un état inflammatoire généralisé, présent dans d'autres pathologies à composante inflammatoire comme la pancréatite, l'ischémie et le poly traumatisme.

Une gradation des stades infectieux a été établie : sepsis, sepsis sévère et choc septique [5].

1. Classification des bactériémies :

Plusieurs classifications sont utilisées selon :

1.1. Le type de la bactériémie :

Bactériémies transitoires, ces bactériémies sont fréquentes, communes et spontanément résolutives. Elles correspondent à des décharges brèves de bactéries dans le sang et sont, en général, asymptomatiques.

Bactériémies intermittentes se caractérisent par des décharges irrégulières et répétées de microorganismes dans le sang et souvent associées à une infection focale. Elles sont rencontrées dans les bactériémies thromboemboliques et les endocardites.

Bactériémies continues correspondent à une décharge continue d'un microorganisme dans la circulation sanguine. Elles se rencontrent lors d'une bactériémie d'origine lymphatique (brucellose ou fièvre typhoïde).

Qu'elles soient intermittentes ou continues, une bactériémie est une infection grave [1, 5, 6].

1.2. Le contexte d'apparition :

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.

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 [8, 9, 10].

1.3. L'origine de la bactériémie :

Bactériémies primaires : Une bactériémie est dite primaire lorsqu'aucune autre infection n'est diagnostiquée ou s'il s'agit d'une infection liée aux cathéters.

Bactériémies secondaires à un foyer focal (culture positive au même microorganisme ou microorganisme habituellement retrouvé au niveau de ce site). Une dissémination hématogène est alors suspectée [11, 12].

II. ÉPIDÉMIOLOGIE :

Les bactéries sont les micro-organismes les plus souvent documentés dans les bactériémies. L'écologie bactérienne des bactériémies varie en fonction de l'origine (communautaire ou nosocomiale) et en fonction du service d'hospitalisation (réanimation ou services de médecine).

Les bactériémies touchent plus particulièrement les services de soins intensifs. Leur incidence est de 43-69/1000 admissions dans ces services contre 8,2/1000 admissions hospitalières générales. Ces unités regroupent les patients dont l'état général est diminué et où les procédures invasives et les microorganismes résistants sont plus courants que dans les autres services.

Au vu de la sévérité des tableaux cliniques, les patients atteints de chocs ou de sepsis sévères y sont transférés.

L'incidence des bactériémies communautaires est de 10,2/1000 admissions aux soins intensifs, ce qui est équivaut à 30-40% de tous les épisodes de bactériémies dans ce service.
La proportion des bactériémies nécessitant une admission aux soins intensifs rentrant dans la catégorie « liée au soins » est d'environ 10%.

Les bactériémies nosocomiales représentent 5% des patients hospitalisés aux soins intensifs et demeurent l'une des causes les plus importantes de mortalité et de morbidité.

La fréquence globale des bactériémies varie de 5,5 à 19,1 pour 1 000 patients hospitalisés. Ces écarts importants sont, en grande partie, liés à des différences de recrutement. L'âge des patients, la gravité et le type des pathologies traitées peuvent expliquer ces variations. Plusieurs explications peuvent être proposées : le recours plus fréquent et plus facile aux hémocultures, les meilleures performances des systèmes d'hémocultures avec l'apport important de l'automatisation, mais aussi la gravité des pathologies traitées à l'hôpital. Les patients sont plus âgés, et surtout la fréquence des immunodépressions acquises, liées aux thérapeutiques ou à l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) sont en augmentation.

Les gestes invasifs et le recours à des dispositifs intravasculaires, au premier rang desquels figurent les cathéters veineux, sont plus fréquents. Ainsi, l'incidence des bactériémies est différente entre un service médical, un service chirurgical et une unité de réanimation ou de soins intensifs. Les cathéters veineux ont été incriminés pour 19 % des cas dans une étude récente, alors qu'ils n'étaient mis en cause que dans 3 % des cas, par les mêmes auteurs, 16 ans auparavant. Les infections sur cathéter font actuellement partie des trois principales infections acquises en réanimation. L'origine d'une proportion importante d'épisodes de bactériémie reste inconnue, malgré les progrès faits dans les moyens d'exploration, tant en imagerie médicale qu'en bactériologie. Cette situation peut représenter 14 %, voire 25 % des bactériémies. Cette proportion de bactériémies d'origine inconnue est inférieure dans les unités de réanimation ou de soins intensifs. L'origine digestive par translocation est la plus souvent évoquée.

Des évènements Indésirables Graves (47%) sont d'origine nosocomiale, qu'ils soient acquis au-dehors ou dans les services de réanimation. Les principaux foyers sont respiratoires (42 %), abdominaux (34 %), suivis par les urines (9 %), les parties molles (5 %) et les cathéters (5 %)

Les données épidémiologiques montrent que les staphylocoques à coagulase négative (SCN), *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* sont les espèces les plus fréquemment isolées.

La majorité des SCN isolés sont des contaminants, ce qui peut poser des problèmes d'interprétation. L'existence d'une bactériémie à SCN ou à *Candida* reste un élément d'orientation vers une infection sur cathéter. Une signification clinique, essentiellement, en cas de présence de matériel leur a été attribuée dans 10 à 30% des cas.

Parmi les micro-organismes retrouvés au cours des hémocultures, 52,1 % sont d'origine nosocomiale. Les souches les plus souvent en cause sont les entérobactéries et *S. aureus* [13, 14].

III. MICRO-ORGANISME LES PLUS FRÉQUEMMENT RENCONTRÉS :

Agents pathogènes	Etats Unis 1992-1993	France 1993	Royaume Unis 1993-1996
Gram positif			
Staphylococcus aureus	18,8	21,4	22,5
SCN	9,2	10,7	7,6
Enterococcus spp.	6,9	5,7	4,8
Streptococcus pneumoniae	3,6	8,8	7,9
Autres streptocoques	4,7	3,9	3,1
Autres Gram positif	1,2	1,9	0,9
Gram négatif			
Escherichia coli	15	29,2	6
Klebsiella spp.	6,8	4,3	3,8
Autres entérobactéries	11	11 ,3	8,2
Pseudomonas aeruginosa	5,6	3,8	5,1
Acinetobacter spp.	1,3	1,1	3,8
Autres aérobies	2,2	0,6	0,3
Anaérobies	3,9	3,2	1,3
Levures	7	1,7	3,8

Tableau 1 : Agents pathogènes le plus fréquemment en cause (en pourcentage des épisodes de bactériémies) [13]

IV. PHYSIOPATHOLOGIE DES BACTÉRIÉMIES :

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

Le système phagocytes-mononucléaires 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 ou métastases septiques [15].

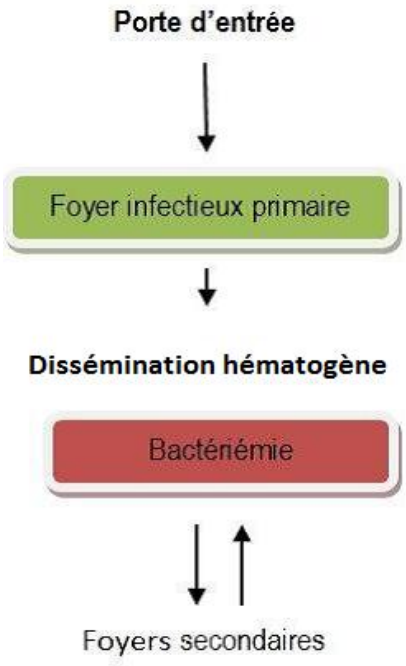


Figure 1 : Physiopathologie des bactériémies

1. Porte d'entrée :

La recherche d'une porte d'entrée est une information capitale 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.

Les portes d'entrée de la bactériémie sont différentes selon le caractère communautaire ou associé aux soins. Les principales portes d'entrée pour les bactériémies communautaires sont urinaires, digestives ou pulmonaires et plus rarement cutanées, respiratoire ou dentaires. A l'inverse la principale porte d'entrée des bactériémies associées aux soins est vasculaire (cathéter). Dans environ 15 à 30% des bactériémies, aucune porte d'entrée n'est retrouvée.

L'isolement de certaines bactéries dans les hémocultures justifie une recherche systématique de porte d'entrée présumée, même en l'absence de symptomatologie évocatrice. Une infection à staphylocoque évoque, par exemple, une porte d'entrée cutanée ou vasculaire, alors qu'une bactériémie à Entérobactérie évoque, plutôt, une origine urinaire ou digestive [16].

2. Les mécanismes physiopathologiques :

Selon les mécanismes physiopathologiques, les bactériémies peuvent être :

- Intermittentes pour les bactériémies thromboembolique et endocarditique : les décharges sont irrégulières et répétées.

- Continues pour les bactériémies d'origine lymphatique telles que la brucellose ou la fièvre typhoïde [17].

2.1. Bactériémies à point de départ thromboembolique :

Au contact d'un foyer initial bactérien se constitue une thrombophlébite par une réaction inflammatoire de l'endoveine colonisée par des bactéries. La fragmentation du caillot septique est à l'origine de l'essaimage bactérien. La porte d'entrée cutanée ou muqueuse n'est pas toujours évidente et la phlébite elle-même est rarement symptomatique.

Ce type de bactériémie est en cause dans les bactériémies aiguës dont les bactéries responsables sont surtout les Cocci à Gram positif, les entérobactéries, et les anaérobies.

Les principales localisations secondaires sont pulmonaires, ostéo-articulaires et endocardiques [18].

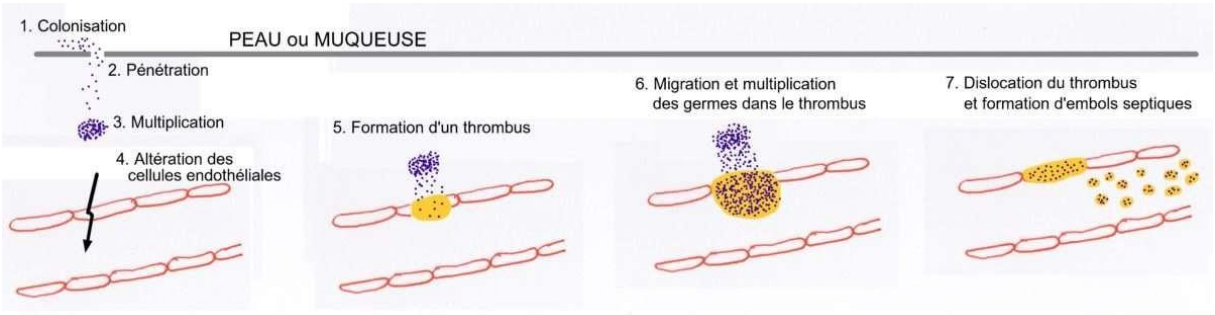


Figure 2: Mécanisme des bactériémies d'origine thromboembolique

2.2. Bactériémies à point de départ lymphatique :

Ce type de bactériémie a souvent une porte d'entrée digestive. Les microorganismes qui traversent la peau ou la muqueuse, atteignent les ganglions lymphatiques via les vaisseaux lymphatiques afférents. La plupart des bactéries présentes dans les ganglions sont lysées et leurs endotoxines sont libérées dans le sang d'où le risque du choc endotoxinique. Les bactéries ayant résisté à la destruction par les macrophages, vont proliférer, quitter le ganglion par les vaisseaux lymphatiques efférents et rejoindre la circulation générale via le canal thoracique. La fièvre est constante vu la décharge bactérienne continue.

Les agents pathogènes impliqués dans les bactériémies à point de départ lymphatique sont généralement *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A et B et *Brucella* spp. La peste bubonique (*Yersinia pestis*) fait également partie de ce type de bactériémie [19, 20].

2.3. Bactériémies à point de départ circulatoire :

C'est le cas de l'endocardite infectieuse dont le développement nécessite une porte d'entrée à partir de laquelle les bactéries pénètrent dans la circulation. Ils vont se fixer sur les valvules, l'endocarde mural, ou l'intima vasculaire. Les micro-organismes emportés par le courant sanguin sont responsables de l'hyperthermie, de la bactériémie [18].

V. ASPECT CLINIQUE :

Une fièvre associée éventuellement à des frissons intenses en présence de multiples foyers infectieux, en cas de neutropénie ou de présence de matériel étranger surtout un cathéter veineux central, sont des signes cliniques habituels. Dans certaines situations telles que les bactériémies à entérobactéries, une hypothermie peut être observée.

Chez des terrains particuliers comme les sujets âgés, les immunodéprimés, les patients sous corticothérapie ou sous traitement antipyrétique, les signes cliniques de la bactériémie peuvent être absents. Cependant des signes de gravité doivent être recherchés, notamment des signes de sepsis et ou/ de choc septique. Un quart des bactériémies sont associées à un sepsis ou à un choc septique et seulement 40% des sepsis et chocs septiques sont associés à une bactériémie.

Le sepsis est un dysfonctionnement d'organe provoqué par une réponse inappropriée de l'hôte à une infection mettant ainsi le pronostic vital en jeu. Il est défini par les critères clinicobiologiques suivants :

- **Hors réanimation :**

- Score Sepsis-related Organ Failure Assessment (qSOFA) ≥ 2. Le score qSOFA est calculé en se basant sur les items suivants (présence = 1, absence = 0)
- Fréquence respiratoire ≥ 22
- Trouble des fonctions supérieures (confusion, désorientation, GCS < 15)
- Pression artérielle ≤ 100mmHg

- **En milieu de réanimation :**

- Score SOFA ≥ 2. Le score SOFA est calculé en se basant sur les items suivants (0 à 4 points par item) :

- Troubles de la fonction respiratoire (PaO2/FiO2)
- Thrombopénie (numération plaquettaire)
- Troubles de la fonction hépatique (bilirubine)
- Hypotension
- Troubles de la conscience (score de Glasgow)
- Troubles de la fonction rénale (créatinine ou diurèse)

Le choc septique est un sepsis associé à une défaillance circulatoire, cellulaire ou métabolique. Il est défini par les mêmes critères clinico-biologiques du sepsis en plus d'une hypotension persistante devant un remplissage vasculaire adéquat, nécessitant l'introduction des amines vasopressives afin de maintenir une pression artérielle moyenne (PAM) ≥ 65mmHg et un taux de lactates sériques > 2mmol/L [3, 21].

VI. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE :

1. HÉMOCULTURES :

L'hémoculture est l'examen de référence pour détecter les bactériémies. Il s'agit également d'un examen permettant de détecter la présence de levures et de champignons dans le sang (fongémies).

Toute fièvre d'origine indéterminée doit faire pratiquer des hémocultures, et le prélèvement d'hémocultures fait partie des actions médicales obligatoires à mettre en œuvre dans les 3 premières heures lors d'une prise en charge d'un sepsis.
La réalisation d'une hémoculture consiste à inoculer des bouillons de cultures contenus dans des flacons stériles avec du sang prélevé de manière aseptique. Les flacons sont ensuite incubés à 35°C +/- 2, soit dans des étuves standard (systèmes manuels) ou dans des automates (systèmes automatisés) pendant une durée variable.

La détection d'une croissance est alors assurée soit de manière visuelle (systèmes manuels) soit de manière physico-chimique (systèmes automatisés). En cas de détection d'un microorganisme, celui-ci est identifié et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques est réalisée [22].

1.1. Indication des hémocultures :

Les principales indications des hémocultures sont :

- ✓ Tout syndrome infectieux faisant suspecter un état septicémique

- ✓ Fièvres prolongées et inexpliquées ou hypothermie témoignant d'un état infectieux sévère
- ✓ Endocardite infectieuse : recherche de l'étiologie
- ✓ Toute personne porteuse d'un cathéter périphérique ou central, sondes ou prothèses, présentant une température supérieure à 38,5 °C ou inférieure à 36,5 °C
- ✓ Survenue de frissons, marbrures
- ✓ Complication d'un foyer suppuré (infection dentaire, furoncle, abcès...).
- ✓ Tout signe traduisant un trouble de la coagulation sanguine, tel un purpura [18].

Cas particuliers :

- ✓ Recherche des mycobactéries chez les patients immunodéprimés ou chez les patients au stade SIDA.

Chez le nouveau-né : Des critères anamnéstiques doivent être pris en considération tels que :

- ✓ Température maternel supérieure à 38°C, survenant avant ou au début du travail
- ✓ En cas de prématurité (< 35 semaines)
- ✓ Antécédent d'infection materno-foetale à *Streptococcus agalactiae*
- ✓ Rupture de la poche des eaux plus de 12 heures [23].

1.2. Milieux d'hémocultures :

Les milieux utilisés contiennent des nutriments et des facteurs de croissance permettant la culture des microorganismes pathogènes. Ces milieux contiennent également un anticoagulant. Il s'agit le plus souvent du polyéthanol sulfonate de sodium qui favorise la croissance bactérienne en inhibant l'action de différents facteurs sanguins potentiellement bactéricides (complément, phagocytes, lysozyme). Certains flacons contiennent des composés (billes ou résines absorbantes) permettant de neutraliser l'action des antibiotiques présents en cas de prélèvement n'ayant pas pu être réalisé avant la mise en place d'une antibiothérapie.

Les flacons utilisés, qui sont fabriqués sous pression réduite afin de faciliter le recueil de sang, comporte en général une atmosphère enrichie en CO_2 afin de faciliter la croissance de différentes espèces exigeantes. Cette atmosphère contient également d'autres gaz permettant de favoriser la croissance des espèces aérobies strictes ou facultatives (flacons aérobies : CO_2 et O_2) ou anaérobies strictes (flacons anaérobies : CO_2 et H_2 ou N_2).

Ces milieux permettant la détection de l'ensemble des microorganismes potentiellement pathogènes chez l'Homme.
Le prélèvement est réalisé dans des conditions d'asepsie rigoureuse afin de ne pas inoculer des bactéries faisant partie du microbiote cutané du patient et éviter de générer de faux positifs [22].

1.3. Systèmes d'hémocultures :

Il existe des systèmes manuels (système Isolator® et hémoculture sur bouillon citrate) et des systèmes automatisés d'incubation des flacons d'hémoculture.
Les systèmes manuels consistent à inspecter quotidiennement les flacons à la recherche d'une modification (trouble, production de gaz, etc.) provoquée par la croissance bactérienne. La sensibilité de ces systèmes n'est pas optimale en raison notamment du mode de détection visuel et de l'absence d'agitation en continu. Avec ces systèmes, le risque de résultats faussement négatifs est d'autant plus important lorsque les espèces en cause (espèces à croissance fastidieuse et/ou lente, *Neisseria* spp., *Campylobacter* spp., diverses espèces anaérobies, etc.) n'entraînent que peu de modifications visibles à l'œil nu.

Les systèmes automatisés, plus sensibles que les systèmes manuels, comportent des étuves assurant de manière autonome une incubation à 35°C et une agitation continue des flacons ce qui permet un rendu de résultat plus précoce. Ces automates sont des systèmes fermés. Ils comprennent un système de détection de la croissance microbienne. Le principe de détection de trois systèmes disponibles sur le marché (Figures 3 à 5) est basé sur la mesure du CO_2 produit par le métabolisme des micro-organismes. Cette mesure est indirecte pour les systèmes Bact/ALERT 3D® (bioMérieux) et BD BACTEC® (Beckton Dickinson), via une pastille située au fond de chaque flacon qui réagit au CO_2 en produisant de la fluorescence (système BD BACTEC®) ou un virage coloré, détecté par réflectométrie (système Bact/ALERT 3D®). Cette mesure est directe pour le troisième système (système VersaTREK® Thermoscientific), grâce à une sonde externe qui mesure la variation de pression au sein de chaque flacon.

Quel que soit le système utilisé, chaque flacon est placé dans une cellule pourvue d'un système de lecture qui effectue des mesures toutes les 10 minutes. La mesure est ensuite interprétée par le système en fonction de paramètres de positivité préprogrammés [22].

Figure 3 : Automate d'incubation des flacons d'hémocultures (Biomerieux – Bact/Alert® 3D) / Gamme de flacons pour Bact/Alert

Figure 4 : Automate d'incubation des flacons d'hémocultures (BD BACTEC® FX / Gamme de flacons pour BACTEC)

Figure 5 : Automate d'incubation des flacons d'hémocultures (VersaTREK, automate de détection microbienne)

2. PRÉLÈVEMENT :

2.1. Site de prélèvement :

Le site de prélèvement est fonction de l'âge du patient. Chez l'adulte et l'enfant, le site de prélèvement est le plus souvent la veine du pli du coude. Chez le nouveau–né, le site est le plus souvent la jugulaire (fontanelle).

2.2. Mode de prélèvement :

La ponction veineuse est la méthode de référence pour prélever du sang en vue d'une culture bactériologique et/ou mycologique (Figure 6). Cependant, lorsque le prélèvement veineux périphérique n'est pas possible, l'utilisation d'un cathéter artériel peut être une bonne alternative.

Le prélèvement d'hémocultures via un dispositif intravasculaire (DIV) veineux est quant à lui fortement déconseillé en raison du risque élevé de contamination.

Le prélèvement d'hémocultures doit être réalisé dans des conditions d'asepsie rigoureuse pour éviter toute contamination d'origine environnementale ou humaine. En plus des autres mesures (port de gants, port de masque, désinfection des opercules des flacons, etc…) destinées à réaliser ce prélèvement dans de bonnes conditions, une désinfection (antiseptiques alcooliques) de la peau du patient au niveau de la zone de ponction est primordiale, afin d'éviter une contamination par les microorganismes faisant partie du microbiote cutané [22].

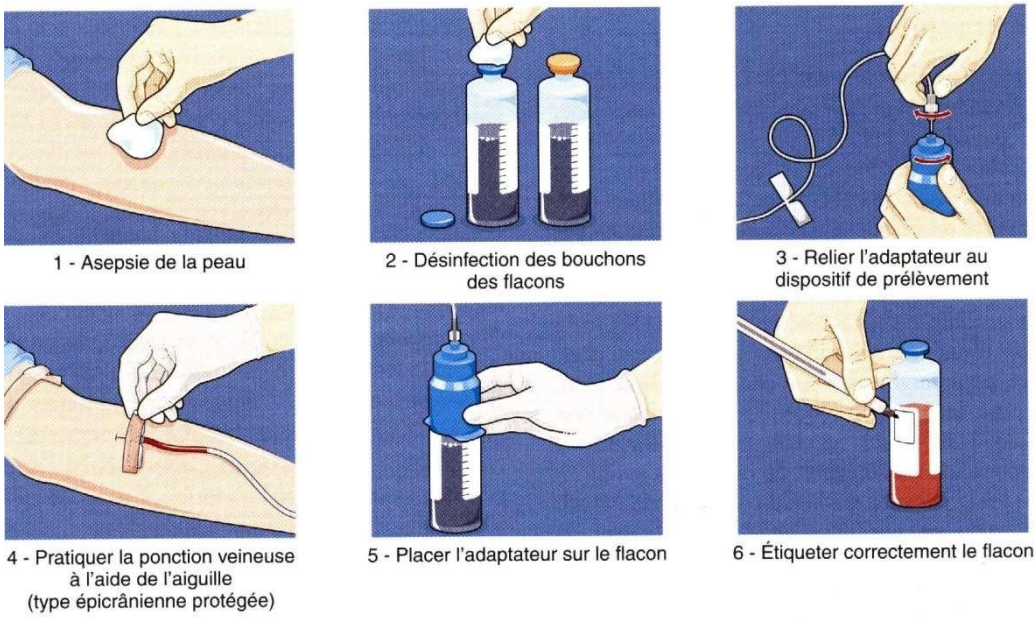


Figure 6 : Procédure de prélèvement des hémocultures

2.3. Moment de prélèvement :

Pour éviter tout faux négatif, il est impératif de pratiquer le prélèvement le plus tôt possible au cours de l'infection et avant toute antibiothérapie. Dans le cas contraire, une fenêtre thérapeutique de 48 à 72 heures est recommandée. À l'exception des infections du système vasculaire où la bactériémie est continue, le moment du prélèvement est important car la bactériémie est discontinue, ce qui peut modifier la qualité du prélèvement. Les signes évocateurs sont très variés, notamment en fonction du foyer initial [18].

2.4. Volume de sang prélevé :

Le volume total de sang mis en culture est de loin le paramètre qui influe le plus sur la sensibilité des hémocultures. Ce volume varie avec la concentration bactérienne sanguine attendue. Cette concentration étant d'environ 100 à 1000 bactéries/ mL chez le nouveau-né et diminuant ensuite avec l'âge pour atteindre environ 1 bactérie/ mL (médiane) chez l'adulte. Le volume total à prélever augmente avec l'âge pour atteindre 40 – 60 mL chez l'adulte. Il existe une relation directe entre le volume total de sang cultivé et le rendement de la technique, un volume insuffisant étant associé à une perte de chance diagnostique.
Chez l'adulte, il est recommandé de prélever à la fois du sang dans des flacons aérobies et anaérobies. Parfois d'autres flacons peuvent être utilisés en cas de recherche spécifiques (flacons pour la recherche de mycobactéries, flacons pour la recherche spécifique de champignons).

