

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique

Université Mouloud Mammeri

Faculté de Médecine

Tizi-Ouzou

Département de Pharmacie

N° D'ORDRE :



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة مولود معمري

كلية الطب

تيزي وزو

قسم الصيدلة

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Présenté et soutenu publiquement

En 19 janvier 2021

En vue de l'obtention du Diplôme de Docteur en Pharmacie

Thème

*Mise en place d'une paillasse d'antibiogramme et
son impact au niveau du laboratoire de
microbiologie du CHU BELLOUA de Tizi-Ouzou*

Réalisé par :

AMOURA Hadjira

MOGHRAOUI Kahina

Promoteur : Dr. DJERBOUA Taoufik

Membres de jury :

Pr. M.N .OUAR-KORICHI

Professeur en
microbiologie

CPMC Alger

Présidente de jury

Pr. H. BOUCHAIB

Professeur en maladies
infectieuses

CHU Tizi-Ouzou

Examinatrice

Dr. S.N.BENADDA

Maitre assistante en
microbiologie

EHS EL Kettar
Alger

Examinatrice

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements

Nous remercions Dieu le Tout Puissant et Miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce travail.

*Nous tenons à remercier notre encadreur **Dr DJERBOUA Taoufik**, Pharmacien maitre-assistant hospitalo-universitaire en Microbiologie clinique à l'université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou pour nous avoir confié ce travail, et accepter de le diriger par sa compétence, ses précieux conseils et son orientation minutieuse malgré tous les engagements professionnels qu'il assure.*

*Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre mémoire en acceptant de l'examiner, de l'enrichir et de le juger.
Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites par votre présence. Veuillez accepter, l'assurance de notre estime et de notre profond respect.*

*Nous remercions Professeur **OUAR-KORICHI Mounira Nabila**, professeur en microbiologie, laboratoire central de biologie, Centre Pierre et Marie Curie, Alger, présidente de jury.*

*Nous remercions Professeur **BOUCHAIB Hayet**, professeur en maladies infectieuses au CHU Tizi-Ouzou, examinatrice.*

*Nous remercions **Dr. BENADDA Samia Nesrine**, pharmacienne maitre assistante hospitalo-universitaire, EHS EL Kettar, Alger, examinatrice.*

*Nous remercions **Dr. AMEZIANE**, medecin assistante en microbiologie au laboratoire de microbiologie de Belloua ainsi que l'ensemble du personnel de laboratoire pour leur aide, encouragement et gentillesse à leur tête **F.NESSAS**.*

*Des remerciements très particuliers vont à nos collègues **JUBA** et **ADEL**, pour toute l'aide qu'ils nous ont apportée.*

Enfin, nous remercions toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réussite de ce travail

Dédicace

C'est avec joie, fierté, sincérité et beaucoup d'amour que j'écris ces dédicaces en guise de reconnaissance, de respect, de partage et de remerciements :

*A ma lumière éteinte si tôt, à mon bonheur chassé si loin, à l'irremplaçable, à celle qui m'a tout donné et rien pris, à celle à qui je dois tout, à la mémoire de ma chère **MAMAN**, sache que, oui " tu es plus là où tu étais, mais tu es partout là où je suis".*

*A mon point faible et source de force, mon exemple, mon héros , ma source de joie, à l'unique dans son genre et son nombre, à celui qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui, pour le tout que je ne puisse résumer ici, sache que j'étais ,je suis et je serai à jamais fière d'être ta fille. A toi mon cher **PAPA**.*

*A celui qui est la plus belle chose que la vie m'a donné, que je ne puisse imaginer ma vie sans lui, mon bijou précieux, mon soutien, mon complice, mon très cher frère **ANIS**.je t'aime si fort.*

*A ma deuxième famille avec qui j'ai passé ces six ans d'études et que je ne puisse imaginer comment ça aurait été sans eux : à ma très chère tante **Cherifa**, à mon beau-oncle **Nacer**, à **Sidali**, à ma petite jumelle **Alaa**, au bout de sucre **Abderahmane**. A mes best cousines ever, mes chères **Bouchra** et **Romeissa**, pour tout ce qu'on a partagé, je suis chanceuse de vous avoir dans ma vie.*