Il est recommandé, chez l'adulte, de prélever en routine 2 à 3 paires d'hémocultures (1 paire = 1 flacon aérobie et 1flacon anaérobie) correctement remplis (8 à 10 mL de sang par flacon).

En dépit des recommandations, les conditions de prélèvement ne sont pas toujours respectées à la fois pour ce qui concerne le respect des règles d'asepsie (risque de faux positifs : détection de bactéries non pathogènes le plus souvent d'origine cutanée) et des volumes sanguins à prélever (risque de faux négatifs). Le prélèvement de volumes sanguins insuffisants est également un phénomène fréquent. Il a ainsi été observé, lors d'une étude menée dans 55 centres hospitaliers en France, que les flacons d'hémocultures étaient insuffisamment remplis dans 33 à 52% des cas, avec un volume moyen de sang par flacon variant de 2,8 à 9,3 mL. Il est à souligner que le prélèvement « d'une hémoculture solitaire » est également une pratique encore fréquente [22].

2.5. Stratégie de prélèvement :

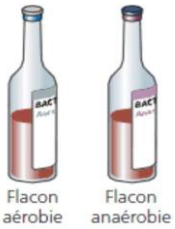
Il existe deux stratégies de prélèvement des hémocultures : le prélèvement multiple et le prélèvement unique (Figure 7).

Le **prélèvement multiple** consiste à prélever les flacons d'hémocultures sur un intervalle de temps en général de 24heurs, et nécessite donc plusieurs ponctions veineuses.

Le **prélèvement unique** consiste à prélever les différentes paires d'hémoculture en une seule ponction.

Prélèvement multiple : 1 paire de flacons/ ponction en 2 à 3 prélèvements.

Prélèvement unique : 2 à 3 paires de flacon en un prélèvement.



Hémoculture solitaire, 1 paire de flacon en 1 prélèvement

Figure 7 : Prélèvement multiple et prélèvement unique chez un adulte

Le prélèvement unique est fortement recommandé en dehors d'un contexte d'endocardite. Dans ce dernier cas, les critères utilisés pour le diagnostic de ces infections nécessitent la réalisation de prélèvements multiples.

Ces deux types de prélèvement présentent la même sensibilité, à nombre de flacons égal et à remplissage égal. En effet, l'intervalle entre deux prélèvements n'influe pas sur la qualité du diagnostic, même si cet intervalle de temps est nul. Il a également été démontré que le prélèvement au moment des pics fébriles n'améliorait pas la sensibilité de l'examen. Cependant, le prélèvement unique présente par rapport au prélèvement multiple de nombreux avantages : un

meilleur confort pour le patient, un risque moindre d'accident d'exposition au sang et de contamination, et la possibilité d'instaurer plus rapidement une antibiothérapie probabiliste après le prélèvement (Tableau 2).

Il est à souligner qu'un inconvénient majeur du prélèvement multiple est d'augmenter le risque de prélèvement d'un volume total insuffisant en raison d'un contrôle plus difficile du volume total prélevé et d'une augmentation du risque d'hémocultures solitaires [22].

	Prélèvements multiples	Prélèvement unique
Nombre de ponction	2 à 3	1
Nombre de flacon	4 à 6	4 à 6
Sensibilité	Equivalente	
Taux de contamination	Modéré	Faible
Fréquence de l'hémoculture solitaire	Elevée	Faible
Interprétation du résultat	Confrontation clinico-biologique	
Avantages		-Confort du patient (1 seule ponction) -Antibiothérapie instaurée rapidement

Tableau 2: Caractéristiques, avantages et inconvénients des protocoles de prélèvements d'hémocultures [25]

2.6. Étiquetage et acheminement :

Afin d'assurer une incubation rapide des flacons d'hémoculture, ces derniers doivent être acheminés le plutôt possible au laboratoire de bactériologie. Il est indispensable d'étiqueter correctement chaque flacon, et de rédiger une demande sur laquelle figureront le nom, le prénom, l'âge et le service d'hospitalisation du patient, ainsi que la date, l'heure et le mode de prélèvement. Les renseignements cliniques et une éventuelle antibiothérapie en précisant sa nature sont importants pour une prise en charge optimale des hémocultures [21].

3. DÉMARCHES DIAGNOSTIQUE :

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.

3.1. Durée d'incubation des hémocultures :

La durée d'incubation varie en fonction du système d'hémoculture (manuel ou automatisé).

Les flacons d'hémoculture sont placés à l'étuve à 35 +/-2°C pour une durée d'incubation de 7 jours jusqu'à 10 jours pour les systèmes manuels.

Une incubation de 5 jours est suffisante pour les systèmes automatisés [23].

3.2. Détection de la croissance bactérienne :

3.2.1. Examen macroscopique :

Système manuel :

La lecture des flacons (aspects macroscopique des milieux) se fait tous les jours ou mieux deux fois par jour. Cet examen consiste à examiner certains aspects macroscopiques pouvant témoigner d'une culture probable de bactéries :

- Trouble du milieu de culture
- Hémolyse des hématies
- Présence de gaz qui évoque les bactéries anaérobies.
- Présence d'un coagulum pour *S. aureus*.
- Présence de colonies au fond du flacon pour les *Streptococcus* spp, *Nocardia* spp [23].

Système automatisé :

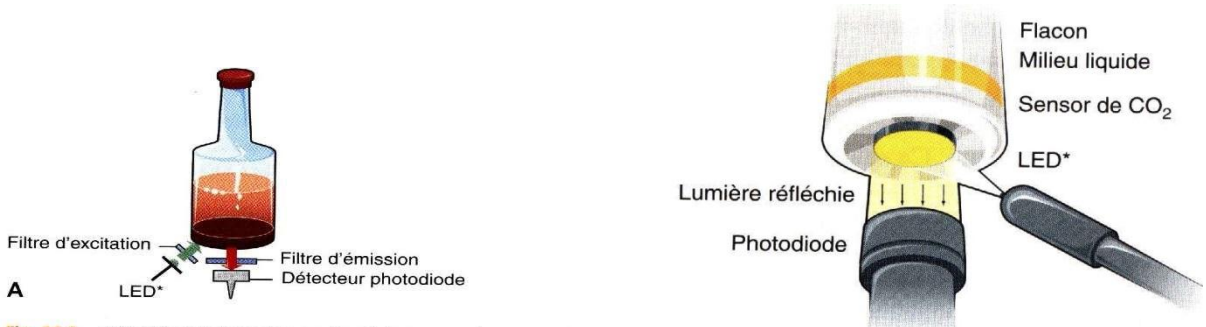


Fig. 11.3. – *Détection de la croissance bactérienne par les automates.*
A) Par fluorescence pour le Bactec® (Becton Dickinson) ;
B) Par réflectométrie pour le BacT/ALERT® (bioMérieux).
* LED = *Light-Emitting Diode*

Figure 8 : principe de détection du système automatisé

3.2.2. Examen microscopique des flacons positifs :

Quel que soit le système utilisé, le bouillon de culture est prélevé de façon aseptique après avoir désinfecté l'opercule du flacon à l'aide d'une seringue ou du dispositif fourni par le fabricant. L'examen du bouillon est effectué en deux étapes :

- ✓ Etat frais afin d'observer la morphologie et la mobilité des bactéries.
- ✓ Coloration de Gram pour déterminer la morphologie et le mode de groupement des bactéries (Cocci ou bacille) et le caractère tinctorial (Gram positif ou négatif) (Tableau 3).

Tout résultat positif de l'examen direct doit être communiqué rapidement au clinicien.

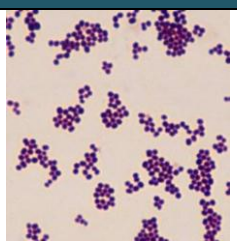
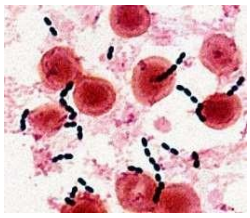
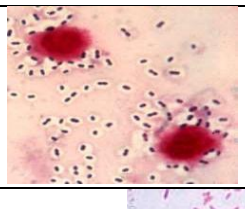
Famille des bactéries/ Espèce bactérienne	Aspect microscopique à la coloration de Gram
Staphylococcaceae	
Streptococcaceae (Streptococcus/ Enterococcus)	
Streptococcus pneumoniae	
Bacilles à Gram négatif	

Tableau 3: Aspects microscopiques des principales bactéries responsables de bactériémies

L'examen microscopique peut être trompeur et l'orientation initiale pourra être corrigée lors de la mise en culture [18].

3.2.3. Repiquage et isolement des micro-organismes:

Les repiquages des flacons sont effectués en fonction de l'examen microscopique. Les cultures étant généralement mono microbiennes, des milieux gélosés non sélectifs seront utilisés : géloses Columbia avec 5 % de sang incubées en aérobiose pendant 48 heures et en anaérobiose pendant 5 jours, géloses au sang cuit enrichies placés sous CO_2 pendant 48 heures lorsqu'un *Haemophilus* spp. ou une *Neisseria* spp. sont évoqués.

Lorsqu'un mélange de bactéries est suspecté, des milieux sélectifs pourront alors être utilisés (gélose acide nalidixique-colistine, par exemple).

Le choix de l'atmosphère (aérobiose, CO_2 ou anaérobiose) pour l'incubation de ces milieux à 35 +/-2 °C dépend du diagnostic présomptif.

Les flacons sont conservés à température ambiante pour un éventuel nouveau repiquage ultérieur si les cultures sont restées négatives [18].

3.2.4. Méthodes d'identification des bactéries isolées :

L'identification des micro-organismes est une des fonctions principales des laboratoires de microbiologie.

Elle est réalisée par des techniques en perpétuelle évolution. Historiquement, une identification dépendait de :

- Tests conventionnels : aspect macroscopique et examen microscopique à l'état frais et après coloration de Gram des colonies,
- Conditions de culture en milieu solide ou liquide (tolérance à l'oxygène : bactéries aérobies, anaérobies, microaérophiles…),
- Etude du métabolisme bactérien grâce à des techniques biochimiques d'identification.

Au début des années soixante-dix, les industries ont introduit des galeries miniaturisées comportant différents tests pour permettre la standardisation et la démocratisation de certains diagnostics d'espèces.

Vingt ans plus tard, les laboratoires industriels ont développé des systèmes automatiques d'identification bactérienne, comme les appareils Vitek-2® (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France), ou BD Phoenix® (Becton Dinckinson, Diagnostics Systèmes, France) équipés d'étuves intégrées permettant des incubations raccourcies (2 à 6 heures) par rapport aux galeries traditionnelles. Ces systèmes comparent le profil obtenu de la souche avec ceux de leur banque

de données. Certains des automates commercialisés réalisent dans le même temps l'antibiogramme. Ces appareils sont très performants pour l'identification des entérobactéries mais certains tests « traditionnels » restent nécessaires, principalement pour l'identification des Cocci à Gram positif.

L'apparition de milieux chromogènes a permis de révéler des activités enzymatiques spécifiques de genre ou d'espèce, se traduisant par la coloration des colonies. Le diagnostic phénotypique est conforté par l'analyse de la sensibilité aux antibiotiques car les bactéries possèdent des résistances naturelles permettant de les classer dans des groupes d'espèces.

3.2.4.1. Aspect macroscopique des colonies :

L'aspect des colonies (taille, contour, couleur, odeur) permet une orientation présomptive du diagnostic (Tableau 4).

Famille des bactéries	Aspect des colonies
Staphylococcaceae	
Streptococcaceae	
Streptococcus pneumoniae	
Entérobactéries	
Pseudomonas	

Tableau 4: Aspects des colonies des principales bactéries isolées

3.2.4.2. Tests d'orientation :

Plusieurs tests d'orientation sont utilisés à partir des colonies

- Recherche de la catalase pour les bactéries à Gram positif selon la réaction :

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} H_2O + \tfrac{1}{2} O_2$$

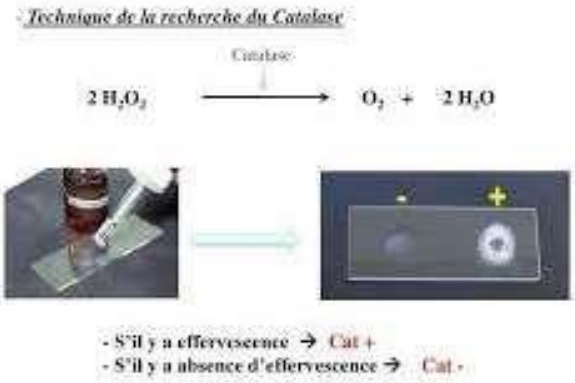


Figure 9 : Technique de recherche de la catalase

- Recherche de l'oxydase pour les bactéries à Gram négatif :

En présence d'un chlorhydrate de diméthyl paraphénylène diamine se forme un complexe violet au contact de cette enzyme.

Figure 10 : Test de l'oxydase

- Recherche de la coagulase pour les staphylocoques : La coagulation du plasma de lapin oxalaté par une coagulase s'effectue à partir d'un bouillon enrichi comme le bouillon staphylocoagulase.

3.2.4.3. Identification biochimique (Galerie 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.

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.

Ces tests étaient initialement unitaires, puis ont été inclus dans des galeries miniaturisées (Figure 11) comme les galeries API (bioMérieux).

Figure 11: Galeries miniaturisées API

3.2.4.4. 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 (Figure 12) utilise des cartes plastiques renfermant des micro cupules (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 [24].

Figure 12: Vitek2, bioMérieux

3.2.4.5. Identification par spectrométrie de masse :

L'identification en microbiologie clinique a connu une « révolution » depuis quelques années avec l'introduction de la spectrométrie de masse de type « Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/Time of Flight » (MALDI TOF). Cette dernière permet l'obtention d'une identification précise en quelques minutes, avec un inoculum très faible et avec des performances élevées. Néanmoins, l'acquisition d'un spectromètre de masse nécessite un volume journalier d'au moins 50 identifications, seuil à partir duquel le coût de l'identification devient inférieur à ceux des galeries d'identification automatisée par technique biochimique.

La spectrométrie de masse s'intéresse à la mesure de la masse de molécules ou d'atomes présents dans un échantillon. Le principe de cette mesure repose sur la possibilité pour un flux d'ions d'être dévié par un champ électrique et/ou magnétique, les trajectoires étant proportionnelles à la masse et à la charge de chacun des ions. Ce principe impose aux molécules et atomes d'un échantillon d'être préalablement transformés en ions en phase gazeuse, avant d'être analysés par un spectromètre de masse.

La spectrométrie de masse grâce à son pouvoir de résolution très élevé, est considérée comme une technique pouvant être utile à l'identification microbienne, à la taxonomie, et à l'analyse de la composition de la cellule bactérienne. Technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse et de caractériser leur structure chimique.

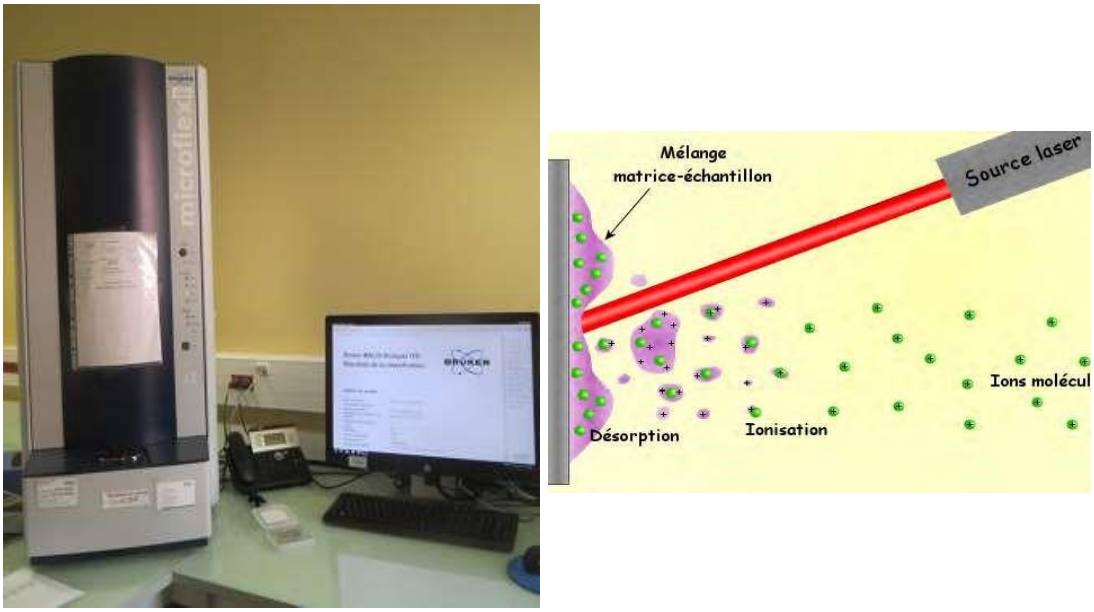


Figure 13 : Spectrométre de masse, Bruker

3.2.4.6. Identification par les méthodes moléculaires :

Les technologies d'identification de bactéries en culture reposant sur la biologie moléculaire sont apparues, telles que le séquençage de gènes, permettant de pallier aux erreurs ou aux échecs d'identification biochimiques. Ce séquençage a maintenant remplacé l'hybridation ADN-ADN comme gold standard pour l'identification universelle des bactéries.

La cible universelle la plus fréquemment utilisée en bactériologie pour le diagnostic de genre ou d'espèce est l'ADN ribosomal 16S (ADNr 16S). Tous les micro-organismes possèdent en effet au moins une copie des gènes codant pour les ARN ribosomaux. La séquence nucléotidique de l'ADNr 16S présente des régions hautement conservées et communes à toutes les bactéries, alors que d'autres régions sont spécifiques d'espèce. L'amplification par PCR (Polymérase Chain Reaction) de l'ADNr 16S se fait à l'aide d'amorces situées sur ces régions conservées entourant une région variable. Les segments amplifiés sont séquencés et analysés par comparaison avec ceux déposés dans les banques de données. Trois banques sont consultables: European Molecular Biology Laboratory (EMBL) en Europe (Cambridge, European
Bioinformatics institute), Gen Bank aux USA (National Center for Biotechnology Information) et Bio Informatic Bacteria Identification (BIBI) en France (Lyon). L'ADNr 16S ne permet pas l'identification précise de certains genres bactériens, comme les entérobactéries ou les streptocoques, dont les séquences de l'ADNr 16S sont très proches. Il est recommandé d'utiliser d'autres cibles plus spécifiques si le diagnostic classique s'oriente vers ce type de bactéries : par exemple la superoxide dismutase (SodA) pour les staphylocoques à coagulase négative, une région spécifique du gène de l'RN polymerase bêta-subunit (*rpo*B) pour les entérobactéries ou pour les streptocoques.

Ces techniques basées sur la PCR suivies de séquençage sont cependant lourdes à mettre en œuvre et ne peuvent pas être implantées dans tous les laboratoires de microbiologie. L'apparition de kits miniaturisés de diagnostic par PCR en temps réel utilisés directement sur les prélèvements sans extraction d'ADN préalable ont permis de simplifier à l'extrême les différentes étapes de PCR, tout en gagnant 24 heures par rapport à la culture, et rendant possible, pour certaines identifications ciblées et urgentes, leur utilisation dans les laboratoires de routine. Néanmoins, ces techniques sont réalisées à partir d'un prélèvement pour lequel une bactérie particulière est recherchée ou a une probabilité élevée d'être présente. Elles ont aussi l'inconvénient d'être très onéreuses.

In fine, devant soit la lourdeur soit le coût des nouvelles techniques de diagnostic disponibles dans les laboratoires de microbiologie, l'identification phénotypique est demeurée la règle, malgré son délai de réponse et son manque de robustesse.

3.3. Test de la sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme) :

L'antibiogramme vise à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'une ou de plusieurs molécules d'antibiotiques, plusieurs méthodes sont utilisées ; méthode de diffusion en gélose et méthode en milieu liquide (Vitek 2 par exemple).

L'antibiogramme par la méthode de diffusion est l'une des plus anciennes approches de détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Elle demeure l'une des méthodes les plus utilisées en routine.

L'antibiogramme par la méthode de diffusion permet une variété dans le choix des antibiotiques et ne requiert aucun matériel particulier.

C'est une méthode qui consiste à déposer à la surface d'une gélose, ensemencée par la souche bactérienne à étudier, des disques de papier filtre imprégnés d'une charge antibiotique à tester. Les antibiotiques diffusent dans la gélose à partir des disques. Il s'établit ainsi un gradient de concentrations d'antibiotique.
Ces concentrations sont inversement proportionnelles à la distance du disque. Près du disque, où il y a une forte concentration d'antibiotique.

Les systèmes semi-automatisés ou automatisés de détermination de la sensibilité aux antibiotiques par dilution en bouillon peuvent être divisés en trois groupes selon leur principe : les systèmes qui incluent une gamme de concentrations, ceux qui testent uniquement les concentrations critiques, et les systèmes « rapides » basés sur des concentrations d'épreuve.
Le Vitek 2 est basé sur un principe de calcul des CMI à partir d'un algorithme appliqué à la vitesse de croissance en l'absence et en présence d'antibiotique avec une incubation de 6-8 h.
Les caractéristiques des deux méthodes sont résumées dans le Tableau 5.

L'adaptation précoce de l'antibiothérapie aux données de l'antibiogramme, pour réévaluer un traitement inefficace ou pour réduire le spectre de l'antibiothérapie améliore de manière significative le pronostic des patients. Il est important que le laboratoire mette les données de l'antibiogramme à disposition des cliniciens le plus rapidement possible.

La réalisation de l'antibiogramme directement à partir des flacons d'hémoculture détectés positifs peut être envisagée.

	Vitek 2	Milieu solide
Automatisation de la préparation de l'antibiogramme	NON	NON
Incubation automatique	OUI	OUI/ NON
Prise en charge de l'inoculum	NON	OUI
Lecture sans incubation	NON	OUI
Délai de rendu	5-14h	5-18h
Réactifs captifs	OUI	NON
Choix des antibiotiques par l'utilisateur	NON	OUI
Contrôles visuel des résultats	NON	OUI
Contrôle visuel de la pureté	NON	OUI
Système Expert	OUI	Oui/ NON
Expert modifiable	NON	OUI
Mise à jour de l'Expert annuel	NON	OUI
Gestion des contrôles de qualité	OUI	OUI
Historique en ligne	NON	OUI
Epidémiologie	OUI mais, + un autre logiciel	OUI
Fonctionnement en multiutilisateur	NON	OUI
Solution dégradée	NON	OUI

Tableau 5 : Caractéristiques des principales méthodes d'antibiogramme

3.4 Interprétation des résultats :

3.4.1. Hémocultures positives :

L'interprétation des hémocultures positives est simple si le même microorganisme est retrouvé à partir de plusieurs flacons et si la clinique est évocatrice. De plus, lorsqu'un pathogène spécifique (*Brucella* spp., *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Haemophilus* spp., *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, bactéries du Groupe HACEK, *Pasteurella* spp., *Campylobacter* spp. et les *Bacteroides* spp.) est retrouvé, même à partir d'une seule hémoculture positive, l'étiologie de l'infection ne fait aucun doute (Tableau 6).

Interprétation d'un ou plusieurs flacon (s) positif (s)				
Nature du microorganisme	**Nombre de flacon (s) positif (s)**	**Nombre total d'hémocultures réalisées**	**Renseignements cliniques**	**Conduite à tenir**
Staphylocoque à coagulase négative (SCN), *Cutibacterium acnes*, streptocoque α-hémolytique, *Bacillus* spp.	1 ou 2 d'une même paire		Pas d'orientation clinique	Contamination probable
		≥ 2	Service d'onco-hémato, réanimation, cathéter central, infection associée aux soins	Identification et antibiogramme avec la mention « A interpréter en fonction de la clinique et de l'asepsie
		1	Service de néonatologie	Identification + antibiogramme
		1	Quel que soit le contexte	Identification + Antibiogramme avec la mention « Valeur prédictive positive faible. A interpréter en fonction de la clinique et de l'antisepsie »
	> 2 de 2 paires différentes	≥2	Quel que soit le contexte	Identification + antibiogramme
S. aureus, S. *pneumoniae*, streptocoque β hémolytique, *Enterococcus* spp, Entérobactéries, *P. auruginosa* , Anaérobies, *N.meningitidis*, *Haemophilus* spp., Groupe HACEK, *Brucella* spp., *Pasteurella* spp, *Campylobacter* spp.	≥1	Quel que soit le nombre total	Quel que soit le contexte	Identification + antibiogramme

Tableau 6 : Interprétation des hémocultures positives sur prélèvements multiples [25]

En revanche, lorsqu'un microorganisme commensal est isolé sur les deux flacons d'une seule hémoculture ou à partir d'un seul flacon, une distinction entre souillure et véritable

infection s’impose. Cette interprétation est possible avec une étroite collaboration avec le clinicien, ce d'autant plus que les microorganismes isolés appartiennent généralement à la flore cutanée et/ou environnementale (Tableaux 6 et 7). La réalisation d'une hémoculture unique devrait être bannie de la pratique clinique en raison de son interprétation délicate. Ce problème se rencontre, également, lorsque le patient est porteur de matériel étranger (cathéter et prothèse) puisque des staphylocoques à coagulase négative, particulièrement Staphylococcus epidermidis, sont majoritairement isolés d'hémocultures [6].

Signification d'un ou plusieurs flacon (s) positif (s)				
Microorganisme	Nombre de flacons positifs	Nombre de flacons prélevés	Renseignements cliniques	Conduite à tenir
SCN, *Cutibacterium acnes*, streptocoques α hémolytique, *Bacillus* spp.	1	4 à 6	Pas d'orientation clinique	Contamination probable
			Service d'oncohémato, réanimation, cathéter central, infection associée aux soins	Identification avec la mention « Valeur prédictive positive faible. Antibiogramme sur demande. A interpréter en fonction de la clinique et de l'asepsie
		1 ou 2	Service de néonatologie	Identification + antibiogramme
		2	Quel que soit le contexte	Identification + Antibiogramme avec la mention « Valeur prédictive positive faible. A interpréter en fonction de la clinique et de l'antisepsie »
	2-3	4 à 6	Quel que soit le contexte	Identification sur tous les flacons + Antibiogramme sur un flacon (sur 2 flacons en cas de SCN) avec la mention « A interpréter en fonction de la clinique et de l'antisepsie »
	>3	4 à 6	Quel que soit le contexte	Identification sur tous les flacons + Antibiogramme sur un flacon (sur 2 flacons en cas de SCN)
S. aureus, *S. pneumoniae*, Streptocoque β hémolytique, *Enterococcus* spp, Entérobactéries, *P. auruginosa* , Anaérobies, *N. meningitidis*, *Haemophilus* spp., Groupe HACEK, *Brucella* spp., *Pasteurella* spp, *Campylobacter* spp.	≥1	6	Quel que soit le contexte	Identification + antibiogramme

Tableau 7 : Interprétation des résultats d'hémocultures avec le prélèvement unique [25]

3.4.2. Hémocultures négatives :

Les hémocultures négatives signent le plus souvent une absence réelle de bactéries dans le sang. Cependant, devant un contexte clinique évocateur de sepsis, d'endocardite infectieuse ou de tout autre syndrome infectieux, une fausse négativité peut être évoquée. Les causes d'échec de cultures sont nombreuses : prélèvement effectué au moment non optimal, trop tardivement au cours de l'infection ; prélèvement pratiqué sous antibiothérapie ; quantité insuffisante de sang ensemencé ; infection localisée sans bactériémie ; micro-organisme de croissance difficile, ou enfin origine non bactérienne.

Des repiquages négatifs d'hémocultures dus à un micro-organisme de croissance difficile impliquent que le choix des conditions de subcultures n'est pas adapté et/ou le temps de culture trop court. En effet, pour certains microorganismes ayant des exigences nutritives particulières, les subcultures pourront se faire sur des milieux différents et en atmosphère adaptée en fonction de la morphologie et du contexte clinique, notamment pour les bactéries comme *Brucella* spp., *Campylobacte*r spp., *Legionella* spp., *Mycoplasma* spp., les bactéries du groupe HACEK, ou des bactéries anaérobies [6].

VII. PRISE EN CHARGE THÉRAPEUTIQUE DES PATIENTS :

1. Définition d'antimicrobiens et antibiotiques :

Sur base de l'étymologie du mot « antimicrobien» (du grec *anti* : contre, *mikros* : petit et *bios* : vie), on définit un composé de ce type comme toute substance capable d'agir contre la vie des microorganismes. L'adjectif antibiotique (du grec *anti* : contre, *biotikos* : concernant la vie) utilisé pour la première fois en 1889, en référence à une substance synthétisée par un organisme pour en détruire un autre, se précisera plus tard, comme une substance chimique produite par un microorganisme et disposant en solution diluée de la capacité d'inhiber sélectivement la croissance voire même de détruire d'autres microorganismes. Les composés utilisés à des fins thérapeutiques lors de maladies bactériennes chez l'homme et les animaux sont fréquemment appelés, par les professionnels de la santé ainsi que par les profanes : antibiotiques. Pourtant, ce terme est bien souvent utilisé de façon erronée et subit régulièrement un élargissement de son sens. En effet, la définition du mot antibiotique réfère strictement aux substances antimicrobiennes d'origine naturelle, et selon cette notion, ce terme ne devraient donc pas être employé pour qualifier des substances synthétiques telles

que les sulfamidés et les quinolones, ou semi-synthétiques telles que l'amoxicilline et l'amikacine [26].

2. Antibiothétapie :

La prise en charge thérapeutique repose sur une antibiothérapie probabiliste, celle-ci est démarrée directement après la réalisation des prélèvements puis ajustée en se basant sur les résultats de l'antibiogramme. La voie d'administration est parentérale. Le passage vers la voie orale est possible, en l'absence de signes de gravité, d'endocardite, de vomissements ou de malabsorption et à condition que l'antibiotique ait une bonne biodisponibilité.

L'antibiotique choisi doit être bactéricide, une bithérapie peut être indiquée dans le but d'élargir le spectre en cas de sepsis nosocomial, pour augmenter la vitesse de bactéricidie en cas de sepsis ou de choc septique, ou afin de limiter l'émergence de mutants résistants.

Parallèlement à la prescription d'antimicrobiens, un contrôle rapide de la source d'infection et le retrait précoce des dispositifs intravasculaires éventuels sont effectués.
Une évaluation approfondie de la présence de facteurs de risque pour l'acquisition d'une bactériémie à bactérie multi-résistante (BMR) est importante. La connaissance de l'épidémiologie locale est essentielle. Une éventuelle colonisation antérieure par des BMR est prise en compte, car elle augmente le risque d'acquisition d'une infection due au même microorganisme.
En dehors d'une endocardite, la durée de l'antibiothérapie est généralement de 5 à 10 jours et parfois peut atteindre 14 jours, celle-ci étant conditionnée par l'agent infectieux en cause, le foyer infectieux initial, la présence ou pas de localisations septiques secondaires et par le terrain.
Dans le cas d'une bactériémie à *S. aureus*, un examen clinique à la recherche de localisations secondaires ainsi qu'une échocardiographie à la recherche d'une endocardite sont systématiques.
L'antibiothérapie doit être parentérale et d'une durée de 14 jours si la bactériémie est non compliquée, en l'absence de localisations secondaires avec négativation précoce des hémocultures, dans le cas contraire, la durée du traitement antibiotique est prolongée de 2 à 6 semaines.
Les tableaux 8 à 10 résument l'antibiothérapie à envisager selon le foyer infectieux initial en présence de signes de gravité, en fonction de l'examen direct de l'hémoculture et du caractère communautaire ou associé aux soins de la bactériémie ainsi que le traitement antibiotique adapté à chaque agent pathogène.

Foyer digestif, voies biliaires (Infection communautaire)	G3G (Céfotaxime ou Céftriaxone) ou Fluoroquinolone si allergie + Métronidazole ± Aminoside
Urinaire (Infection communautaire)	G3G (Céfotaxime ou Céftriaxone) ou Aztréonam si allergie + Aminoside
Pneumonie aigue communautaire	G3G (Céfotaxime ou Céftriaxone) + Macrolide ou Levofloxacine
Pas de foyer (Infection communautaire)	G3G (Céfotaxime ou Céftriaxone) ± Aminoside
Pas de foyer (Infection associée aux soins)	β-lactamine à large spectre (Pipéracilline-tazobactam, Céfépime, Céftazidime ou Méropéneme) + Amikacine ± Vacomycine ± Echinocandine selon le terrain

Tableau 8 : Antibiothérapie probabiliste en présence de signes de gravité [21]

Examen direct	Antibiothérapie de 1ère intention	Alternative
Bactériémies communautaires		
Cocci à Gram positif type staphylococcique	Oxacilline + Vancomycine ± Gentamicine	
Cocci à Gram positif type Streptocoque	Amoxicilline ou G3G (Céfotaxime ou Ceftriaxone)	
Bacilles à Gram négatif	G3G (Céfotaxime ou Céftriaxone) ± Gentamicine	Fluoroquinolone ± Gentamicine
Bactériémies associées aux soins		
Cocci à Gram positif	Vancomycine ± Gentamicine	Daptomycine (sauf si pneumonie) + Gentamicine
Bacilles à Gram négatif	Ureidopénicilline associée à un inhibiteur de β-lactamase ou Céfépime ou Carbapénème + Amikacine	

Tableau 9 : Antibiothérapie selon l'examen direct et le caractère communautaire ou associé aux soins [21]

Agent pathogène	Antibiothérapie de 1ère intention	Alternative
Staphylocoque sensible à la méticilline	Pénicilline M ± Aminoside	
Staphylocoque résistant à la méticilline	Vancomycine ± Aminoside	Daptomycine ± Aminoside
Pneumocoque	Amoxicilline ou G3G (Céfotaxime ou Ceftriaxone)	
Streptocoques	Amoxicilline ou G3G (Céfotaxime ou Ceftriaxone)	Vancomycine
Entérocoques	Amoxicilline + Gentamicine	Vancomycine + Gentamicine
Entérobactéries	G3G (Céfotaxime ou Ceftriaxone) ± Aminoside	Fluoroquinolone ± Aminoside
Entérobactéries résistantes aux C3G	Carbapénème	
Pseudomonas aeruginosa	Ureidopénicilline associée à un inhibiteur de β-lactamase ou Céftazidime ou Céfépime ou Carbapénème + Aminoside (Amikacine) ou Ciprofloxacine	

Tableau 10 : Antibiothérapie selon l'agent pathogène [21]

En cas de persistance de la fièvre malgré l'instauration d'un traitement antibiotique, il est indispensable de vérifier que les portes d'entrée et les localisations secondaires ont bien été traitées et que les hémocultures sont devenues négatives, il faut également s'assurer que l'antibiothérapie est bien adaptée à l'antibiogramme, que les posologies sont efficaces, que les modalités et le rythme d'administration sont respectés et que l'antibiotique est capable de diffuser au site de l'infection, dans certains cas il est possible de réaliser des dosages plasmatiques des antibiotiques afin de vérifier si la dose thérapeutique est atteinte. La recherche d'une complication iatrogène telle qu'une infection associée aux soins notamment sur cathéter, une fièvre médicamenteuse ou une maladie thromboembolique est intéressante également [21].

CHAPITRE II : RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

I. RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES :

1. Définition :

La résistance bactérienne est la capacité des bactéries à résister ou à se développer en présence des antibiotiques. Elle se manifeste par une croissance des bactéries en présence de concentrations élevées d'antibiotique ou par une augmentation de la concentration minimale inhibitrice par rapport à la sensibilité normale d'un ensemble de bactéries appartenant à une même espèce [18].

1.1. La résistance naturelle ou intrinsèque :

Une résistance intrinsèque se définit comme une caractéristique fonctionnelle ou structurelle conférant une certaine tolérance, voir une insensibilité totale, à tous les membres d'un groupe de bactéries (une espèce, un genre ou parfois un groupe plus grand), vis-à-vis d'une molécule particulière ou vis-à-vis d'une classe d'antimicrobiens. L'absence ou la réduction de sensibilité à un antibiotique peut être due à un manque d'affinité du composé pour la cible bactérienne, une inaccessibilité de la molécule à la cellule bactérienne, une expulsion de l'antibiotique par des pompes à efflux chromosomiques ou encore, à une inactivation enzymatique innée de l'antibiotique [26].

1.2. La résistance acquise :

La résistance acquise se définit comme une caractéristique propre à quelques souches bactériennes d'un genre ou d'une espèce particulière, provoquant l'émergence et la diffusion de résistances au sein de populations de bactéries normalement sensibles. Deux phénomènes majeures sont à la base de l'acquisition de résistances par modifications du génome bactérien, à savoir, les mutations responsables des résistances endogènes, et l'acquisition horizontale de matériel génétique étranger responsable des résistances exogènes. En outre, certaines résistances résultent de l'association d'une mutation et d'un transfert horizontal de gène [26].

2. Mécanisme de résistance :

2.1. Mécanisme génétique de résistance :

Une bactérie peut devenir résistante à un antibiotique par mutation survenant au niveau du gène codant la cible de l'antibiotique au sein du chromosome. Une bactérie peut également acquérir du matériel génétique étranger par incorporation de segments d'ADN libre dans leur

chromosome (transformation). Des gènes de résistance peuvent aussi être transférés lors d'une infection par un bactériophage (transduction) et lors de phénomène de conjugaison de transposons conjugatifs et de plasmides. Le terme général élément transposable désigne une séquence d'insertion ou un transposon qu'il soit composite, complexe ou conjugatif ou un bactériophage transposant ou encore un intégron [26].

ABR : gène de résistance à un antibiotique.

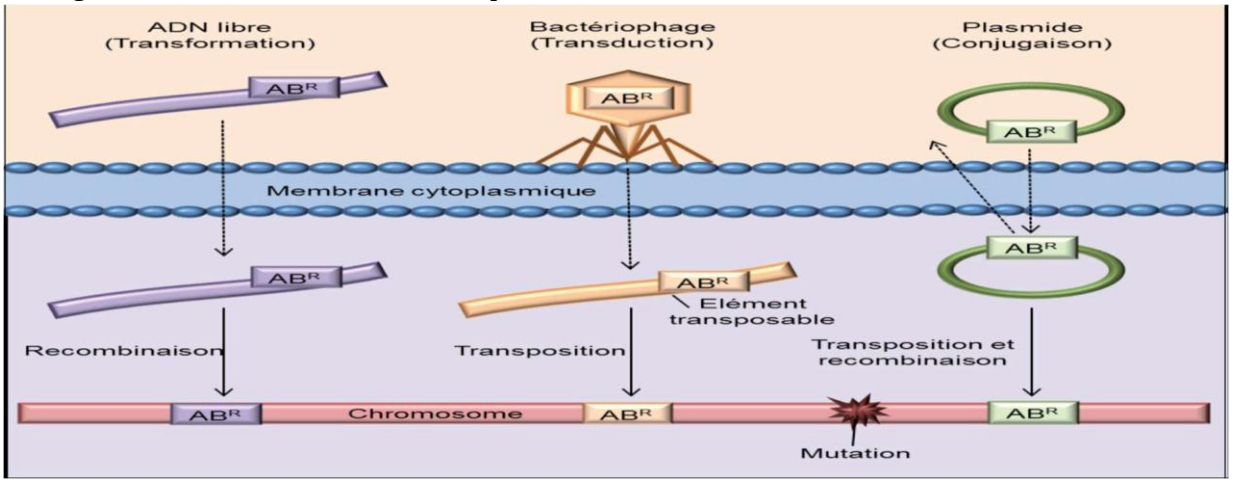


Figure 14: Voies d'acquisition de résistance aux antibiotiques

2.1.1. La résistance chromosomique acquise :

Elle est la conséquence de mutations au sein du génome d'une bactérie. Ces mutations spontanées sont une cause mineure de résistance aux antibiotiques (moins de 20%). Elles se transmettent verticalement au sein du clone bactérien concerné. Leur aspect revêt un caractère de modification de la cible des antibiotiques [18].

2.1.2. La résistance extra-chromosomique :

Elle a pour support des éléments génétiques mobiles : plasmides, transposons ou intégrons. Elle représente plus de 80% des résistances acquises aux antibiotiques. Elle se transmet horizontalement d'une bactérie à l'autre, y compris entre espèces différentes [18].

2.1.3. Les plasmides :

Les plasmides conjugatifs sont des molécules d'ADN extra-chromosomique capables d'une réplication autonome régulée par eux-mêmes et d'échanges (réplication du plasmide suivie de son transfert) au sein de populations bactériennes grâce au phénomène de conjugaison via un appendice de transfert, le pilus, codé par le plasmide et localisé en surface de la bactérie.

Les plasmides ne sont pas essentiels à la survie de la bactérie. Cependant ils sont porteurs de gènes conférant un avantage sélectif à la cellule qui les possède. Des plasmides de résistance sont identifiés à la fois parmi des bactéries pathogènes et commensales, Gram positives et Gram négatives. Ils sont porteurs de gènes de résistance vis à vis de la majorité des antibiotiques disponibles pour un usage clinique. Les plasmides offrent, aux cellules hôtes, la capacité d'occuper une grande variété de niches écologiques, et contribuent dès lors à l'évolution, non seulement des espèces bactériennes, mais également des plasmides au sein de ces espèces [26].

2.1.4. Les éléments génétiques transposables :

Les éléments transposables sont des séquences d'ADN ayant la capacité de se déplacer et de s'insérer à différents endroits dans un chromosome ou un plasmide par un processus de transposition anarchique. Il existe différentes types d'éléments transposables:

-Les séquences d'insertion (SI) sont de courtes séquences génétiques de 800 à 2000 pb qui codent uniquement pour la transposition.

-Les transposons codent, également, pour les déterminants de la transposition ainsi que pour d'autres fonctions, notamment celle de conférer la résistance [18].

2.1.5. Les intégrons :

Les intégrons sont des systèmes génétiques de capture et sont souvent localisés sur des éléments génétiques conjugatifs tels que les plasmides et les transposons. Ils sont dotés d'une structure spécifique, composée de deux segments conservés encadrant une région centrale dans laquelle peuvent s'insérer les « cassettes » de gène de résistance aux antimicrobiens. Les cassettes de gènes sont des éléments génétiques circulaires et libres d'environ 500 à 1000 paires de bases qui ne possèdent pas de région promotrice et qui ne peuvent donc pas être exprimées seules.
Un intégron peut incorporer successivement plusieurs cassettes. Les intégrons sont aussi bien répartis parmi les bactéries à Gram négatif que à Gram positif, et semblent d'ailleurs impliqués parmi ces dernières dans la dissémination de gènes de résistance autrefois supposés restreints aux bactéries à Gram négatifs. Des études, réalisées sur des populations de bactéries collectées au niveau des hôpitaux et de différents sites agricoles, ont révélé la présence de nombreux intégrons complets, disposant de cassettes de gènes de résistance, ce qui souligne l'importance du processus de capture de gènes médié par ces éléments particuliers au cours de l'évolution des résistances aux antibiotiques [26].

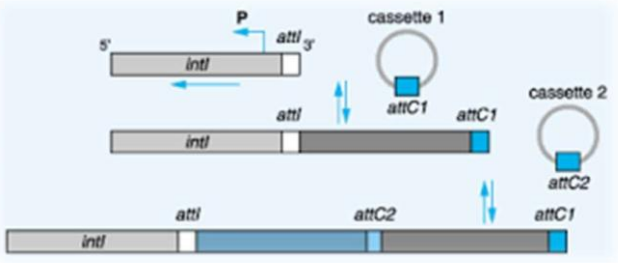


Figure 15: Structure des intégrons

2.1.6. Les bactériophages :

Les bactériophages ou phages sont des virus infectant les bactéries. Les bactériophages sont responsables de l'infection des bactéries et sont parfois également impliqués dans le transfert de matériel génétique entre bactéries au cours d'un procédé nommé transduction. Des expériences de laboratoire ainsi que des souches sauvages attestent le rôle de la transduction dans le développement des résistances aux antimicrobiens [26].

2.2. Mécanismes biochimiques de la résistance :

Plusieurs mécanismes ont été développés par les bactéries afin de neutraliser l'action des antibiotiques. Une bactérie peut présenter un ou plusieurs de ces mécanismes de résistance illustrés dans la figure 16.

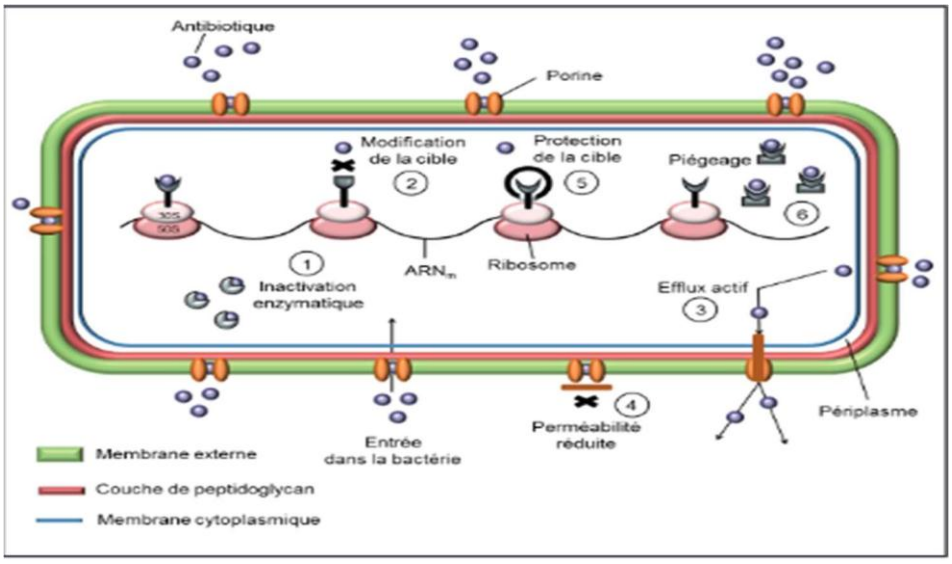


Figure 16 : Principales cibles des antibiotiques

2.2.1. L'inactivation de l'antibiotique par production d'enzymes :

L'inactivation enzymatique de l'antibiotique représente le principal mécanisme de résistance des bêta-lactames, des aminoglycosides, des phénicolés, des macrolides et apparentés, des tétracyclines, de la fosfomycine et des fluoroquinolones.

L'enzyme en modifiant le noyau actif de l'antibiotique par clivage ou par addition d'un groupement chimique, empêche la fixation de l'antibiotique sur sa cible et provoque une perte d'activité. Les réactions biochimiques catalysées par ces enzymes bactériennes sont des hydrolyses, des acétylations, des phosphorylations, des nucléotidylations, des estérifications, des réductions et des réactions d'addition d'un glutathion. Ces enzymes sont généralement associées à des éléments génétiques mobiles [18].

2.2.2. La modification de la cible :

La cible de l'antibiotique peut être structurellement modifiée ou remplacée, de telle sorte que le composé antibactérien ne puisse plus se lier et exercer son activité au niveau de la bactérie. La modification de la cible est particulièrement importante pour les résistances aux pénicillines, aux glycopeptides et aux molécules du groupe MLS chez les bactéries Gram positives, et pour les résistances aux quinolones chez les bactéries Gram positives et Gram négatives. Ce type de résistance peut être la conséquence de l'acquisition de matériel génétique mobile codant une enzyme modifiant la cible de l'antibiotique, ou peut résulter d'une mutation au niveau de la séquence nucléotidique de la cible. Le remplacement de la cible de l'antibiotique est, quant à lui, un mécanisme décrit pour les sulfamidés, les diaminopyrimidines et les bêta-lactames [18].

2.2.3. Le mécanisme d'efflux actif :

L'efflux actif, médié par des protéines transmembranaires connues sous le terme de pompes à efflux ou transporteurs actifs, est un mécanisme nécessitant de l'énergie et utilisé par les bactéries, pour expulser des métabolites et des composés toxiques étrangers tels que des antibiotiques et d'autres médicaments. Ces pompes à efflux ont généralement une spécificité de substrats assez large, et seulement certaines d'entre elles confèrent une résistance aux antibiotiques. La résistance provient de la réduction de concentration en antimicrobien dans le cytoplasme de la bactérie, ce qui prévient et limite l'accès de l'antibiotique à sa cible [26].

2.2.4. Une diminution de la perméabilité de l'antibiotique :

Au sein des bactéries Gram négatives, les antibiotiques hydrophiles pénètrent dans la bactérie via des protéines transmembranaires nommées porines, alors que les molécules hydrophobes diffusent simplement à travers la couche phospholipidique. Des mutations au niveau des gènes qui codent les porines et qui conduisent à leur perte, ou à la réduction de leur taille ou à une diminution de leur expression, se traduiront par l'acquisition de bas niveaux de résistance vis-à-vis de nombreux antibiotiques.

Ce mécanisme de résistance est également décrit chez des bactéries anaérobies pour expliquer leur résistance naturelle aux aminoglycosides ainsi que chez des bactéries anaérobies facultatives telles que les entérocoques et les streptocoques pour expliquer leur faible niveau de sensibilité observé vis-à-vis des aminosides. En effet, cette famille d'antibiotiques pénètre à l'intérieur des cellules bactériennes via un mécanisme de transport dépendant d'un métabolisme aérobie [18].

2.2.5. La protection de la cible par un encombrement ribosomal :

La protection de la cible de l'antibiotique est un mode de résistance bien connu pour la famille des tétracyclines et plus récemment décrit pour les quinolones et les fluoroquinolones. Il existe plus de huit protéines de protection ribosomiale qui confèrent une résistance aux tétracyclines en les déplaçant de leur site de fixation réalisant encombrement stérique au niveau du ribosome.

Depuis quelques années, des souches présentant des résistances sub-cliniques dites à bas niveau aux fluoroquinolones ont été observées. Ces résistances sont notamment dues à la présence de gènes plasmidiques nr (quinolone-resistance). Les protéines nr en se fixant sur les topoïsomérases, cibles des fluoroquinolones, réduisent l'affinité de la famille d'antibiotiques pour leurs cibles. Ce mécanisme a été rapporté parmi différentes bactéries Gram négatives à travers le monde, et des analogues de ces gènes ont également été décrits chez des bactéries Gram positives [18].