*A mon cher grand-père **Said**.*

*A mon cher oncle **Karim**, à ma chère belle- tante **Rafika**, pour tous ces bienfaits inconditionnels, je vous serai toujours reconnaissante.*

*A l'adorable unique **Farah**.*

*Au plus beau cadeau du ciel, mes chers cousins, mes frères : **Sofiane**, **Massi** et **Jgurtha**.*

*A toi **Massi** particulièrement une seconde fois.*

*A mon cher oncle "Damoh", à tata **Aldjia**, à **Hanane**, à **Samah**. Au petit ange "Yasmine".*

*A ma chère tante **Djamila**.*

A tous les autres membres de ma famille qui m'aiment et que j'aime beaucoup.

A tous mes enseignants tout au long de mon parcours scolaire qui ont cru en moi et particulièrement encouragée.

A toutes ces belles âmes avec qui le destin m'a croisé le chemin.

A tous mes amis tout au long de ma vie, mes amis d'enfance, du primaire, du CEM, du lycée et aux belles rencontres de la fac.

A toi Nassima

A toi Makhloki Ijamil

A Hadjira, Juba et Adel pour tout ce que vous savez.

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

KAHINA

Dédicace

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail

*A mes **chers parents***

Qui m'ont donné tout, l'amour, l'encouragement, ainsi que la patience et le soutien tout au long de mes études

Que Dieu le tout puissant vous préserve, vous accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et vous protège de tout mal

*A mes chers frères **Souhil, Sidali et Nesreddine***

*À mes chères sœurs **Fatiha, Lynda et Sihem***

Qui n'ont jamais cessé de prier pour moi, qui ont toujours été à mes côtés

*À mes chères nièces **SANA et MANER***

*À mes chers neveux **HAKIM, KARIM et SAYFO***

Qui savent toujours comment me rendre le sourire, procurer la joie et le bonheur à toute la famille.

Je vous aime énormément mes amours

A toutes ma famille

*A toi **Hanane**, ma meilleure amie je t'aime énormément et je te souhaite beaucoup de succès et de bonheur.*

*A mes amis qui m'ont accompagné pendant cette année : **Kahina, Adel et Juba***

A tous mes amis

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à accomplir ce travail

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

Hadjira

Table de matières

Table des matières

Remerciements

Dédicace

Table des matières

Liste des abréviations et Acronymes

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des annexes

Introduction 1

Partie théorique

Chapitre I : Généralités sur les antibiotiques

1	Définition d'un antibactérien	2
2	Rappel sur la structure bactérienne	3
3	Classification des antibactériens	4
4	Mode d'action des antibiotiques	5
4.1	Antibiotiques agissant sur la paroi bactérienne	5
4.1.1	Bêta-lactamines	5
4.1.2	Glycopeptides	5
4.1.3	Fosfomycine	6
4.2	Antibiotiques agissant au niveau des membranes	6
4.2.1	Polymexines	6
4.2.2	Lipopeptides cycliques : Daptomycine	6
4.3	Antibiotiques agissant sur la synthèse protéique	7
4.3.1	Aminosides	7
4.3.2	Tétracyclines	7
4.3.3	Macrolides :	7
4.3.4	Phénicolés	7
4.3.5	Acide fusidique	8
4.4	Antibiotiques agissant sur la synthèse des acides nucléiques.....	8
4.4.1	Quinolones	8
4.4.2	Rifamycine	8
4.4.3	Sulfamides et Triméthoprime.....	8
4.4.4	Nitro-imidazolés	8
5	Généralités sur la notion pharmacocinétique/pharmacodynamie des antibactériens.....	9
5.1	Pharmacocinétique.....	9
5.1.1	Absorption.....	9
5.1.2	Distribution	9