2.2.6. Le piégeage de l'antibiotique :

La bactérie peut piéger un antibiotique en augmentant la production de sa cible ou en produisant une molécule possédant une affinité pour ce dernier. Il en résulte une diminution de l'antibiotique au niveau de la cible. Ce mécanisme a été décrit chez de nombreuses espèces bactériennes notamment pour les sulfamidés et le triméthoprime chez qui des mutations chromosomiques sont responsables d'une surproduction de leur cible au niveau bactérien. Ce

mécanisme de résistance est également impliqué chez certaines souches de *S. aureus* pour les glycopeptides et chez l'*E. coli* pour la tobramycine [18].

PARTIE PRATIQUE

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Présentation de l'étude :

Ce travail a consisté en une étude rétrospective et descriptive visant à répertorier le profil bactériologique des bactériémies au CHU de Tizi-Ouzou durant la période pré-COVID et COVID (du 1 janvier 2019 au 31 décembre 2021) et d'évaluer le taux de résistance des principales bactéries aux principaux antibiotiques utilisés en thérapeutiques.

II. Souches bactériennes étudiées :

- **Critères d'inclusion :** Cette étude inclut tous les isolats d'hémocultures positives avec un antibiogramme validés par le biologiste et communiqués au clinicien au niveau du laboratoire de microbiologie du CHU de Tizi-Ouzou.
- **Critères d'exclusion :** Seule une hémoculture positive par patient a été retenue par épisode de bactériémie et ce quel que soit le nombre de flacons positifs avec le même microorganisme et le même phénotype de résistance.

III. Matériel et Méthodes :

Cette étude a concerné l'ensemble des épisodes de bactériémies par patient. Un épisode de bactériémie est défini par la positivité de plusieurs flacons d'hémocultures chez le même patient pendant la même période et avec le même micro-organisme.
Une analyse statistique a été réalisée pour la détermination du taux de positivité des hémocultures, la fréquence des bactéries responsables et la détermination des taux de résistance.
.

1. Analyse microbiologique :

1.1 Phase pré-analytique :

Les prélèvements ont été réalisés au lit du patient, par ponction veineuse au moment des frissons, du pic fébrile ou de l'hypothermie.

Chaque hémoculture est constituée d'une paire de flacons (flacon aérobie et anaérobie).

La nature des flacons d'hémocultures utilisés au CHU de Tizi-Ouzou est fonction de la disponibilité. Deux types de flacons sont utilisés ; flacons Bact/Alert ou flacons en verre avec un bouillon citrate (Fig.17).

Flacons Bact/Alert

Flacons bouillon citrate

Figure 17 : Flacons d'hémocultures utilisés au CHU de Tizi-Ouzou

Le volume de sang prélevé n'étant pas maitrisé, la stratégie multiple est la règle au CHU de Tizi-Ouzou.

Les hémocultures sont prélevées avant toute antibiothérapie et les flacons correctement identifiés sont acheminés rapidement au laboratoire.

Pour une conformité des échantillons, une vérification systématique de l'identité des patients et des fiches de renseignements cliniques accompagnant le prélèvement sont réalisées au laboratoire de Microbiologie.

1.2 Phase analytique :

- **Incubation des flacons :**

En fonction du type du flacon, l'incubation est soit automatisée (Système Bact/Alert) ou manuelle à l'étuve et à une température de 35 ± 2°C.

La durée d'incubation est de 5 à 7 jours pour les systèmes automatisés et jusqu'à 10 jours pour les systèmes manuels. Elle est prolongée à l'étuve de 5 à 20 jours respectivement en cas de suspicion de brucellose ou d'endocardite infectieuse.

- **Détection de la croissance microbienne :**

La détection de la croissance microbienne est continue et automatique pour le système Bact/Alert.

La détection de la croissance est visuelle pour le système manuel. Une lecture quotidienne permet de mettre en évidence un changement de l'aspect macroscopique des bouillons de culture (trouble, hémolyse, présence de gaz…).

Les flacons détectés positifs sont soit déchargés de l'automate ou soit sortis de l'étude pour un examen bactériologique complet.

- **Examens microscopiques**

Quel que soit le système utilisé, des examens microscopiques (état frais et une coloration de Gram) sont réalisés à partir des flacons d'hémoculture aérobies positive.
En cas d'examen microscopique négatif, les flacons sont réincubés.
Les flacons anaérobies positifs ne sont pas analysés.

- **Subculture**

Quel que soit le système, les flacons aérobies détectés positifs font l'objet d'une subculture sur une gélose au sang cuit et sur gélose au sang frais et ce quel que soit le résultat de l'examen microscopique.
Pour ce faire, une goutte du bouillon d'hémoculture est étalée à la surface de la gélose puis incubée.
En fonction des caractères morpho-tinctoriaux des bactéries à l'examen microscopique, une gélose au sang cuit est ensemencée.

La durée et l'atmosphère de l'incubation (aérobie, enrichie en CO_2) sont variables en fonction de l'aspect microscopique des microorganismes à la coloration de Gram. Les boites de sub-cultures sont incubées à 35 ± 2°C pendant 24 à 48 heures.

- **Identification des microorganismes**

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

L'identification est basée sur les caractères morphologiques, culturaux, biochimiques et éventuellement antigéniques.
Plusieurs méthodes d'identification sont utilisées; les tests rapides d'orientation (oxydase, catalase, coagulase), les galeries API ou les cartes Vitek2 (bioMérieux) en fonction de la disponibilité des réactifs.

- **Tests de sensibilité aux antibiotiques**

Les tests de sensibilité aux antibiotiques sont réalisés à partir des subcultures sur toutes les bactéries pathogènes spécifiques et les bactéries potentiellement pathogènes.

Deux méthodes d'antibiogrammes sont utilisées en fonction de la disponibilité des réactifs.

L'antibiogramme par la méthode de diffusion en gélose demeure l'une des méthodes les plus utilisées au laboratoire. Cette méthode est l'une des plus anciennes approches de

détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques et permet une variété dans le choix des antibiotiques et ne requiert aucun matériel particulier. Cette méthode consiste à ensemencer par écouvillonnage une suspension bactérienne de densité 0.5 Mac Farland sur la totalité de la surface d'un milieu standard (Muller Hinton) et à y déposer des disques de papier buvard imbibés d'une charge d'antibiotiques. Les antibiotiques diffusent dans la gélose à partir des disques. Il s'établit ainsi un gradient de concentrations de l'antibiotique. Ces concentrations sont inversement proportionnelles à la distance du disque (près du disque il y a une forte concentration d'antibiotique).

Après une incubation de 18-24 heures à 35± 2°C, le diamètre d'inhibition de la croissance est mesuré manuellement et le résultat est interprété en utilisant un abaque de lecture.

En fonction du diamètre d'inhibition, la souche est catégorisée sensible, intermédiaire ou résistante.

Au laboratoire du CHU, les critères de lecture et d'interprétation sont ceux du CLSI.

La deuxième méthode d'antibiogramme utilisée au laboratoire est la méthode automatisée en milieu liquide (Vitek2, bioMérieux) selon la disponibilité des cartes Vitek2.

1.2.1. Tests complémentaire pour les Staphylocoques et les entérobactéries :

1.2.1.1. Détection de la résistance à l'oxacilline des *Staphylococcus* spp :

Pour le genre *Staphylococcus*, la céfoxitine 30µg est l'antibiotique le plus fiable, utilisé pour la détection de la résistance à l'oxacilline. Il suffit que le diamètre de résistance soit inférieur à 22cm pour que la souche isolée soit considérée comme résistance à l'oxacilline.

1.2.1.2. Détection de la résistance des entérobactéries BLSE:

- **Test de synergie :** La recherche de la BLSE se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme déposant un disque d'amoxicilline + acide clavulanique (AMC 20/10 µg) à 30 mm centre à centre d'un disque de CTX (30µg) ou CRO (30µg) ou CPO (10µg) ou CAZ (30µg) ou ATM (30µg). La production de la β-lactamase à spectre étendue se traduit par l'apparition d'une image de synergie entre les 2 disques.
- **Test du double disque :** Ce test ce fait dans des conditions standards de l'antibiogramme. Déposer un disque d'AMC et un disque de C3G (CTX ou CRO) à une distance 30mm (centre à centre), laisser diffuser les antibiotiques pendant une heure, à température ambiante. Une heure après, remplacer le disque d'AMC par un disque de CTX ou CRO (ou CAZ). Le test à double

disque est positif quand le diamètre d'inhibition autour du C3G, appliqué après diffusion du disque AMC est ≥ 5mm par rapport au diamètre d'inhibition autour du disque de C3G [27].

1.3. Phase post-analytique

Une validation biologique des identifications et des antibiogrammes est assurée par le biologiste de validation avant la libération des résultats. Une confrontation clinico-biologique est la règle pour toute hémoculture positive.

2. Analyse statistique :

Le recueil des données des patients ayant présenté une bactériémie a été réalisé à partir du registre des hémocultures et du logiciel Whonet 8.6.0 utilisé pour archiver les données des hémocultures positives. Les données recueillies sont les caractéristiques démographiques des patients (nom, prénom, sexe, âge), les services prescripteurs, la date, le nombre des hémocultures, l'identification du microorganisme isolé et les résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques. L'analyse des différentes données a été effectuée par le logiciel Excel.

2.1 Logiciel WHONET :

C'est une base de données développée en 1989 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Elle est utilisée dans les laboratoires du monde entier pour la gestion et l'analyse des données de laboratoire de microbiologie, avec un accent particulier sur l'analyse des résultats des tests de sensibilité aux antimicrobiens (Figure 18) [23].

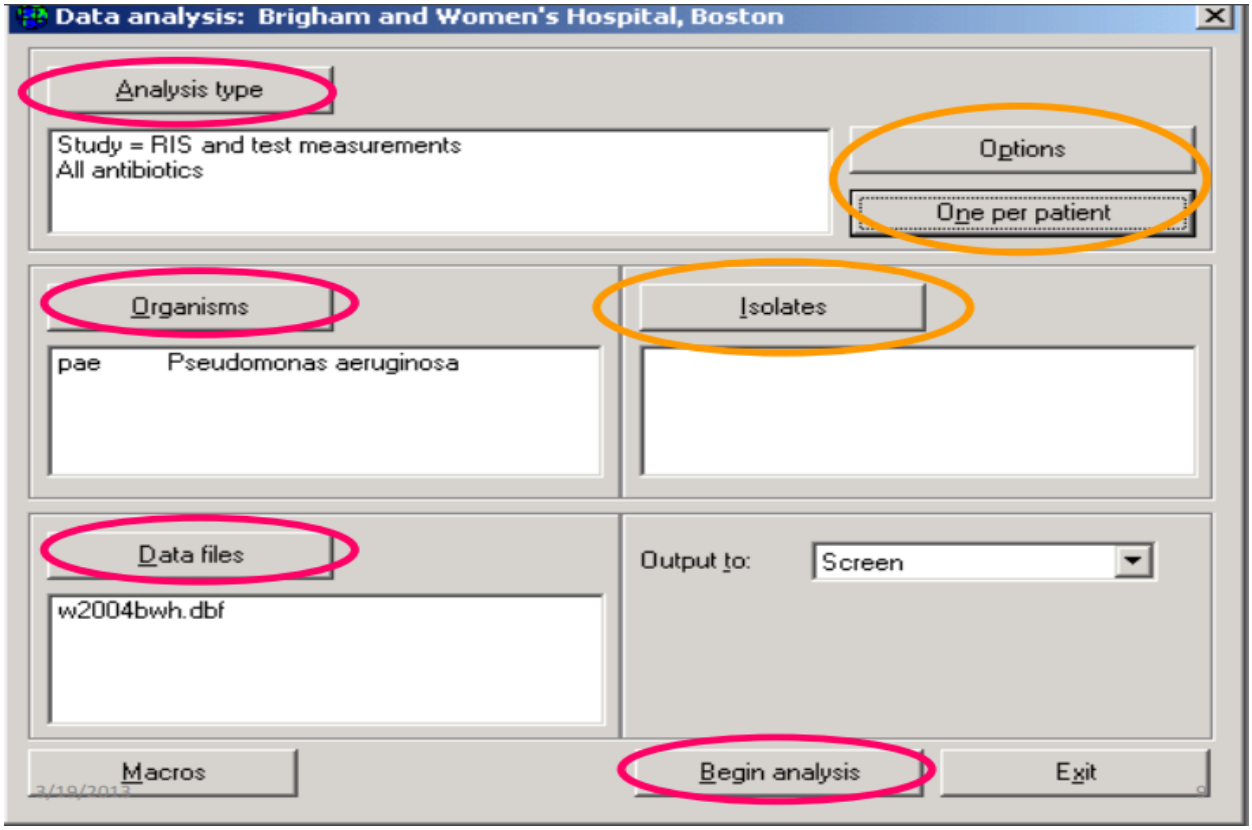


Figure 18: Gestion et analyse des résultats avec WHONET

2.1.1 Les avantages de WHONET :

- La compréhension de l'épidémiologie locale des populations microbiennes.
- La sélection d'agents antimicrobiens.
- L'identification des foyers de la communauté et l'hôpital.
- La reconnaissance des problèmes d'assurance de la qualité dans les tests de laboratoire [23].

RÉSULTATS

I. Résultats Globaux:

1. Nombre d'Hémocultures et taux de positivité :

Le taux de positivité des hémocultures pendant la période de l'étude est de 6%. En effet, 735 hémocultures étaient positives sur un nombre total de 12028 hémocultures réalisées (Fig. 19).

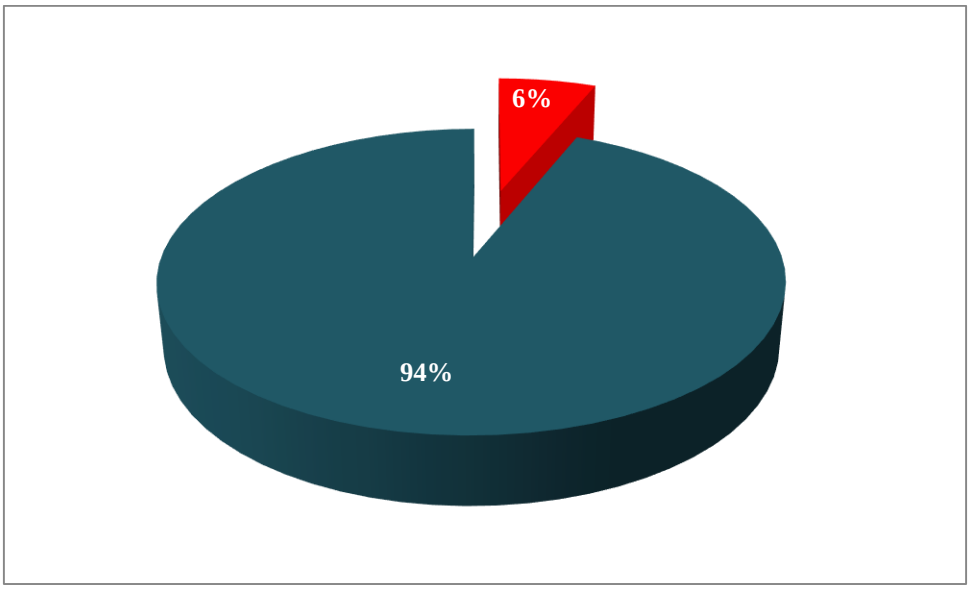


Figure 19: Taux de positivité des hémocultures aux CHU de Tizi-Ouzou

Des épisodes de bactériémie ont été diagnostiqués chez 683 patients. Parmi eux, 20 avaient une bactériémie plurimicrobienne (2 microorganismes).

2. Bactériémies en fonction du sexe des patients :

Les bactériémies étaient plus fréquentes chez l'homme que chez la femme (383 H/ 267F ; Sex-Ratio=1.4). Néanmoins, le sexe n'a pas été précisé pour 33 patients (Fig. 20).

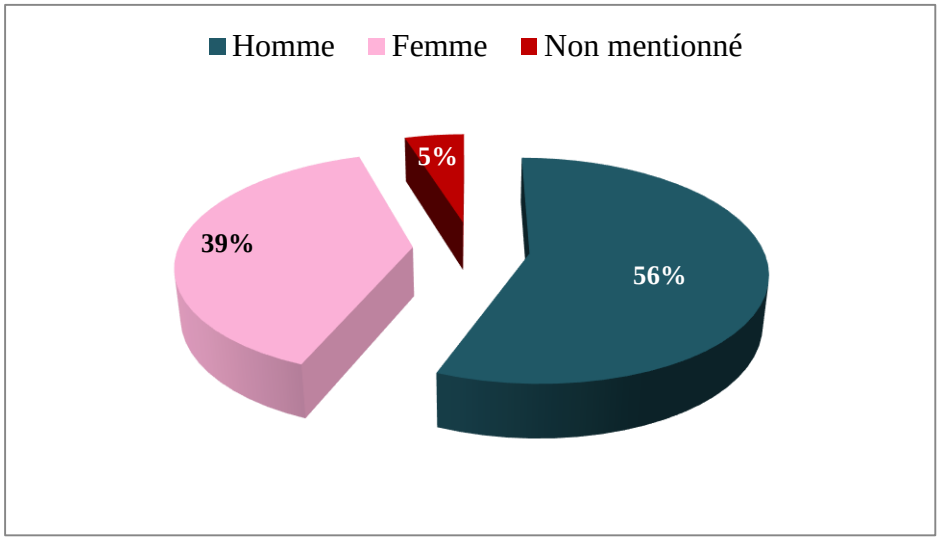


Figure 20: Taux de bactériémie en fonction du sexe

3. Principales bactéries isolées :

Les bacilles à Gram négatif sont les principales bactéries isolées dans les hémocultures au CHU de Tizi-Ouzou (66% des isolats). Les Cocci à Gram positif représentent 34% des isolats (Fig 21).

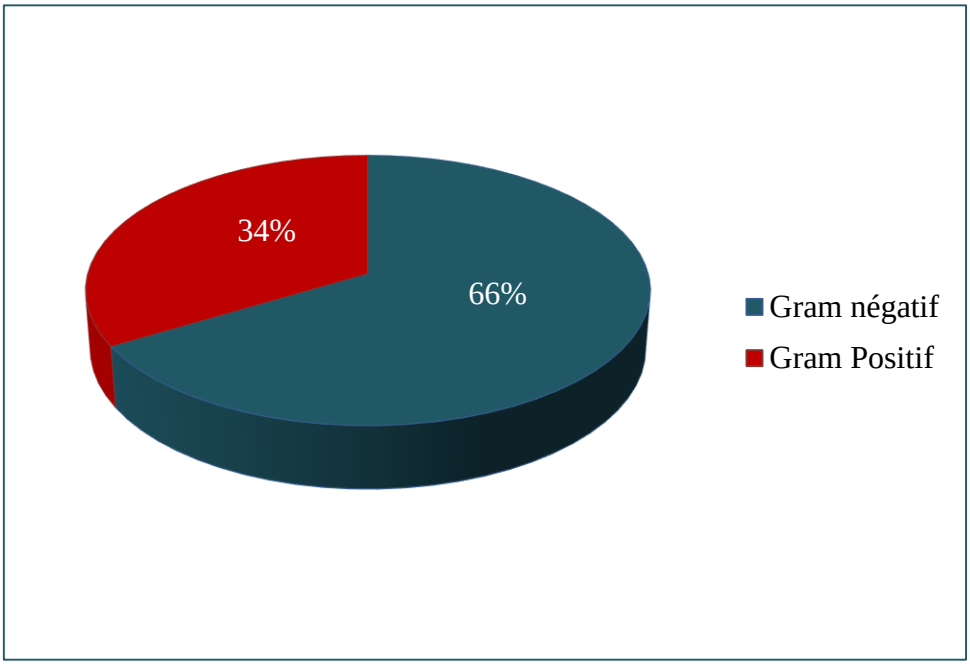


Figure 21: Taux de positivité des bactériémies en fonction des caractères morpho-tinctoriaux des bactéries

Les principales bactéries isolées lors de la période de l'étude sont répertoriées dans le tableau ci-dessous (Tableau 11).

Bacilles à Gram négatif		Nombre (pourcentage)
Entérobactéries	*Klebsiella* spp.	129 (17.5%)
	Serratia spp.	84 (11.4%)
	E. coli	71 (9.6%)
	Enterobacter spp.	36 (4.9%)
	P. mirabilis	35 (4.7%)
	Salmonella spp.	13 (1.7%)
P. aeruginosa		68 (9.2%)
Acinetobacter baumanii		42 (5.7%)
Cocci à Gram positif		
Staphylocoques	*S. aureus*	88 (11.9%)
	Staphylocoques coagulase négative (SCN)	54 (7.3%)
Enterococcus spp.		47(6.4%)
Streptococcus spp.		44 (6%)

Tableau 11 : Principales bactéries isolées dans les bactériémies au CHU de Tizi-Ouzou

Les entérobactéries représentent près de 50% des bacilles à Gram négatif isolés pendant la période de l'étude (49.8%). Les autres principaux bacilles à Gram négatif isolés sont *P. aeruginosa* et *A. baumanii* et représentent 14.9% des isolats (Fig. 22).

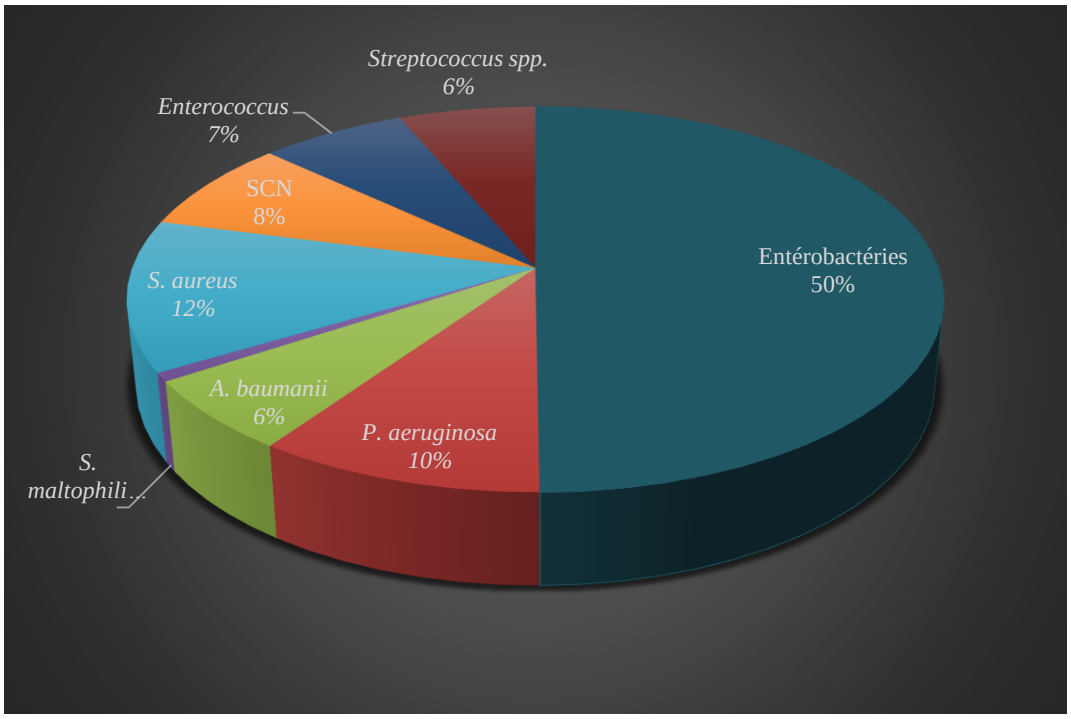


Figure 22: Taux de positivité des hémocultures en fonction des espèces bactérienne

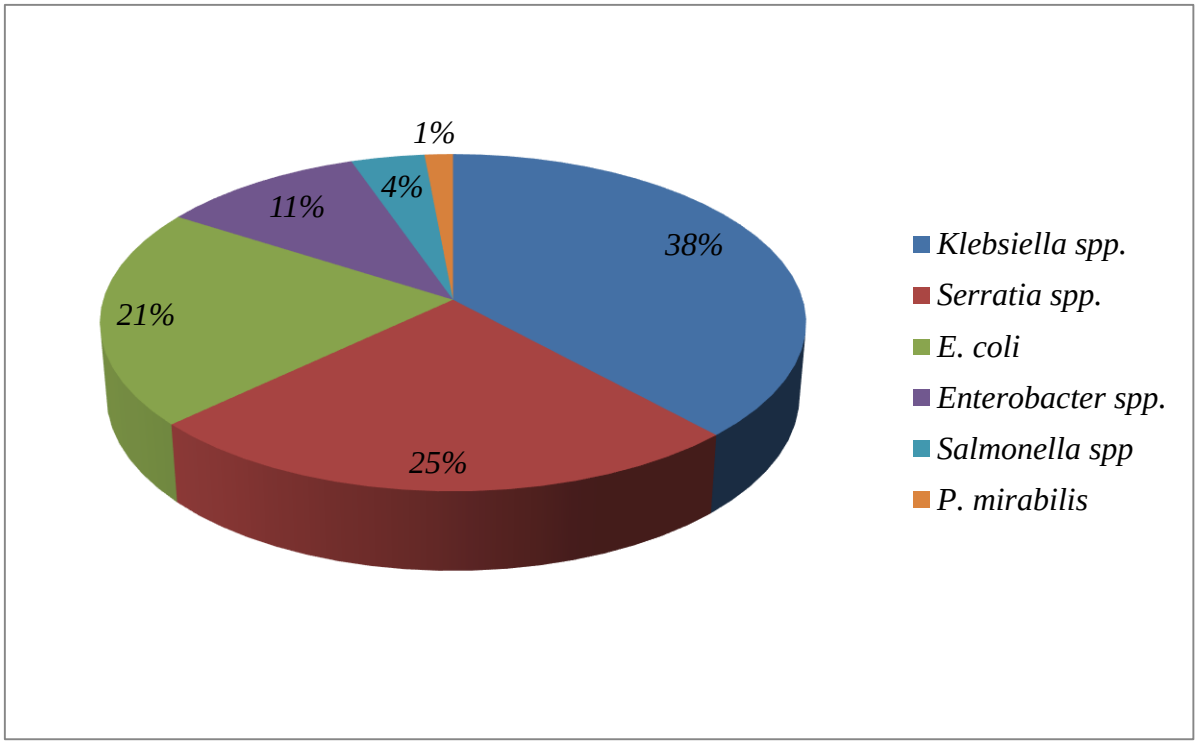


Figure 23: Principales entérobactéries responsables de bactériémies au CHU de Tizi-Ouzou

Parmi les entérobactéries, *Klebsiella*, *Serratia* et *E. coli* représentent 84% des isolats (Fig. 23).

Parmi les Cocci à Gram positif, les staphylocoques représentent 61% des isolats dont 38% de *S. aureus* (Fig. 24).

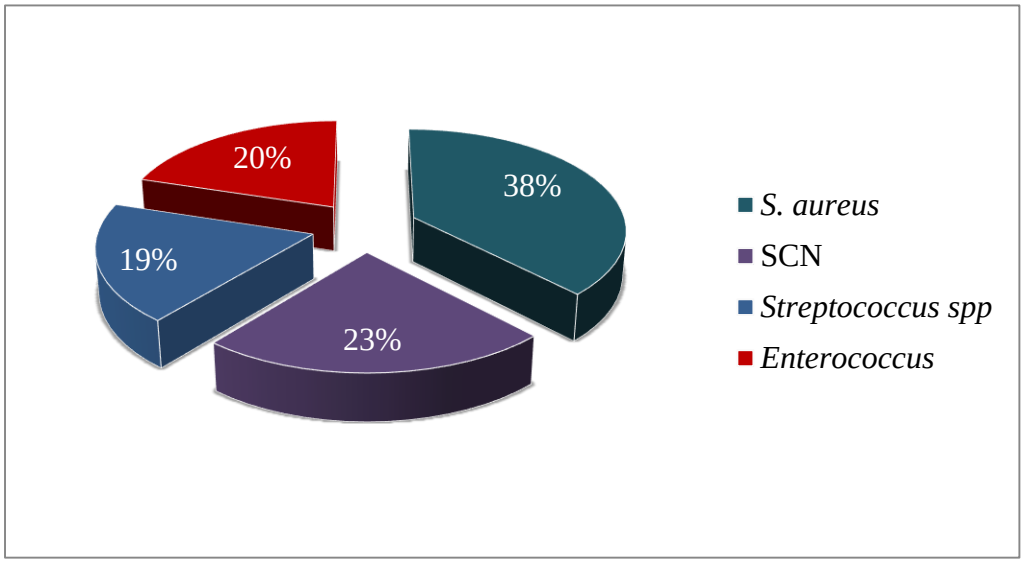


Figure 24: Principaux Cocci à Gram positif responsables de bactériémies au CHU de Tizi-Ouzou

4. Taux de résistance des principales bactéries isolées selon les données du laboratoire (WHONET) :

Les taux de résistance rapportés dans le tableau ci-dessous (Tableau 12) sont des taux bruts recueillis au laboratoire de bactériologie et calculé par le logiciel WHONET. Ces taux ont été calculés à partir des souches isolées à partir de des flacons d'hémocultures positifs et non par patient ce qui est à l'origine d'une surestimation des taux de résistance.

4.1. Taux de résistance des souches de *Staphylococcus aureus* :

Molécules d'antibiotiques	*S. aureus*
Pénicilline G	97%
Céfoxitine	41%
Kanamycine	18.4%
Gentamicine	3.3%
Erythromycine	11.3%
Clindamycine	9.4%
Pristinamycine	12.3%
Lévofloxacine	12.1%
Vancomycine	0.0%

Tableau 12 : Taux de résistance aux antibiotiques des souches de *S. aureus* isolées

Le taux de résistante à la méticilline des souches de *S. aureus* isolées de tous les flacons d'hémoculture positifs est de 41%. Or, le taux de résistance à la méticilline des souches de *S. aureus* isolées par patient et par épisode de bactériémie est de 26%.

Le taux de résistance à la méticilline des souches de SCN est de 24.6%.

Aucune souche résistante à la vancomycine n'a été isolée.

4.2. Taux de résistance aux antibiotiques des entérobactéries :

Le taux de résistance aux antibiotiques a été, également, déterminé sur la base des souches isolées par flacon positif et non par épisode de bactériémie et par patient (Tableau 13).

Molécules d'antibiotiques	Espèces		
	E. coli	***K. pneumoniae***	***S. marcescens***
Amoxicilline	83%	100%	100%
Amoxicilline+ Ac. clavulanique	80%	97.6%	74%
Céfazoline	62.8%	85%	100%
Céfoxitine	16.7%	14.9%	61%
Céfotaxime	36.4%	80%	5%
Ceftazidime	55.3%	57%	12.5%
Ceftriaxone	29.4%	72%	23.1%
Aztréonam	0%	54.5%	0%
Imipénème	0%	11.4%	4.5%
Gentamicine	20%	37%	0%
Amikacine	2.3%	9.3%	0%
Ciprofloxacine	27.9%	14.6%	0%
Colistine	0%	0%	0%

Tableau 13 : Taux de résistance aux antibiotiques des entérobactéries

Pendant la période de l'étude, un taux de résistance global aux céphalosporines de troisième génération (C3G) élevé a été observée chez les souches de *K. pneumoniae* et *E. coli* (80% et 55.3%, respectivement).

La résistance à l'imipenème est de l'ordre de 11.4% et 4.5% chez *K. pneumoniae* et *S. marcescnes*, respectivement. Aucune résistance à l'imipénème n'a été détectée chez *E. coli*.

Aucune résistance à la colistine n'a été observée pendant la période de l'étude.

Le taux de souches d'entérobactéries productrices de la β-lactamase à spectre élargie par épisode de bactériémie est élevé et variable en fonction de l'espèce.

4.3. Taux de résistance aux antibiotiques des *Pseudomonas aeruginosa* :

Molécules d'antibiotiques	Taux de résistance
Ticarcilline	9.1%
Ticarcilline+ ac.clavulanique	4%
Pipéracilline	16%
Ceftazidime	18%
Aztréonam	6%
Imipénème	6%
Colistine	0.0%
Gentamicine	2%
Tobramycine	4.5%
Amikacine	0.0%
Ofloxacine	0.0%
Lévofloxacine	0.0%
Fosfomycine	36%

Tableau 14 : Taux de résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa*

Le taux de résistance à un des principaux marqueurs de la résistance (ceftazidme) de *P. aeruginosa* est de 18%.

II. Résultats par service :

1. Nombre d'épisodes de bactériémie par service :

Plus de 40% des épisodes de bactériémies ont été diagnostiqués chez l'enfant. Les bactériémies dans les services de réanimations représentent 5.5% des cas (Tableau 15).

Services	Nombre d'épisodes de bactériémie (taux en %)
Services de Pédiatrie	
Néonatologie	107 (**14,5%**)
Pédiatrie immunohématologie	39 (5,3%)
Pédiatrie	36 (5%)
Réanimation pédiatrique	1 (0,1%)
Chirurgie infantile	12 (1,6%)
Services de Médecine (adultes)	
Hématologie	105 (**14,3%**)
Infectiologie	73 (**9,9%**)
Cardiologie	35 (4,7%)
Néphrologie	27 (3,7%)
Urologie	11 (1,5%)
Gynécologie	8 (1,1)
Médecine interne	8 (1,1)
Gastrologie	6 (0,8%)
Endocrinologie	1 (0,1%)
Réanimations adultes	
Réanimation	31 (4,2%)
Réanimation chirurgicale	10 (1,3%)
Services de chirurgie (adultes)	
Neurochirurgie	3 (0,4%)
Chirurgie générale	1 (0,1%)
Urgences	
Urgences pédiatriques	108 (**14,7%**)
Urgences médicales adultes	68 (**9,2%**)
Urgences chirurgicales adultes	23 (3,1%)

Tableau 15 : Nombre de bactériémie par service

Pour 45 patients, le service n'a pas été spécifié.

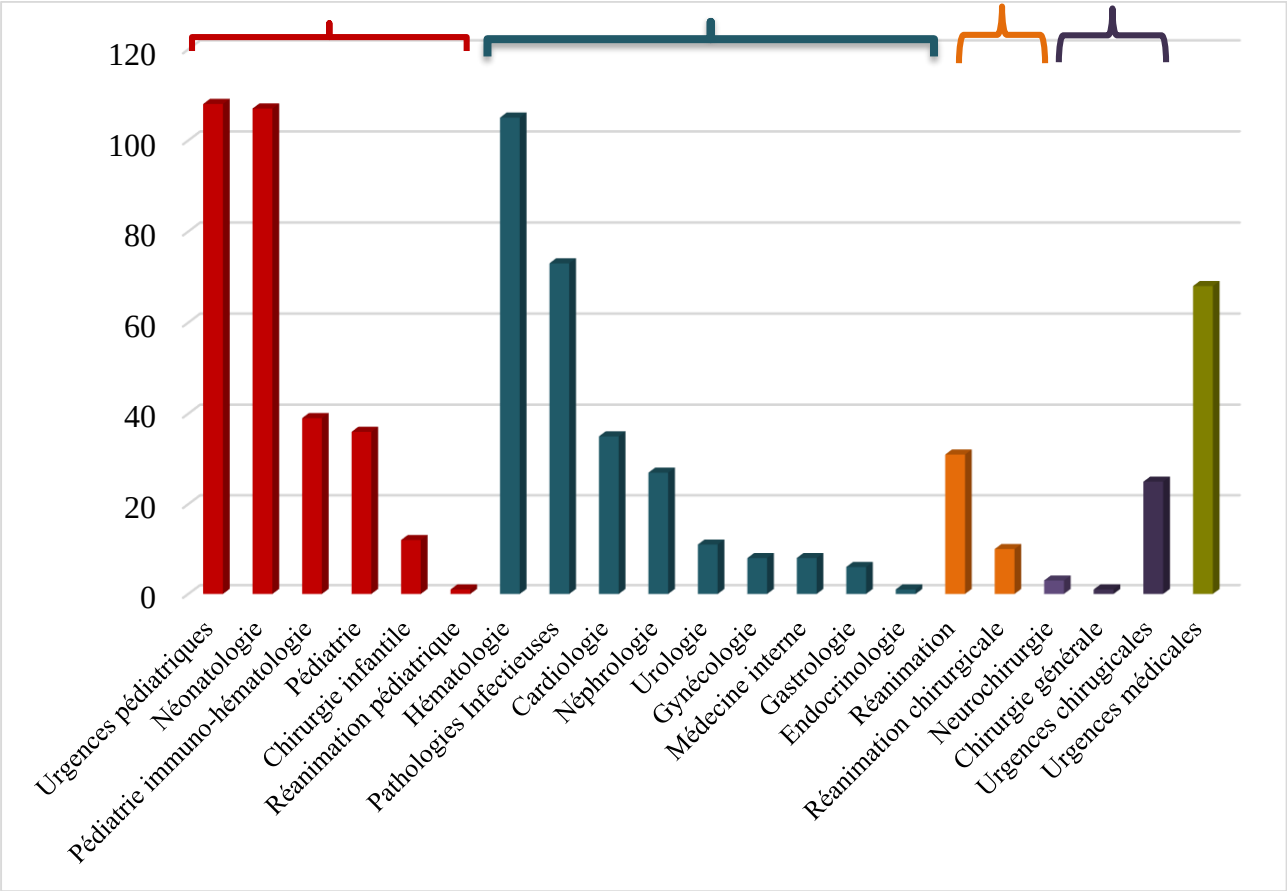


Figure 25: Nombre de Bactériémie par service

Les services de Néonatologie, d'hématologie, de pathologies infectieuses et les urgences adultes et enfants sont les services où le nombre de bactériémie est le plus élevé (Fig. 25).

Les services de réanimations du CHU de Tizi-Ouzou sont parmi des services où le nombre de bactériémie est le plus bas (Fig. 25).

2. Principales bactéries isolées dans les principaux services :

Les résultats de cette étude ont montré que l'écologie bactérienne des bactériémies varie en fonction des services de soin (Fig. 26, 27, 28, Annexe 1).

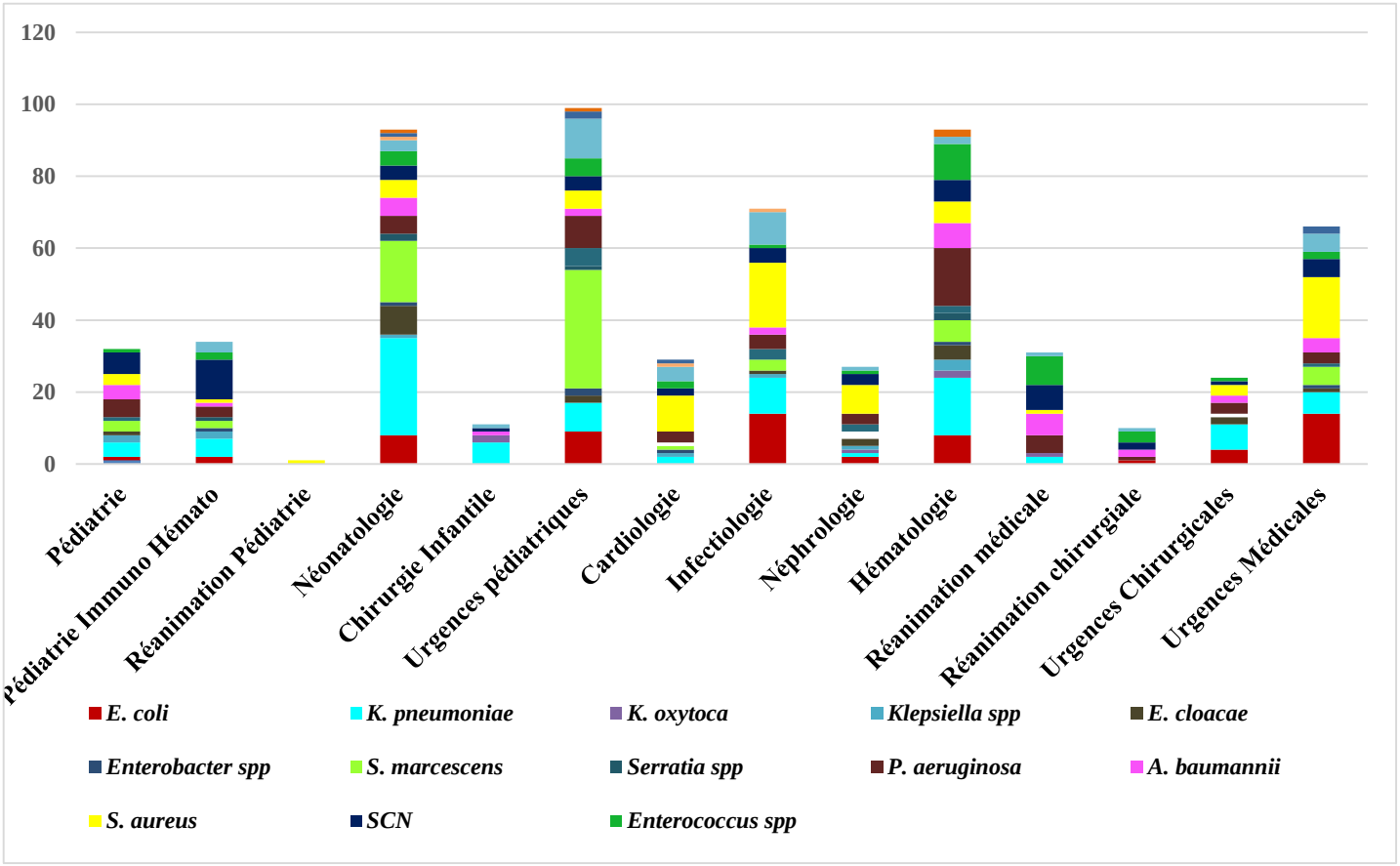


Figure 26: Principales bactéries responsables de bactériémie dans les principaux services de soin

En effet, *E. coli* a été isolée dans les services de pathologies infectieuses, urgences adultes, les services de pédiatrie et d'hématologie.

K. pneumoniae a été isolée, principalement, dans les services de pédiatrie, d'hématologie, de pathologies infectieuses et des urgences chirurgicales.

S. marcescens a été isolée, principalement, dans les services de pédiatrie en l'occurrence en néonatologie, d'hématologie et de pathologies infectieuses.

S. *aureus* a été isolée, principalement, dans les services de pathologies infectieuses, des urgences adultes, de cardiologie et de néphrologie

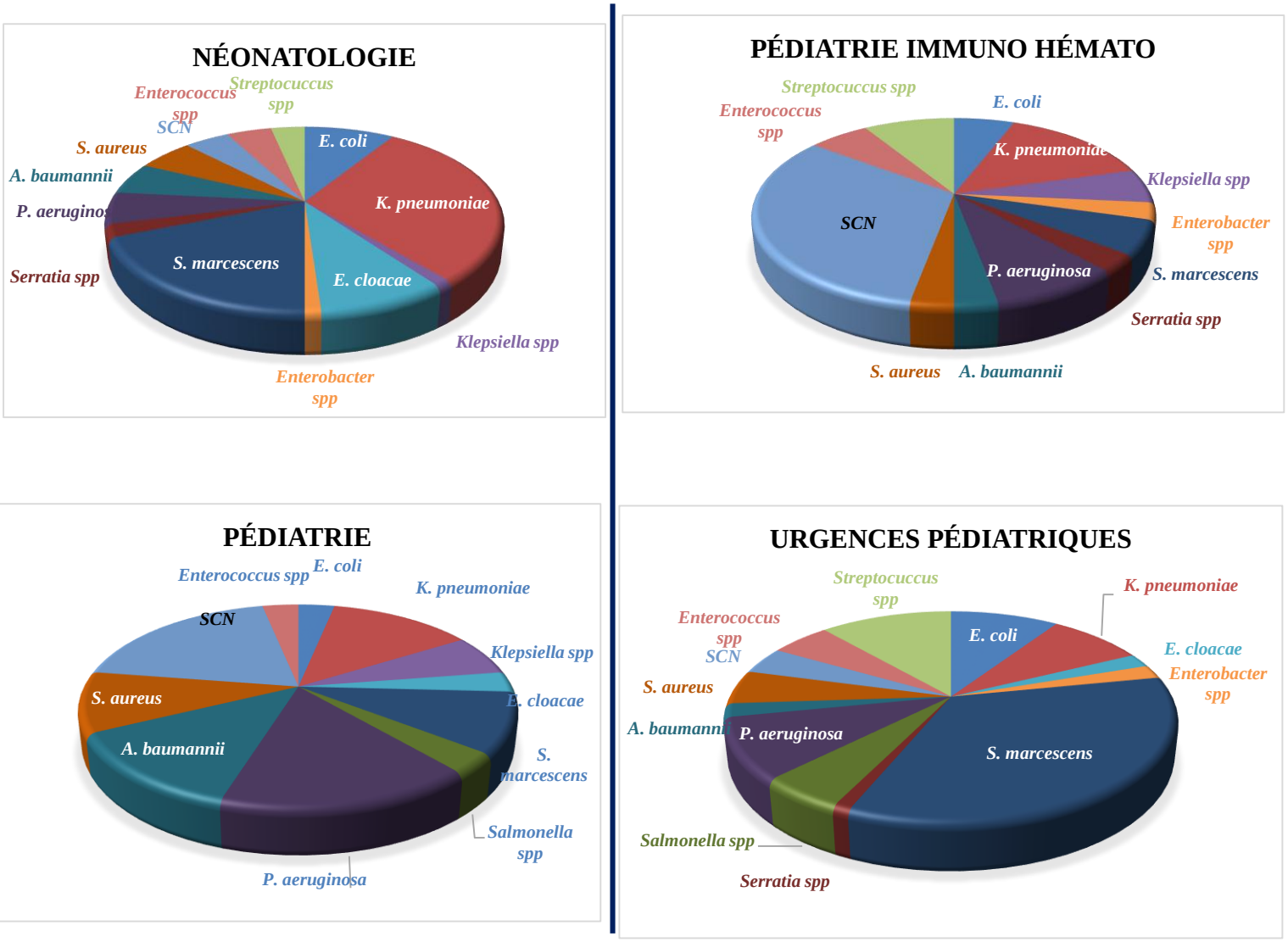
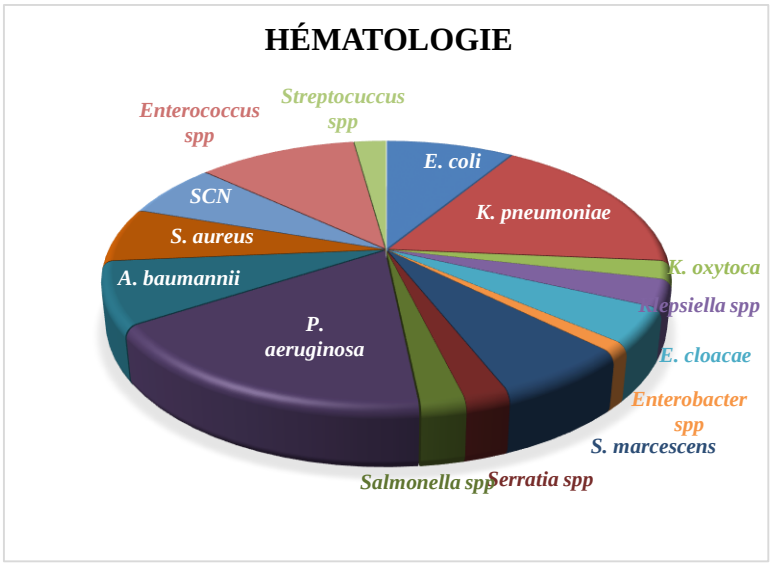


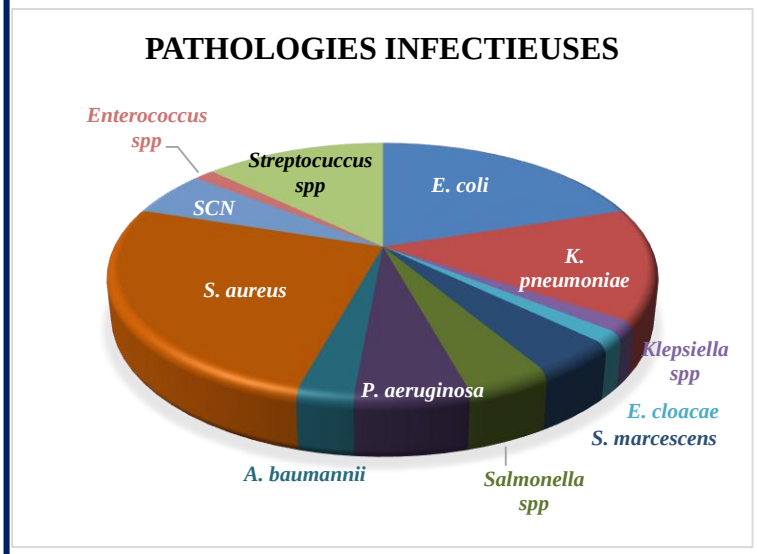
Figure 27: Principales bactéries responsables de bactériémie par unité de soin en pédiatrie

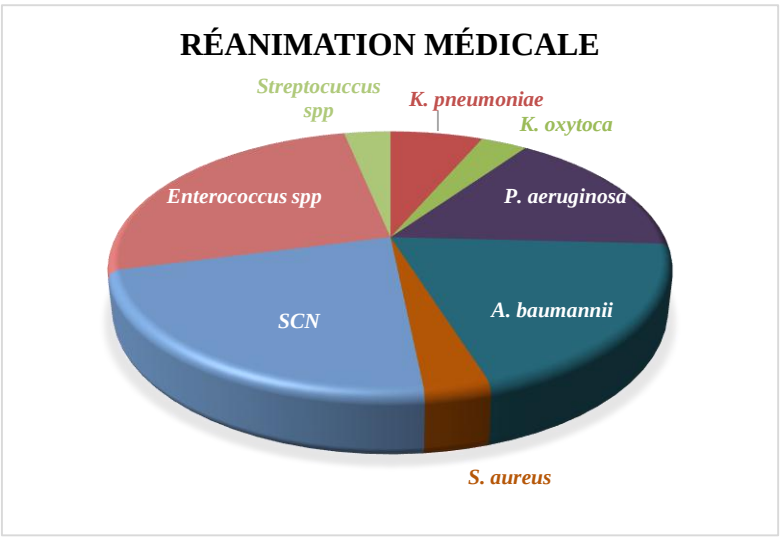
En Néonatologie et aux urgences enfants, les entérobactéries représentant près de 75% des souches isolées (Fig. 27, Annexe 1). Les principales entérobactéries isolées étaient *S. marscescens* et *K. pneumoniae*

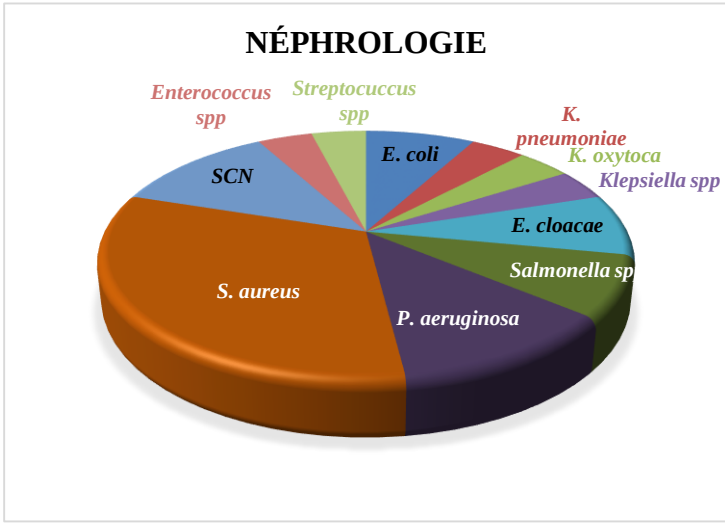
En pédiatrie immuno-hématologie et dans les services de pédiatrie médicale, les SCN représentent un taux élevé des bactéries isolées dans les bactériémies (Fig. 27, Annexe 1).

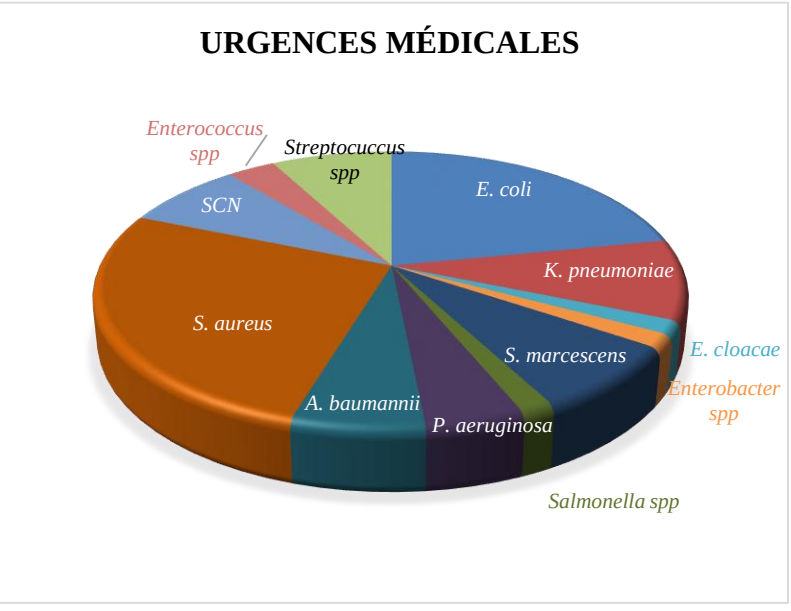
Dans les services de soin adultes, l'écologie bactérienne diffère en fonction du service. *S. aureus* est la bactérie la plus fréquemment isolée en cardiologie, néphrologie, infectiologie et urgences médicinales (Fig. 28). En Hématologie, *P. aeruginosa* est la bactérie la plus fréquente (Fig. 28).











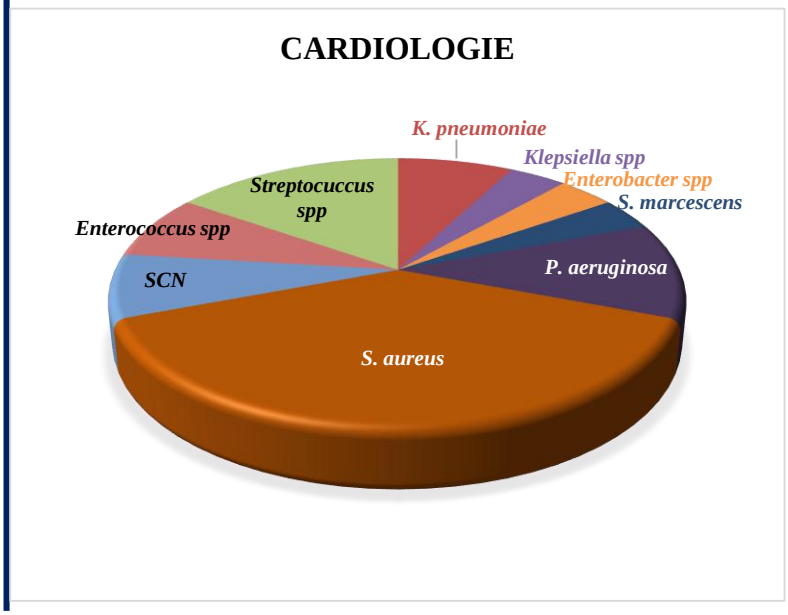


Figure 28 : Principales bactéries isolées de bactériémies dans les principaux services adultes

3. Principales bactéries résistantes isolées dans les principaux services

Les services de pédiatrie sont les unités de soin pourvoyeurs de bactéries multi-résistantes de type entérobactéries BLSE, *S. aureus* méticilline résistante.

A. baumanii résistants à l'imipenème sont retrouvés essentiellement dans les services d'Hématologie de réanimation médicale (Fig. 29).

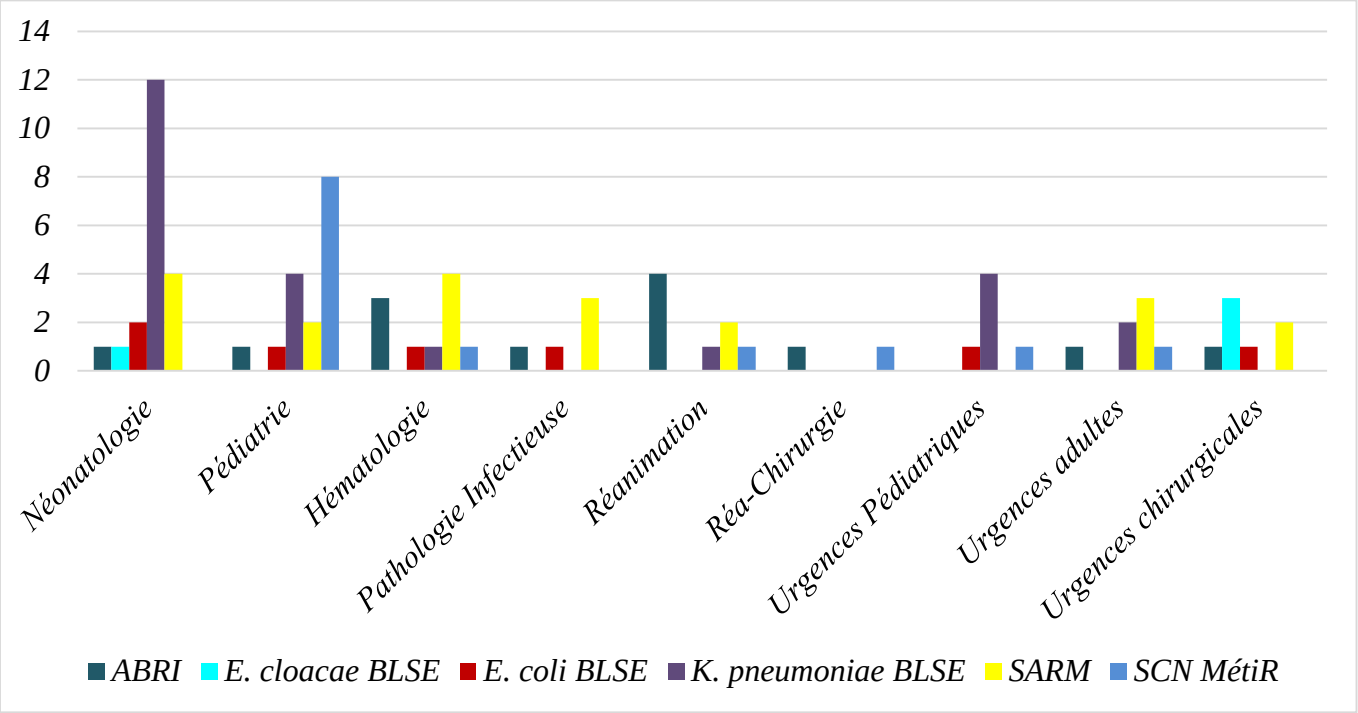


Figure 29: Principales bactéries multi-résistantes dans les principaux services de soin

III- Résultats des bactériémies pendant la période pré-COVID et COVID :

1. Nombre de bactériémies :

Période	Nombre de bactériémie
Période pré-COVID (2019)	250
Période COVID (2020)	196
Période COVID (2021)	289

Tableau 16 : Nombre de bactériémies pendant la période pré-COVID et COVID

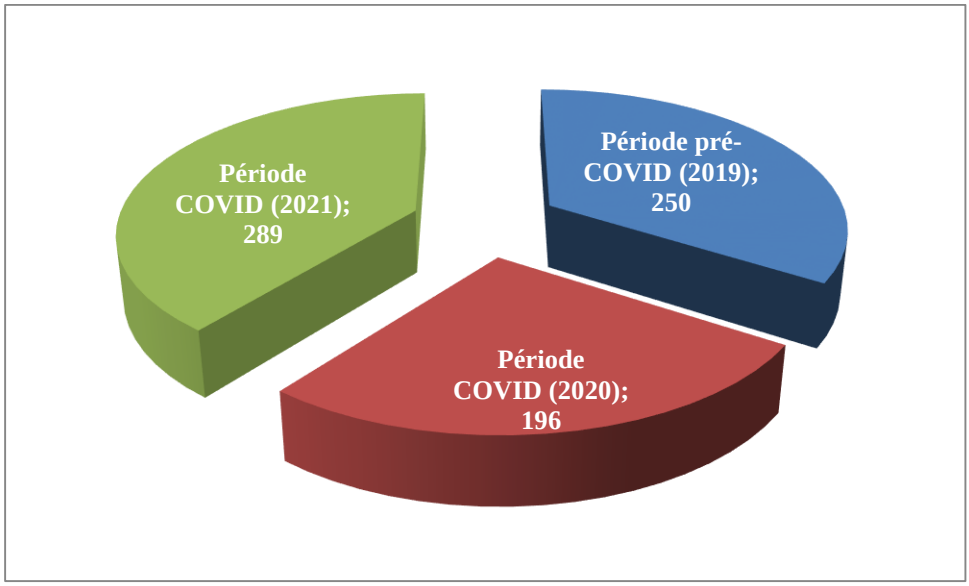


Figure 30 : Nombre de bactériémies pendant la période pré-COVID et COVID

Le nombre de bactériémie était, relativement, stable pendant les périodes pré-COVID et COVID (Tableau 16 et Fig. 30).

2. Principales bactéries isolées pendant la période pré-COVID et COVID :

Il n'y a pas de différence significative entre le taux de bactéries à Gram positif et Gram négatif pendant les périodes pré-COVID et COVID. Les BGN étaient les bactéries les plus fréquemment isolées quelle que soit la période (Fig. 31).

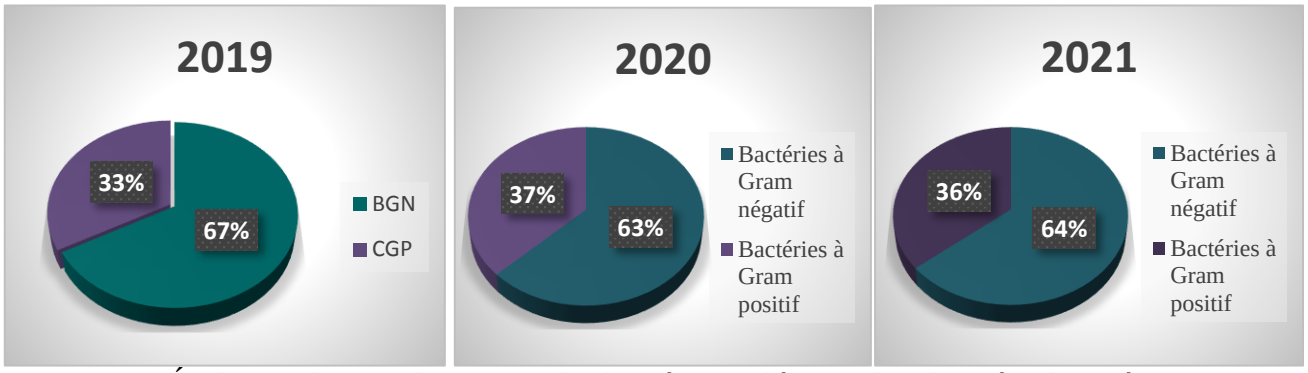


Figure 31 : Évolution du taux des principales bactéries isolées pendant les périodes pré-COVID et COVID

L'écologie bactérienne pendant la période de l'étude a sensiblement varié. En effet, une augmentation du nombre de cas de bactériémie à *S. marcescens*, SCN et à entérocoques a été observée pendant la période COVID (Tableau 17, Fig. 32 à 34).

Principales bactéries isolées				Evolution (tendance)
Bactéries à Gram négatif	**2019**	**2020**	**2021**	
E. coli	33	21	17	↓
K. pneumoniae	45	17	49	—
K. oxytoca	6	1	0	↓
Klepsiella spp	4	5	2	—
S. marcescens	18	35	31	↑
E. cloacae	14	6	7	↓
Enterobacter spp	0	6	3	↑
Salmonella spp	4	4	5	—
P. aeruginosa	24	17	27	—
A. baumannii	18	14	10	↓
Bactéries à Gram positif	**2019**	**2020**	**2021**	Evolution
S. aureus	39	26	23	↓
SCN	8	15	31	↑
Streptocuccus spp	25	6	13	↓
Enterococcus spp	14	12	21	↑

Tableau 17 : Tendance de l'évolution des principales bactéries pendant les périodes pré-COVID et COVID

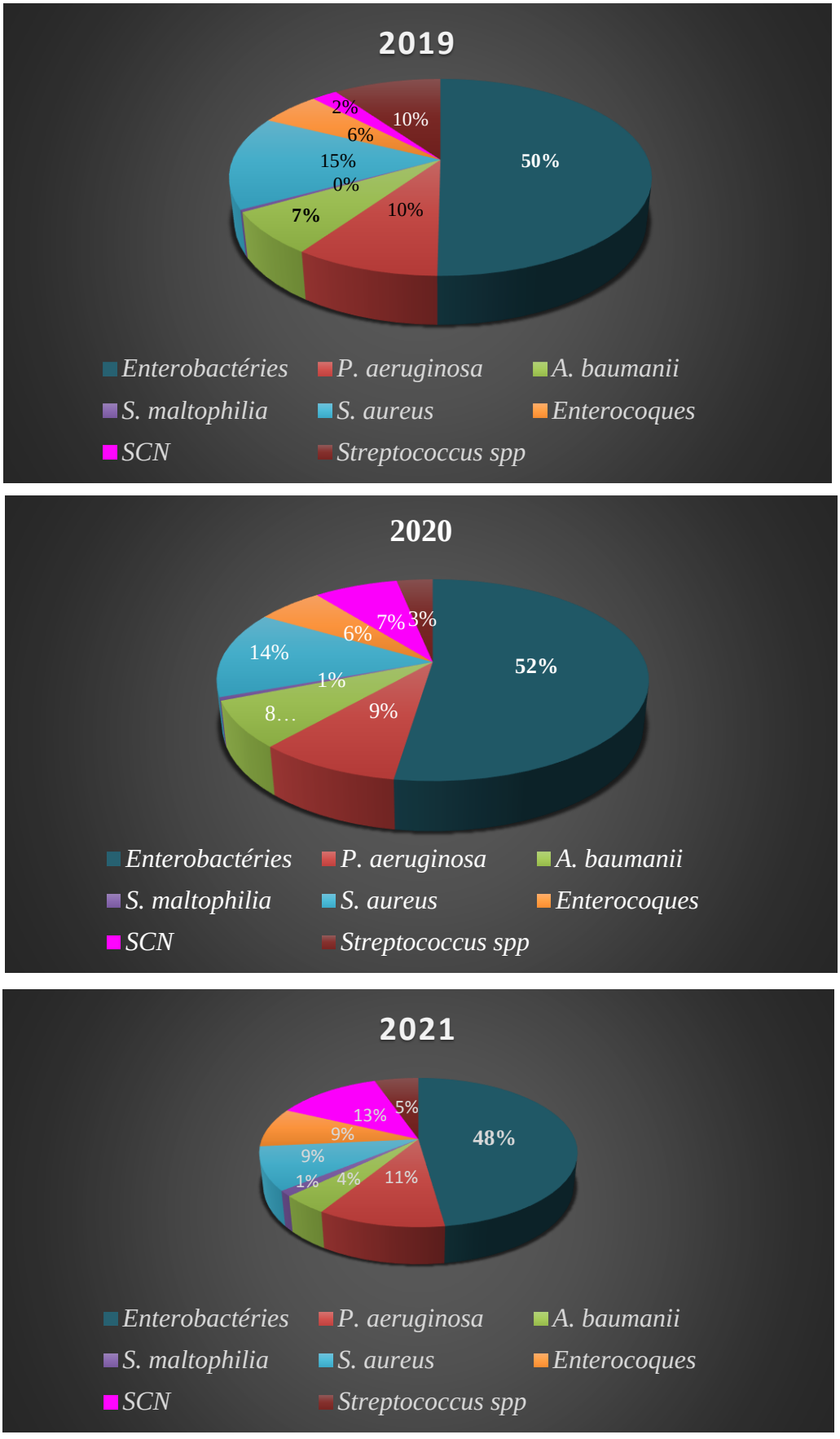


Figure 32: Principales bactéries isolées par période

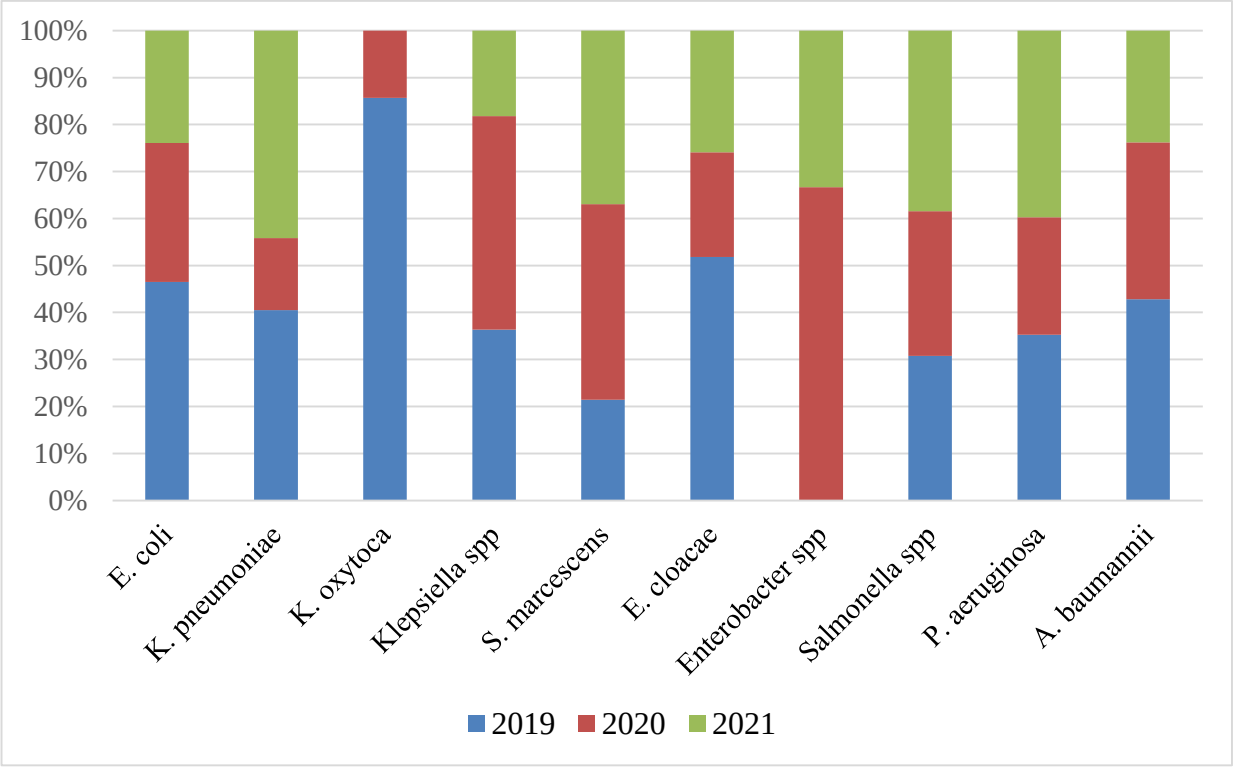


Figure 33 : Évolution des principaux bacilles à Gram négatif isolés pendant la période de l'étude

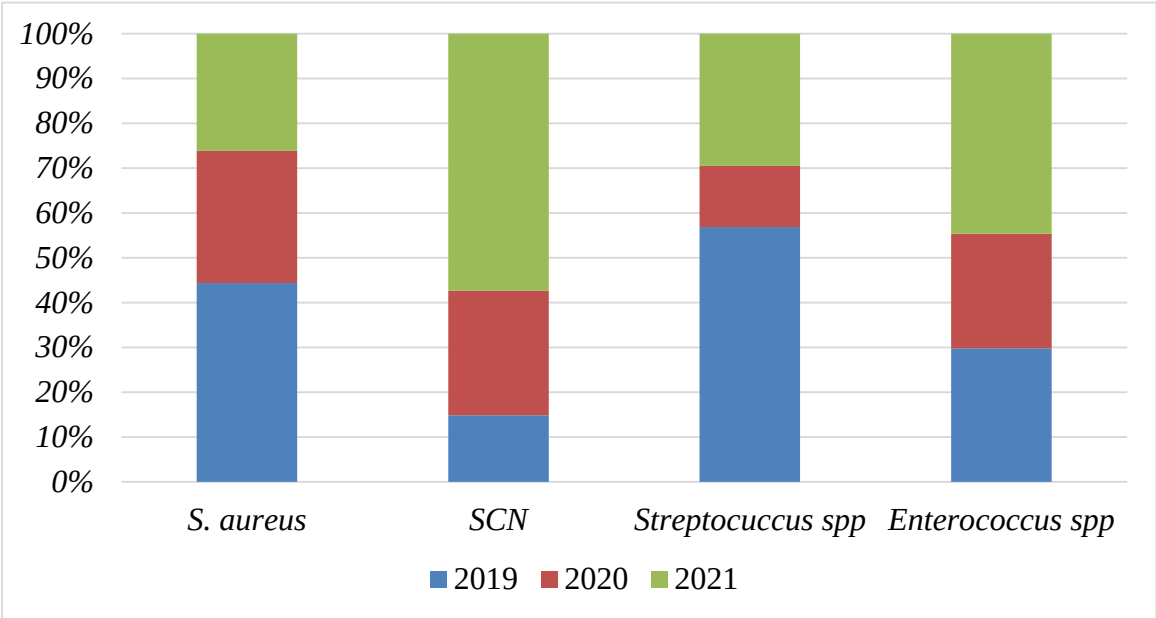


Figure 34 : Évolution des principaux Cocci à Gram positif isolés pendant la période de l'étude

Pendant la période de l'étude, une diminution du nombre de cas de bactériémie à *E. coli*, *A. baumanii* et *S. aureus* a été observée. En revanche, le nombre de bactériémies à *S. marcescens*, à *P. aeruginosa*, à SCN et à entérocoque a augmenté (Fig. 35, 36).

Fig. 35 A: Principales bactéres isolées par unité de soin en 2019

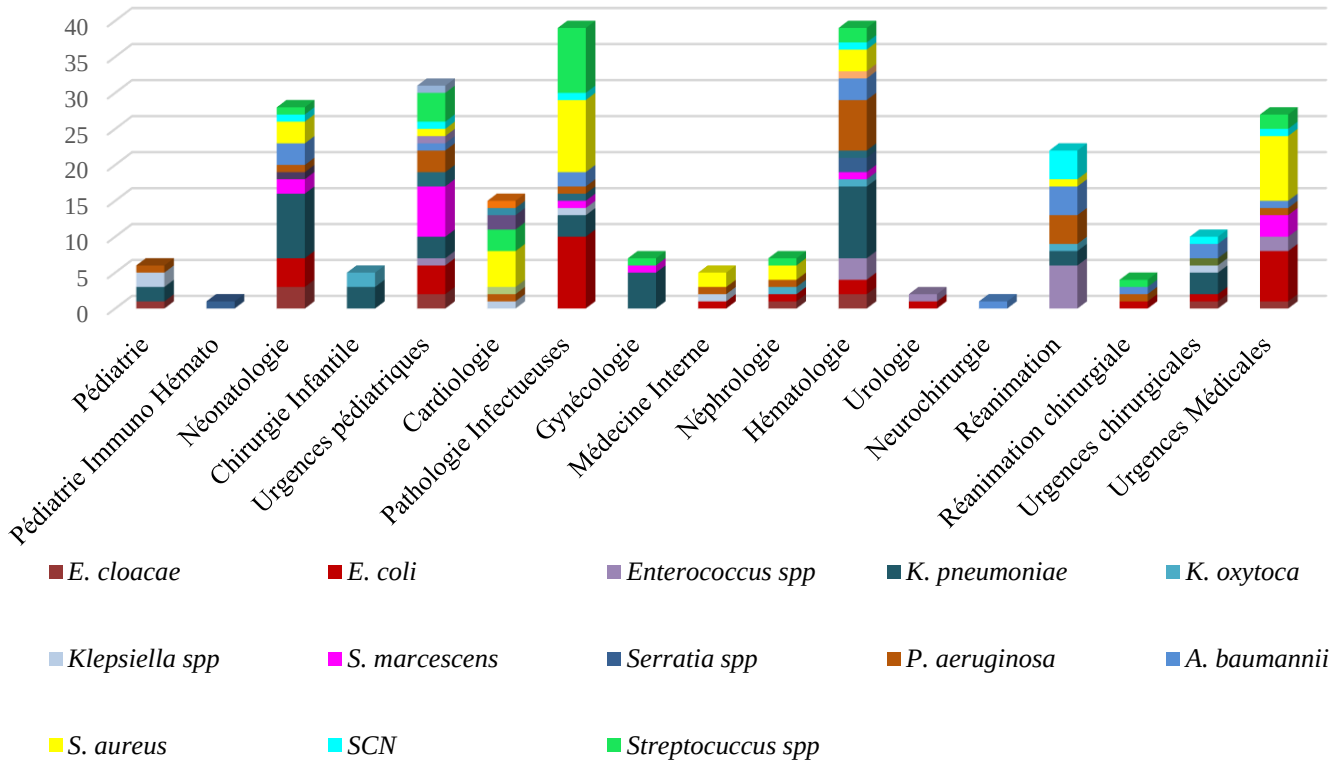


Fig. 35 B: Principales bactéries isolées par unité de soin en 2020

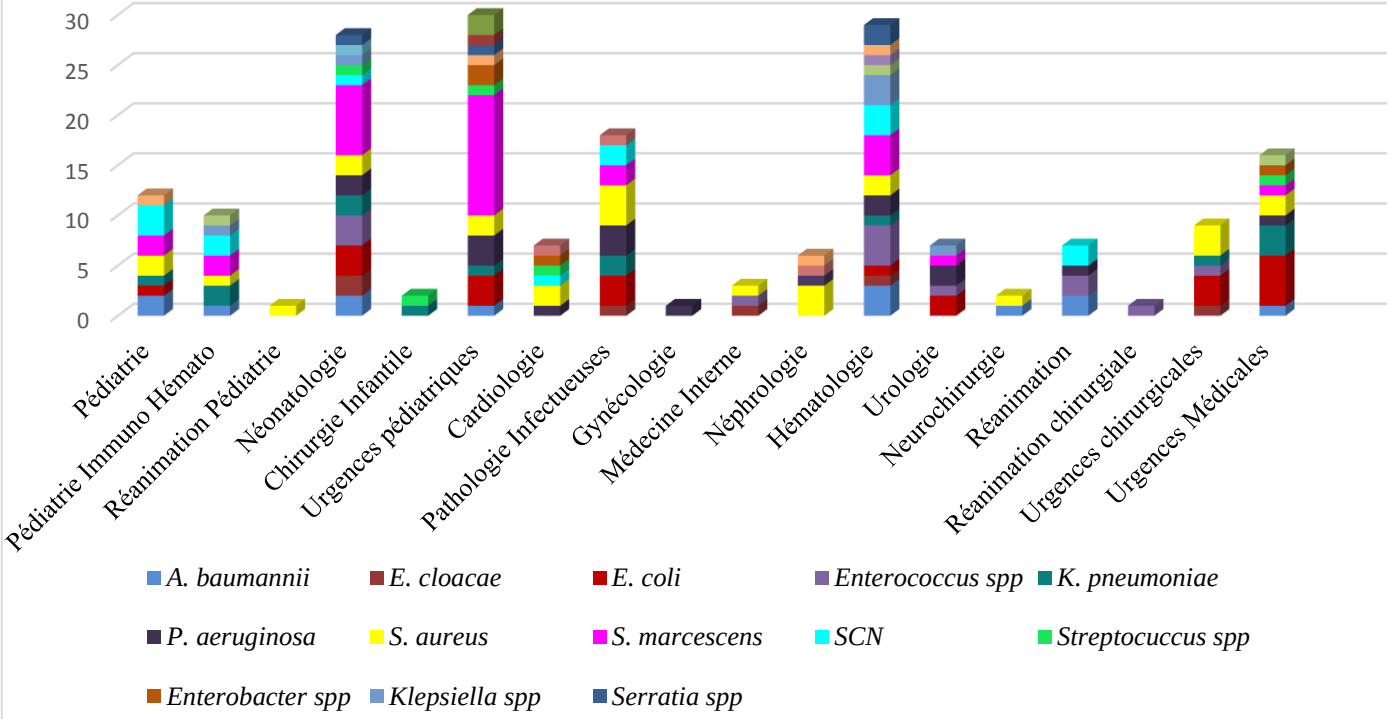


Fig. 35 C: Principales bactéries isolées par unité de soin en 2021

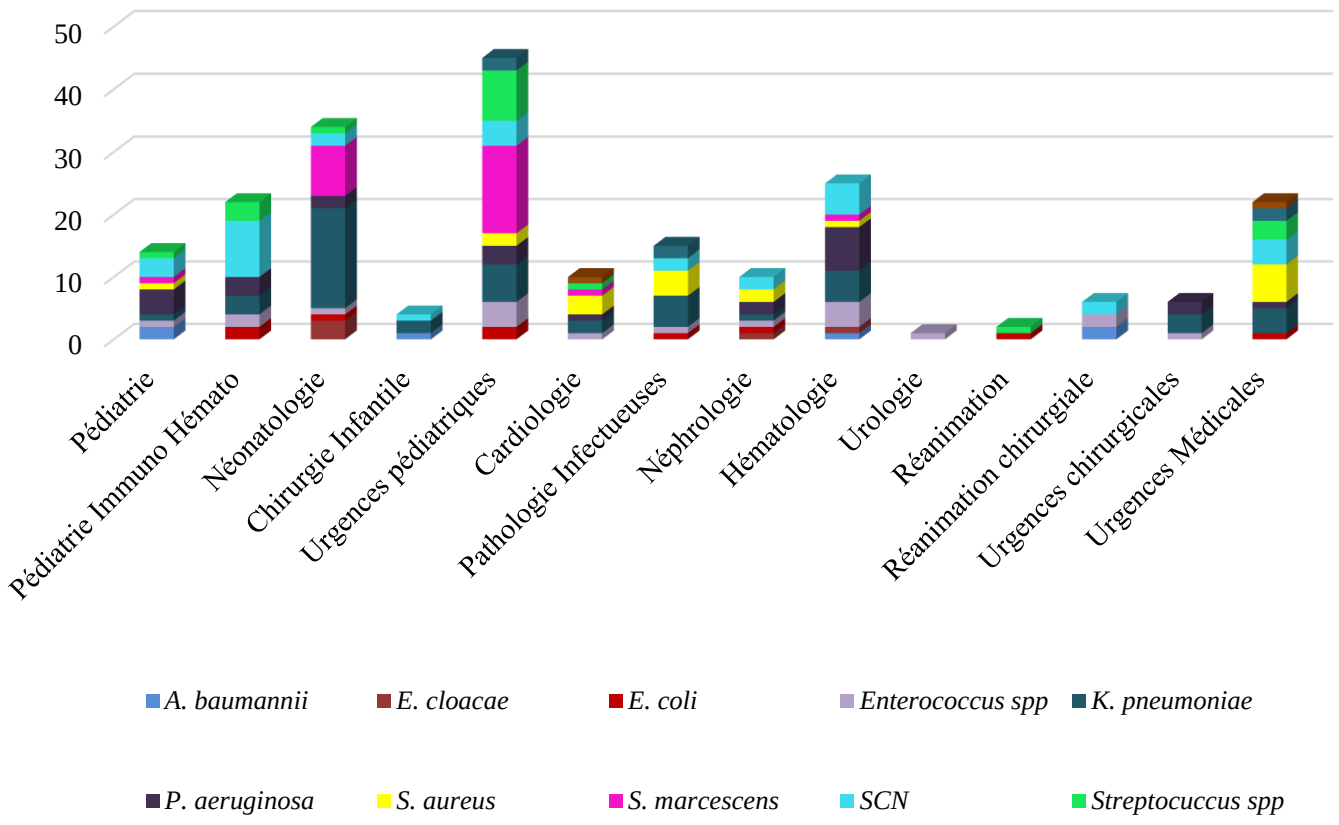


Figure 35 : Principales bactéries isolées par unité de soin pendant la période de l'étude

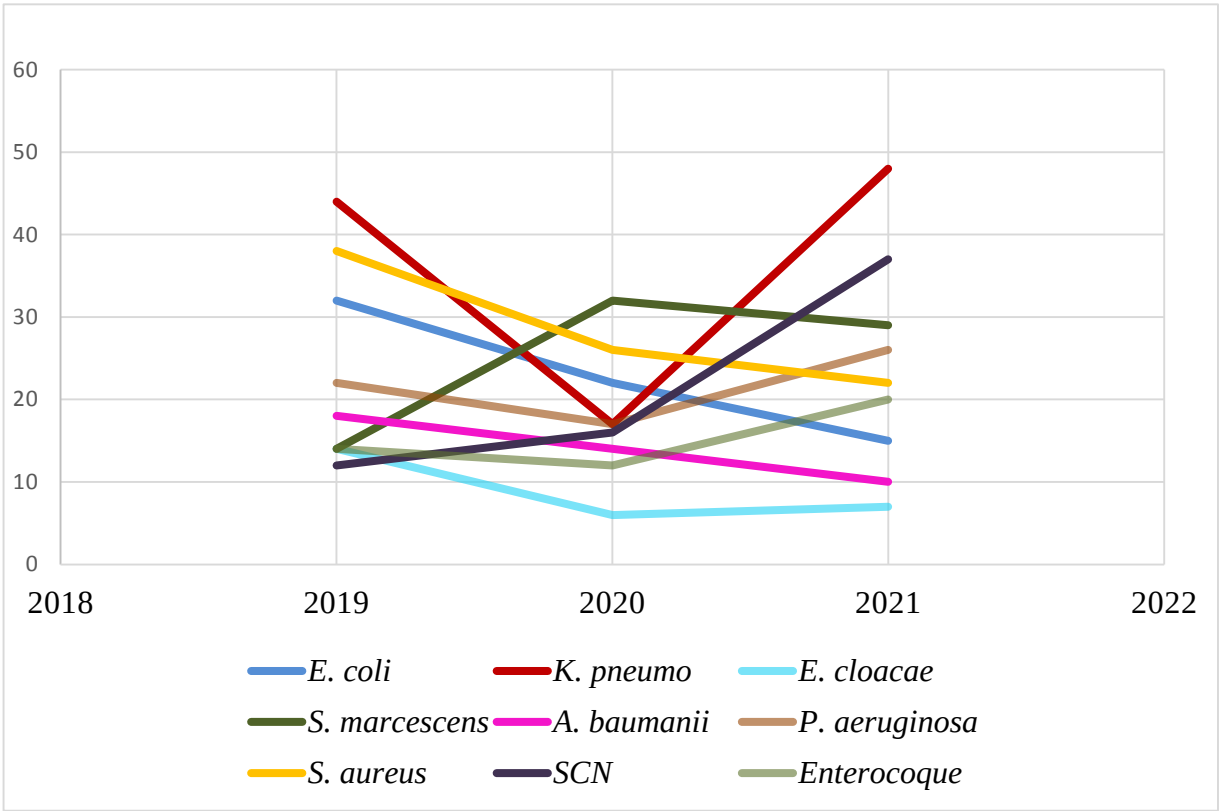


Figure 36 : Évolution des principales bactéries isolées pendant la période de l'étude

3. Principaux phénotypes et taux de résistance des principales bactéries isolées pendant les deux périodes de l'étude

	E. coli BLSE	*K. pneumoniae* BLSE	*E. cloacae* BLSE	ABRI	SARM	SCN méti R	VRE
2019	15,60%	25%	7,10%	33,30%	18,40%	16,60%	7,10%
2020	13,60%	29,40%	1,60%	28,50%	46%	12,50%	0%
2021	13,30%	43,70%	2,80%	80,00%	18%	32,40%	5%

Tableau 18 : Principaux phénotypes de résistance des principales bactéries isolées

Le taux de résistance aux antibiotiques des principales bactéries isolées pendant la période de l'étude a significativement augmenté. En effet, le taux d'entérobactéries BLSE a atteint 43.7% pour *K. pneumoniae* pendant la période COVID (Tableau 18, Fig. 37, 38).

Le taux d'*A. baumanii* résistant à l'imipenème a atteint 80% en 2021 (Tableau 18, Fig. 37, 38).

Le taux de SARM a doublé en 2020 pour revenir en 2021 à son niveau de la période pré-COVID.

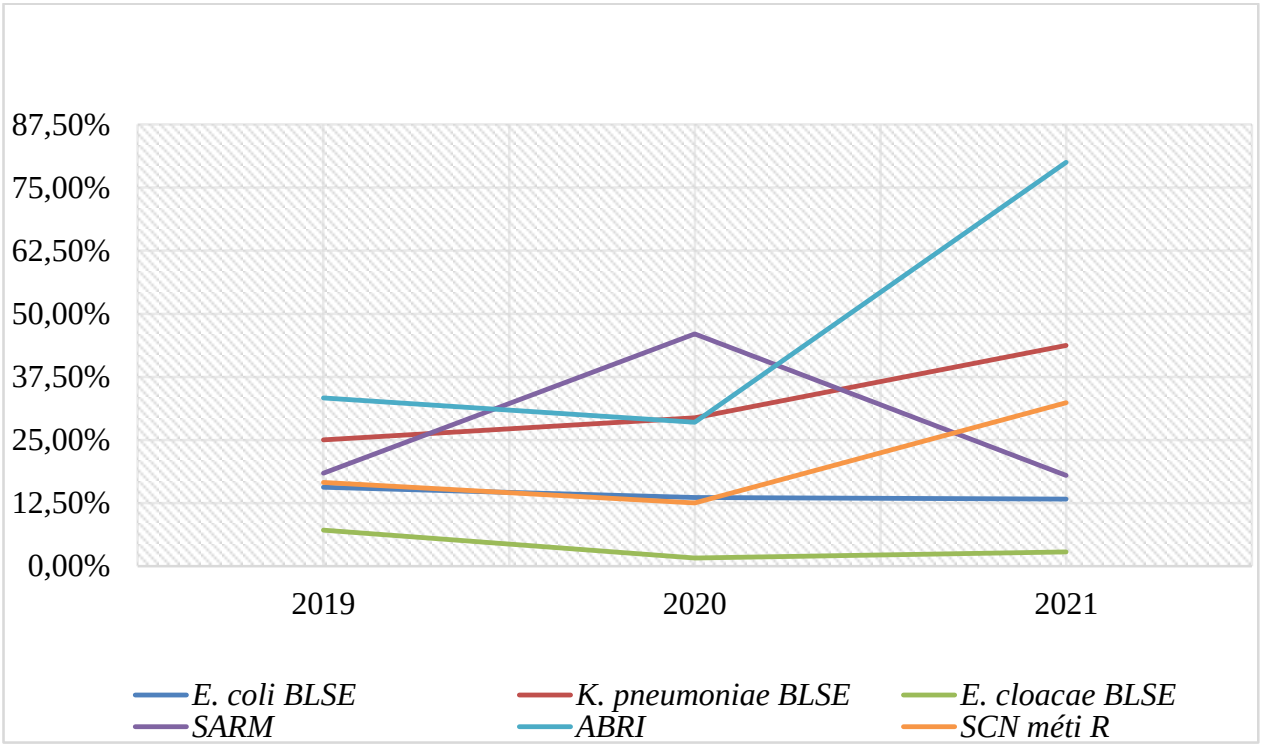
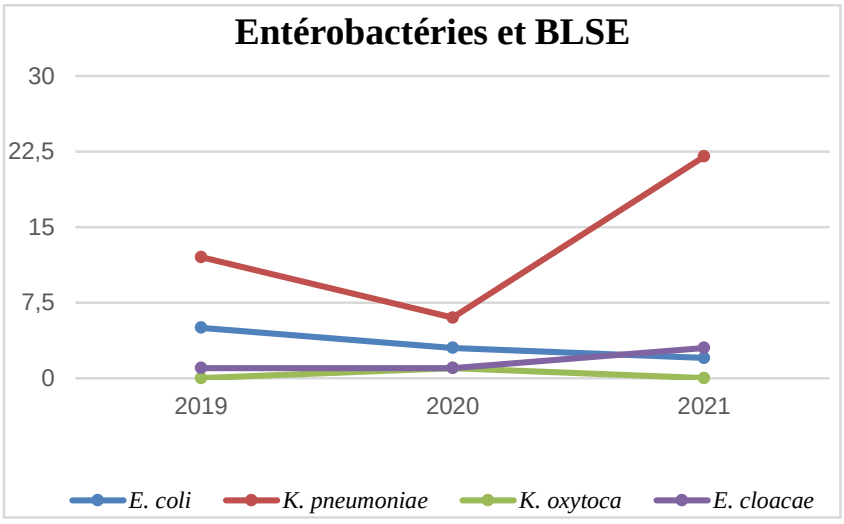


Figure 37 : Évolution des principaux phénotypes de résistance des principales bactéries isolées



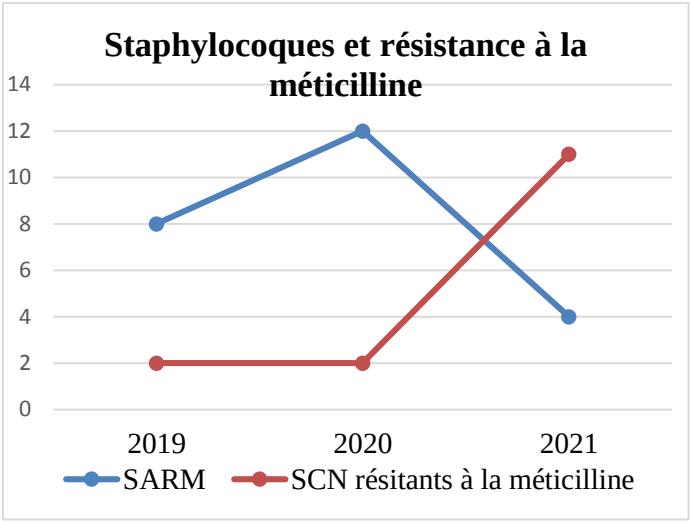


Figure 38: Évolution des Entérobactéries BLSE et des souches de staphylocoques résistant à la méticilline

DISCUSSION

Le laboratoire de bactériologie intervient dans le diagnostic étiologique des bactériémies, le choix d'un traitement antibiotique et la surveillance de son efficacité. Cependant, en raison de la gravité de ces infections et de l'importance de la précocité du traitement, la relative lenteur des examens bactériologiques est un lourd handicap aux services qu'ils peuvent rendre.

Au CHU de Tizi-Ouzou, les bactériémies sont plus fréquentes dans certains services de soin, en l'occurrence les urgences pédiatriques (14.3%), les services de Néonatologie (14.5%), d'Hématologie (14.3%) et de maladies infectieuses (9.9%) et une écologie bactérienne spécifique a été observée pour chacun des services.

Globalement, les entérobactéries sont les bactéries les plus fréquemment isolées, parmi lesquels *Klebsiella* spp (17.5%), *Serratia* spp. (11.4%) et *E. coli* (9.6%).

S. aureus représente 12% des cas de bactériémies.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques de ces souches, a montré des taux de résistance aux antibiotiques élevés. La fréquence d'isolement des entérobactéries productrices de BLSE est élevée. En effet, les souches de *K. pneumoniae* BLSE ont été isolées dans près de 34% des cas. Un taux similaire a été décrit en Europe [28]. En effet, une importante diminution de sensibilité aux antibiotiques a été observée pour cette entérobactérie, ces dernières années [28]. La résistance par production de BLSE connait une expansion inquiétante et est devenue endémique en santé humaine comme animale. La résistance par production de BLSE touche aussi une proportion importante des infections communautaire chez l'Homme.

Les taux de SARM ou de SCN résistants à la méticilline ont été, également, élevés dans cette étude (24 et 26%, respectivement). Or, le taux de SARM en Europe du Nord avoisine les 12% [28].

Les bactéries hautement résistantes (résistantes aux carbapénèmes) représentent 15% des isolats. *A. baumannii* a atteint un taux de résistance alarmant aux carbapénèmes (80%). Des taux de résistance similaires ont déjà été observés en 2018, au CHU de Tizi-Ouzou [23].

Les services de pédiatrie sont les unités de soin critiques pour les bactéries multi-résistantes de type entérobactéries BLSE, *S. aureus* méticilline résistante. *A. baumanii* résistants à l'imipenème ont été retrouvés, essentiellement, dans les services d'Hématologie et de réanimation médicale. Des résultats similaires ont été retrouvés au CHU Mustapha, à Alger [29]. Ces services nécessitent une attention particulière et une mise en place urgente des mesures d'hygiène.

Ce taux de résistance aux antibiotiques est probablement dû d'une part, à un mésusage des antibiotiques et d'autre part, à un défaut des mesures d'hygiènes qui permettent pourtant la maitrise de la transmission croisée des résistances acquises à déterminisme plasmidique.

La disponibilité de ces données pourrait aider les cliniciens dans le choix d'une antibiothérapie la mieux adaptée.

D'après l'OMS, la résistance aux antibiotiques constitue l'une des plus graves menaces pesant sur la santé humaine, la sécurité alimentaire et le développement. Cette résistance entraîne une prolongation des hospitalisations, une augmentation des dépenses de santé et une augmentation du taux de mortalité [30].

La résistance bactérienne, mais aussi la surveillance de la consommation des antibiotiques sont des indicateurs de suivi utilisables aux niveaux local et régional [30]. Des études ont montré que le mésusage des ATB était un facteur de risque de colonisation et d'infection par des BMR [31, 32].

Les recommandations de l'OMS préconisent une diminution de la consommation des antibiotiques ainsi qu'un bon usage des antibiotiques pour obtenir une baisse du taux de résistance aux antibiotiques [30] et de surcroit lorsque ces recommandations sont associées à la mise en place des mesures d'hygiène.

Une des conséquences de l'inaction serait une mauvaise évolution des patients avec un risque de complications et un risque jusqu'à trois fois plus élevé de décès d'origine infectieuse [30].

Difficultés rencontrées :

Cette étude présente des biais et des limites. En effet, il s'agit d'une étude rétrospective avec une perte d'information importante (plusieurs caractéristiques démographiques manquantes, pas de données cliniques et aucune donnée sur l'antibiothérapie utilisée). Les biais de cette étude est d'une part, la sélection de la population initiale d'après les hémocultures positives, ce qui exclut d'emblée les épisodes de bactériémies cliniques non documentés microbiologiquement. D'autre part, la prise en charge microbiologique des flacons anaérobies positifs n'est pas réalisée au laboratoire de Microbiologie du CHU de Tizi-Ouzou et ce, pour un manque de moyen matériel. Ceci entraine une sous-estimation du nombre de bactériémies.

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Les données statistiques recueillies au laboratoire de microbiologie du CHU de Tizi-Ouzou et selon la période de l'étude, nous a permis, d'une part d'établir une écologie bactérienne spécifique à chaque service de soin.

Ce travail, nous a également permis d'apprécier une variation des souches isolées pendant la période COVID avec une augmentation du nombre de cas de bactériémie à *S. marcescens*, SCN et à entérocoques. En parallèle, une diminution du nombre de cas de bactériémies à *E. coli*, *A. baumanii* et à *S. aureus* a été observée.

D'autre part, l'étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques a mis le point sur les services à risque de BMR qui sont les services de pédiatrie, d'hématologie et de réanimation médicale. Ces services sont des unités de soins critiques pour les entérobactéries BLSE, les SARM et les ABRI.

Les laboratoires de microbiologie et d'hygiène peuvent jouer un rôle crucial dans la diminution du taux de résistance en fournissant, régulièrement, à chaque service de soin son écologie bactérienne ainsi que le taux de résistance aux antibiotiques et en s'assurant de la mise en place des mesures d'hygiènes adéquates. Une signalisation systématique des BMR sur les comptes rendus des résultats et une alerte téléphonique, par exemple, peuvent contribuer à sensibiliser le personnel de santé.

Le prélèvement est le premier point critique susceptible d'influer sur le résultat de l'hémoculture. Ce point est, selon le point 5.4 de la Norme NF EN ISO 15189 [33], sous la responsabilité directe du biologiste. Un prélèvement de qualité satisfait à plusieurs critères ou exigences. Le deuxième point critique est la mise en place d'un dialogue clinico-biologique avec la transmission des résultats même partiels en temps réel.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Schønheyder HK, Søgaard M.** Existing data sources for clinical epidemiology: The North Denmark Bacteremia Research Database. Dove Medical Press Ltd, **2010.**
2. **Bryan CS**. Clinical implications of positive blood cultures. Clin Microbiol Rev **1989** ; 2 : 329-353.
3. **ECN-PILLY 2020.** (CMIT) Collège des Universitaires des Maladies Infectieuses et Tropicales. Maladies infectieuses et tropicales; Bactériémies et fongémies de l'adulte et de l'enfant. ALINEA plus, **2020**.
4. **Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H *et al*.** Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med* **2006**; 34: 344-353.
5. **Vincent JL, Marshall JC, Namendys-Silva SA, *et al*.** Assessment of the worldwide burden of critical illness: the intensive care over nations (ICON) audit. *Lancet Respir Med* **2014**; 2: 380- 386.
6. **F. Garnier, J.-L. Mainardi.** Bactériologie médicale **2016**, Elsevier Masson SAS, chapitre 13, page 123-139.
7. **Seifert H.** The Clinical Importance of Microbiological Findings in the Diagnosis and Management of Bloodstream Infections, Clinical Infectious Diseases, **2009**; 48: 238-245.
8. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Identifying Healthcare-associated Infections (HAI) for NHSN Surveillance. **2016.**
9. **Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM**. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. Am J Infect Control. **1988** juin ;16 (3) :128-40.
10. **Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, et al.** Health Care–Associated Bloodstream Infections in Adults: A Reason To Change the Accepted Definition of Community-Acquired Infections. Ann Intern Med. **2002** nov 19;137(10):791-7.
11. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC)**. Bloodstream Infection Event (Central Line-Associated Bloodstream Infection and Non-central Line Associated Bloodstream Infection). **2020**.
12. **Matteo B, Elda R**. **and Alessia C**. Bloodstream infections in the Intensive Care Unit. Virulence. **2015**.
13. **Carpentier JP, Morillon M et Petrognani R.** Bactériémies. Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés), Maladies infectieuses, 8-003-S-10, **2001**, 7 p.

14. **Oppliger E.** Analyse des épisodes de bactériémies chez les patients nécessitant une prise en charge aux soins intensifs. Lausanne, Décembre 2012.
15. **Fraperie P., Lasserre M.** Mécanisme physiopathologique des bactériémies https://microbiologiemedicale.fr/mecanismes-physiopathologiques-bacteriemies/.
16. **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.
17. **Dollé V**. Bactériémie: définition, causes et symptômes. https://www.passeportsante.net.
18. **Zidouh A.** Le profil bactériologique des bactériémies et l'état de résistances aux antibiotiques. Marrakech : Faculté de médecine et de pharmacie ; **2019**.
19. **Hammami S, Dahdeh C, Mamlouk K, Ferjeni S, Maamer E Zaineb Hamzaoui et al** , Rectal Carriage of Extended-Spectrum Beta-Lactamase and Carbapenemase Producing Gram-Negative Bacilli in Intensive Care Units in Tunisia. Microb Drug Resist, **2017**. **23**(6): p. 695-702.
20. **Hu Y., Y. Matsui** and **W.R. L**, *Risk factors for fecal carriage of drug-resistant Escherichia coli:* a systematic review and meta-analysis. Antimicrob Resist Infect Control, **2020**. **9**(1): p. 31.
21. **Adil FZ.** Les aspects bactériologiques des bactériémies en réanimation de l'HMIMV étude prospective 10 mois. Rabat : Université Mohammed V de Rabat ; **2021**.
22. **Berthezène C.** Performance diagnostique de la procalcitonine plasmatique pour la détection d'une contamination des hémocultures. Thèse de médecine. Université de lorraine ; **2020**.
23. **Koussa W, Kermia L, Izouine F.** Germes isolés en hémocultures et leurs résistances aux antibiotiques durant l'année **2018**. Tizi-Ouzou : Université de Mouloud Mammeri ; **2019**.
24. **Riegel P, De Briel D, Dauuwalder O.** Automatisation de l'identification bactérienne. Revue Francophone des Laboratoires. **2016**, N° 482.
25. **Accoceberry I, Cornet M, Lamy B** ; Bactériémies et fongémies- hémocultures. REMIC **2018**.
26. **Muylaer A., Mainil J.G.** Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité ». Ann. Méd. Vét., **2012**, 156, 109- 123.
27. **Rahal K., Benslimani A., Tali-Maamar H., Missoum MFK., Benamrouche N., Ammari H.,** Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale, édition 2020.

28. **Observatoire National** de l'**Epidémiologie** de la **Résistance Bactérienne** aux **Antibiotiques (ONERBA).** Rapport d'activité annuel. **2020**
29. **Senni D, Elharti I.** Profil bactériologique des bactériémies à bactéries multi-résistantes au CHU Mustapha, Alger. **2016.**
30. Organisation Mondiale de la Santé. Plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens. OMS. **2015**.
31. **Safdar N, Maki DG.** The commonality of risk factors for nosocomial colonization and infection with antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, gram-negative bacilli, *Clostridium difficile*, and *Candida*. Ann Intern Med. **2002** Jun 4 ; 136(11):834-44.
32. **Tacconelli E, De Angelis G, Cataldo MA, Mantengoli E, Spanu T, Pan A, et al.** Antibiotic usage and risk of colonization and infection with antibiotic-resistant bacteria: a hospital population-based study. Antimicrob Agents Chemother. **2009** Oct ; 53(10):4264-9.
33. **NF EN ISO 15189,** Version 2012

ANNEXES

ANNEXE 1

	Pédiatrie	Pédiatrie Immuno Hémato	Réanimation Pédiatrie	Néonat-ologie	Chirurgie Infantile	Urgences pédiatriques	Cardio-logie	Infectio-logie	Néphro-logie	Hémato-logie	Réanimation médicale	Réanimation chirurgicale	Urgences Chirurgicales	Urgences Médicales
E. coli	1	2		8		9		14	2	8		1	4	14
K. pneumoniae	4	5		27	6	8	2	10	1	16	2		7	6
K. oxytoca					2				1	2	1			
Klepsiella spp	2	2		1			1	1	1	3				
E. cloacae	1			8		2		1	2	4			2	1
Enterobacter spp		1		1		2	1			1				1
S. marcescens	3	2		17		33	1	3		6				5
Serratia spp		1		2		1				2				
Salmonella spp	1					5		3	2	2				1
P. aeruginosa	5	3		5		9	3	4	3	16	5	1	3	3
A. baumannii	4	1		5	1	2		2		7	6	2	2	4
S. aureus	3	1	1	5		5	10	18	8	6	1		3	17
SCN	6	11		4	1	4	2	4	3	6	7	2	1	5
Enterococcus spp	1	2		4		5	2	1	1	10	8	3	1	2
Streptocuccus spp		3		3	1	11	4	9	1	2	1	1		5

ANNEXE 2

Bonnes pratiques de prélèvement des hémocultures

Le prélèvement de sang pour hémoculture doit être de qualité et doit satisfaire à plusieurs exigences :

- **Éviter les contaminations du prélèvement** (conditions d'asepsie rigoureuse) et travailler en sécurité pour le préleveur (respect des précautions standards)
- Prélever une **quantité suffisante de sang** : la sensibilité de la détection des microorganismes dépend du volume de sang inoculé dans les flacons d'hémocultures.

DOMAINE D'APPLICATION

- Les prélèvements sanguins pour hémocultures peuvent être effectués par tout professionnel de santé habilité à prélever des hémocultures. Ce sont des actes infirmiers effectués sur prescription médicale.
- Toutes les étapes pré-analytiques, effectuées dans les secteurs de soins, sont sous la responsabilité du biologiste.

DEFINITIONS

- L'hémoculture permet de faire le diagnostic d'une bactériémie ou d'une fongémie. Elle consiste à mettre en culture du sang circulant afin détecter le micro-organisme, l'isoler, l'identifier, déterminer sa sensibilité aux anti-infectieux pour une prise en charge thérapeutique adéquate.
- L'hémoculture est pratiquée sur **prescription médicale avant tout traitement** anti-infectieux. A défaut, une fenêtre thérapeutique de 48 à 72 heures est recommandée.
- Une hémoculture correspond à l'ensemencement, à partir de la même ponction veineuse d'un ou de plusieurs flacons selon le microorganisme recherché (bactéries aérobies et/ou anaérobies ou des champignons).

ABREVIATIONS

- AES : accident d'exposition au sang
- DIV : dispositif intravasculaire
- DAOM : Déchets assimilés aux ordures ménagères
- SHA : solution hydro-alcoolique
- UFC : unité formant colonies

MATERIEL NECESSAIRE

- **Pour le préleveur**
  - Masque de soins de type II
  - Gants d'examen non stériles à usage unique (des gants d'intervention stériles sont à prévoir si risque de retouche du point de ponction après antisepsie, par exemple en présence d'un mauvais capital veineux du patient ou si le préleveur est peu expérimenté)
  - Solution hydro-alcoolique (SHA)
  - Autres éléments de protection individuelle (EPI) en fonction des précautions complémentaires

- **Pour la peau du patient**
  - Compresses stériles
  - Eau stérile
  - Antiseptique
  - Pansement adhésif (type Micropore)

- **Pour la réalisation de l'hémoculture**
  - Plateau propre ou chariot de soin propre
  - Garrot nettoyé et désinfecté
  - Dispositif de prélèvement sécurisé pour hémoculture
  - Bétadine® alcoolique 5% pour désinfecter l'opercule des flacons d'hémoculture
  - Champ de protection de lit
  - Collecteur d'aiguilles
  - Flacons d'hémoculture, conservés à l'abri de la lumière, de préférence dans leur emballage d'origine :
    - Flacon BACT/ Alert^{TM}) pour la recherche des microorganismes aérobies et anaérobies
    - Flacon à bouillon citraté

  - Un prélèvement d'hémoculture comprend habituellement 1 à 3 flacons aérobies et 1 à 3 flacons anaérobies ; néanmoins, il existe des cas particuliers : par exemple, chez l'enfant dont le poids est inférieur ou égal à 12,7 kg, un seul flacon est prélevé.

BONNES PRATIQUES DU PRELEVEMENT D'HEMOCULTURES

Préparation du matériel	
 	- Vérifier la **prescription** sur le dossier de soins et préparer le bon de demande d'examen - Respecter les règles d'identitovigilance - Fermer la porte de la chambre - Porter un masque de soins de type II - Se frictionner les mains avec une SHA - Vérifier la limpidité et la date de **péremption** des flacons - Retirer la capsule des flacons et **désinfecter l'opercule** avec une compresse stérile imbibée de l'antiseptique alcoolique ; **laisser la compresse de désinfection sur le flacon jusqu'au prélèvement** - Volume de sang à prélever : • poids ≤ 1 kg ⇨ **0,5 à 2 mL** • de 1,1 à 2 kg ⇨ **1,5 à 4,5 mL** • de 2,1 à 12,7 kg ⇨ **3 à 6 mL** • de 12,8 à 36,3 kg ⇨ **5 à 7 mL** • > 36 kg et adultes ⇨ **8 à 10 mL** - Disposer une protection sous le bras du patient

Désinfection et antisepsie du site de ponction

- Se frictionner les mains avec une **SHA**

<u>Cas général</u> = ponction veineuse :

Sauf indication contraire lors de la prescription médicale, les hémocultures doivent être prélevées par **ponction veineuse** (seule méthode validée pour prélever le sang en vue d'une culture microbienne) ; en effet, le recueil de sang à travers un dispositif intravasculaire, augmente de façon significative la fréquence des contaminants.

- Choisir le **site de ponction**
- Préférer l'avant-bras (ou à défaut, le dos de la main)
- Contre-indication : côté d'un curage ganglionnaire, fistule artério-veineuse, bras hémiplégique, présence sur le bras d'une lésion cutanée …
- Poser le garrot légèrement serré, au moins à 10 cm du pli du coude (pour éviter que le garrot touche le lieu de ponction lors de son retrait)

Palper délicatement les veines en profondeur à la recherche de la meilleure veine (meilleur gonflement)

- Réaliser une désinfection cutanée large du site de ponction
- Le choix de l'antiseptique et certaines étapes dépendent de l'âge :

	Age > 30 mois	Age ≤ 30 mois	
Détersion	Bétadine®scrub ou Hibiscrub®* ou Biseptine®	Biseptine®	
Rinçage	eau stérile	/	
Séchage	compresses stériles	compresses stériles	
Désinfection avec un antiseptique dermique	Bétadine ® alcoolique ou Chlorhexidine® alcoolique* ou Biseptine®	Biseptine®	
Séchage complet			

*pour la détersion et la désinfection, utiliser les produits mentionnés de la même couleur

	Après cette étape, ne plus palper la zone de ponction ! **<u>Cas particulier</u> : prélèvement à travers un cathéter ou tout autre matériel intravasculaire ou implantable**

Réalisation de la ponction d'hémoculture 	Se frictionner les mains avec une SHA - Enfiler des gants d'examen non stériles à usage unique ou gants d'intervention stériles si risque de retouche du point de ponction **<u>Cas général chez l'adulte</u> (hors endocardite et infection liée à un DIV) = prélèvement UNIQUE** : 4 à 6 flacons en 1 seul geste (2 à 3 flacons aérobies et 2 à 3 flacons anaérobies) un jour donné. - Réaliser la **ponction veineuse** avec une unité de prélèvement - Dès l'apparition de sang dans la tubulure, adapter le flacon d'hémoculture en piquant au centre et en enfonçant profondément le dispositif - Remplir le flacon avec **8 à 10 mL de sang par flacon** (afin d'obtenir un **volume optimal total de 40-60 mL**) **Une quantité trop faible ou trop importante de sang fausse le résultat** - Maintenir le flacon en position verticale pour contrôler le remplissage adéquat jusqu'au trait de graduation - Prélever le flacon **aérobie** en **1er** (afin de purger la tubulure), puis le flacon **anaérobie** en **2ème**. • Numéroter les flacons dans l'ordre de prélèvement - **Homogénéiser** les flacons par retournement

	<u>Cas particuliers</u> : **1. Diagnostic des infections microbiennes liées à un DIV** (cathéter, chambre implantable) **:** - Réaliser une antisepsie avec un antiseptique alcoolique des sites de ponction - réaliser ‘’au même moment’’ (≤ 10 mn) deux prélèvements de sang : un par ponction veineuse périphérique et un à partir du DIV (**sans purge préalable**). Pour ce faire : • Prélever par ponction veineuse périphérique : **4 à 6 flacons** en **un seul prélèvement ;** le flacon **aérobie** en **1er** (afin de purger la tubulure), puis le flacon **anaérobie** en **2ème**. Numéroter les flacons dans l’ordre de prélèvement et vérifier le volume prélevé par flacon • Prélever via le dispositif : **2 flacons (1 aérobie et 1 anaérobie)** ; le volume de sang prélevé par flacon sur le dispositif doit être identique à celui prélevé par flacon en périphérie (par exemple : si en périphérie, un volume de 8 à 10 mL a été prélevé par flacon, le volume de sang à prélever à travers le dispositif devra être de 8 à 10 mL par flacon) - Les flacons doivent être correctement identifiés (heure et mode de prélèvement) et envoyés en même temps au laboratoire de Microbiologie afin de déterminer les délais de positivité des flacons. **2. Diagnostic bactériologique d’une endocardite** Prélever **3 hémocultures** (flacon aérobie et anaérobie) obtenues par **3 ponctions veineuses**, échelonnées sur **24 heures** espacées **d’une heure minimum** avant toute prise antibiotique. En cas de suspicion d’endocardite fongique, prélever en plus 1 flacon Mycosis. En l’absence de positivité, il convient de répéter les hémocultures 2 à 3 jours plus tard. **3. Prélèvements d’hémocultures en néonatalogie et en pédiatrie** - Chez l'enfant, la densité des bactéries dans le sang est plus importante (1000 UFC/mL) que chez l'adulte (1 UFC/mL) ; cela permet de limiter la quantité de sang à quelques millilitres chez le nouveau-né

	- la concentration bactérienne diminuant avec l'âge, le volume de sang à prélever est à adapter en fonction du poids de l'enfant.

Retrait de l'aiguille et gestion des déchets 	- Activer, à la fin du prélèvement, la sécurité du dispositif pour prévenir tout risque d'AES - Retirer le garrot - Mettre une compresse propre et sèche au niveau du point de ponction et retirer l'aiguille d'un coup sec en appuyant immédiatement - Maintenir la pression (ou le faire faire par le patient) pendant 2 à 3 minutes avant de poser un pansement non stérile (type Micropore) - Éliminer l'unité de prélèvement, au lit du patient, dans le collecteur à objets piquants, coupants et tranchants ainsi que l'ensemble du matériel de prélèvement dans les collecteurs adaptés. Les déchets sont triés selon le guide « tri des déchets ». - Retirer et éliminer les gants dans la filière DAOM - Se frictionner les mains avec une SHA

Etiquetage et conditionnement des prélèvements pour envoi	- Chaque flacon doit être étiqueté correctement (au chevet du patient) : indiquer l'i**dentité** du patient (Nom, Prénom, Date de naissance) et la **date** et l'**heure** du prélèvement - Remplir autant de bons de demande que de flacons (nom du patient, date de naissance, date et heure de prélèvement, mode de prélèvement (périphérique ou sur cathéter ou autre dispositif), numérotation du flacon, identité du prescripteur et du préleveur, renseignements cliniques, antibiothérapie éventuelle …) - Envoyer tous les flacons en même temps au laboratoire

Conditions de transport au laboratoire 	- Acheminer au laboratoire, **le plus rapidement possible** les flacons, à **température ambiante**, afin qu'ils soient introduits dans l'automate le plus tôt possible accompagnés des feuilles de demande En cas de retard d'acheminement, garder les flacons inoculés à **température ambiante** : **ne pas réfrigérer ni pré-incuber les flacons** car cela est susceptible d'entraîner un risque de faux négatif (algorithmes de détection pris en défaut par l'automate)

ANNEXE 3 :

Glasgow Coma Score (GCS) :

L'échelle de coma de Glasgow est une méthode pratique d'évaluation de l'altération du niveau de conscience en réponse à des stimulis définis, à un instant donné et de suivre l'évolution. Ce test est reproductible d'un examinateur à l'autre. Il peut être utilisé même par des examinateurs non médecins quelle que soit leurs expériences, tels que les secourismes ou les infirmiers.

La mesure de la profondeur du coma, qui doit être répétée, est faite à l'aide du score de coma de Glasgow. Trois paramètres à tester : Ouverture des yeux (Y), Réponse verbale (V), Réponse motrice (M). Seule la meilleure réponse est notée.

Enfant/Adulte		
Activité	**Score**	**Description**
Ouverture des yeux	4	Spontanée
	3	A la demande
	2	A la douleur
	1	Aucune
Réponse verbale	5	Orientée
	4	Confuse
	3	Paroles inappropriées
	2	Sons incompréhensibles
	1	Aucune
Réponse motrice	6	Obéit aux commandes
	5	Localisé à la douleur
	4	Retrait à la douleur
	3	Flexion anormale (décortication)
	2	Extension anormale (décérébration)
	1	Aucune

Bébé		
Activité	**Score**	**Description**
Ouverture des yeux	4	Spontanée
	3	A la parole ou au son
	2	A la douleur
	1	Aucune
Réponse verbale	5	Gazouille
	4	Irritable, pleure
	3	Pleure à la douleur
	2	Gémit à la douleur
	1	Aucune
Réponse motrice	6	Normale spontanée
	5	Localisé à la douleur
	4	Retrait à la douleur
	3	Flexion anormale (décortication)
	2	Extension anormale (décérébration)
	1	Aucune

Score SOFA :

Calcul du score SOFA	0 point	1 point	2 points	3 points	4 points
PaO_2/FiO_2	>400	301-400	201-300	101-200 et VA	≤100 et VA
Plaquettes $x10^3/mm^3$	>150	101-150	51-100	21-50	≤20
Bilirubine, mg/L (mmol/L)	<12 (<20)	12-19 (20-32)	20-59 (33-101)	60-119 (102-204)	>120 (>204)
Hypotension	PAM ≥70mmHG	PAM <70mmHG	Dopamine ≤ 5 ou dobutamine (toute dose)	Dopa > 5 ou adrénaline≤0,1 ou noradré ≤0,1	Dopamine>15 Ou adré>0,1 ou noradré>0,1
Score de Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	<6
Créatinine ; mg/L (µmol/L) ou diurèse	<12 (<110)	12-19 5110-170	20-34 (171-299)	35-49 (300-440) ou <500mL/j	>50 (>400) ou <200mL/j

Résumé :

Les bactériémies sont responsables d'une morbidité et d'une mortalité importante. Parmi les inquiétudes soulevées par cette problématique, la résistance des bactéries aux antibiotiques exige une attention particulière et nécessite une prise de mesures spécifiques. De ce fait, ce travail a été réalisé dans le but de mettre en exergue les différents micro-organismes isolés des hémocultures et d'évaluer leurs profils de résistance aux antibiotiques au CHU de Tizi-Ouzou pendant la période de pandémie (du 1 janvier 2019 au 31 décembre 2021)

Cette étude observationnelle et rétrospective inclut tous les résultats d'hémocultures positives du laboratoire de microbiologie du CHU de Tizi-Ouzou.

D'après les résultats, les entérobactéries ont été les micro-organismes les plus fréquemment rencontrés pendant notre période d'étude, principalement les *K. pneumoniae*, les *Serratia* spp et les *E. col*i, suivi des *S. aureus* et des *P. aeruginosa*.

Les services avec des taux de bactériémies élevés sont la néonatologie, l'hématologie, les pathologies infectieuses et les urgences adultes et enfants. Une écologie bactérienne spécifique a été observée dans chacun des services.

Durant la période pré-COVID et COVID, l'écologie bactérienne a sensiblement varié laissant place à une augmentation du nombre de cas de bactéries comme *S. marcescens*, staphylocoques à coagulase négative et à entérocoque. En parallèle, une diminution du nombre de cas de bactériémies à *E. coli*, *A. baumannii* et à *S. aureus*.

En ce qui concerne la résistance des souches aux antibiotiques, une recrudescence des entérobactéries BLSE et *A. baumannii* résistant à l'imipenème a été constatée durant les deux périodes de l'étude. Le taux de SARM a doublé en 2020 pour revenir en 2021 à son niveau de la période pré-COVID.

La rationalisation de la prescription des antibiotiques et la mise en place d'un système de surveillance des bactéries multi-résistantes devront être mises en œuvre en urgence ainsi que les mesures d'hygiène. La sensibilisation du personnel de santé et la population sont primordiaux afin de limiter l'émergence des bactéries multi-résistantes dans nos structures de soin.

Summary

Bacterial infections are responsible for significant morbidity and mortality. Among the concerns raised by this problem, the resistance of bacteria to antibiotics requires particular attention and specific measures. Therefore, this work was carried out with the aim of highlighting the different microorganisms isolated from blood cultures and evaluating their antibiotic resistance profiles at the University Hospital of Tizi-Ouzou during the pandemic period (from 1 January 2019 to 31 December 2021).

This retrospective study includes all positive blood culture results from the microbiology laboratory of Tizi-Ouzou University Hospital.

According to the results, enterobacteria were the most frequently encountered microorganisms during our study period, mainly *K. pneumoniae, Serratia* spp and *E. coli*, followed by *S. aureus* and *P. aeruginosa*.

The departments with high rates of bacteremia were neonatology, haematology, infectious diseases and adult and paediatric emergencies. Bacterial ecology was observed in each of the departments.

During the pre-COVID and COVID period, the bacterial ecology varied significantly, with an increase in the number of *S. marcescens*, SCN and *Enterococcus* cases. At the same time, there was a decrease in the number of cases of *E. coli*, *A. baumannii* and *S. aureus* bacteremia.

With regard to the resistance of strains to antibiotics, a recrudescence of ESBL enterobacteria and imipenem-resistant *A. baumannii* waere observed during the two study periods. The rate of MRSA doubled in 2020 and returned to its pre-COVID level in 2021.

Rationalisation of antibiotic prescribing and the implementation of a surveillance system for multi-resistant bacteria should be implemented as a matter of urgency, as well as hospital hygiene and awareness-raising among health care personnel and the general public, in order to limit the emergence of multi-resistant bacteria in our health care facilities.