Table de matières

5.1.3	Métabolisme.....	9
5.1.4	Elimination.....	9
5.2	Pharmacodynamie	9
5.3	Paramètres PK/PD	10
5.3.1	Concentration minimale inhibitrice « CMI ».....	10
5.3.2	Concentration minimale bactéricide « CMB »	10
5.3.3	Pic sérique « Cmax »	10
5.3.4	Surface sous la courbe ou l'aire sous la courbe « AUC »	10
5.3.5	Temps d'exposition « t>CMI ».....	10
5.3.6	Concentration préventive de l'apparition des mutations « CPM »	11
5.3.7	Fenêtre de sélection de mutants « FSM »	11
5.4	La classification des antibiotiques en fonctions des paramètres PK/PD.....	11
5.4.1	Antibiotiques à effet bactériostatique	11
5.4.2	Antibiotiques à effet bactéricide	11
5.4.3	Antibiotiques à effet post-antibiotique « EPA »	11
5.4.4	Antibiotiques à Effet inoculum.....	12
5.5	Relation PK/PD et le mode d'administration des antibiotiques	12
5.6	Relations PK/PD et le suivi thérapeutique des antibiotiques	12
5.6.1	Le suivi thérapeutique des bêta-lactamines	12
5.6.2	Le suivi thérapeutique des aminosides	13
5.6.3	Le suivi thérapeutique des fluoroquinolones	13
5.6.4	Le suivi thérapeutique des glycopeptides	13
5.7	Relations PK/PD et émergence de résistances	13

Chapitre II : L'antibiorésistance

1	Définitions.....	15
1.1	La résistance naturelle	15
1.2	La résistance acquise	16
1.3	La multi-résistance	16
2	Support génétique de la résistance	17
2.1	La résistance chromosomique	17
2.2	La résistance extra chromosomique	18
2.2.1	Eléments génétiques mobiles	18
2.2.1.1	Plasmides	18
2.2.1.1.1	Caractéristiques des plasmides bactériens	18
2.2.1.1.2	Classification des plasmides	19
2.2.1.2	Éléments Transposables	19
2.2.1.3	Intégrons	19
2.2.1.4	Bactériophages.....	19

Table de matières

3	Mécanismes biochimiques de la résistance.....	20
3.1	L'inactivation enzymatique des antibactériens.....	20
3.1.1	Les enzymes hydrolytiques.....	20
3.1.1.1	Les β -lactamases.....	20
3.1.1.2	Les macrolides estérases.....	21
3.1.1.3	Les époxydases.....	21
3.1.2	Les transférases.....	21
3.1.2.1	Les acyltransférases.....	21
3.1.2.2	Les phosphotransférases.....	22
3.1.2.3	Les nucléotidyltransférases.....	22
3.1.2.4	Les glycosyltransférases.....	22
3.1.3	Les enzymes REDOX.....	22
3.2	Modification de la concentration intracellulaire des antibactériens.....	23
3.2.1	Altération de la perméabilité.....	23
3.2.1.1	Structures impliquées dans la résistance par mécanisme de l'imperméabilité.....	23
3.2.1.1.1	Biofilm.....	23
3.2.1.1.2	Les porines.....	24
3.2.2	Les pompes d'efflux.....	25
3.3	Altération de la cible.....	26
3.3.1	Modification des protéines cibles par mutations spontanées.....	26
3.3.2	Modification de la cible par les gènes acquis.....	26
3.3.3	Protection de la cible.....	27
3.3.4	Contournements de cibles.....	27
3.3.5	Séquestration de cibles.....	27

CHAPITRE III : Méthodes d'exploration de la sensibilité aux antibiotiques

1	Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques.....	29
2	Méthode qualitative.....	30
2.1	Test de diffusion de disques.....	30
2.2	Définitions.....	30
3	Méthodes quantitatives.....	32
3.1	Détermination de la concentration minimale inhibitrice.....	32
3.1.1	Dilution en milieu liquide.....	32
3.1.2	Dilution en milieu gélosé.....	32
3.1.3	Gradient test « E-test ».....	32
3.2	Détermination de CMB.....	32
4	Avantages et limites des différentes techniques.....	33
5	Tests complémentaires phénotypiques.....	34
5.1	Recherche de BLSE.....	34

Table de matières

5.1.1	Des méthodes qualitatives.....	34
5.1.2	Des méthodes quantitatives.....	34
5.2	Recherche de carbapénèmases.....	35
5.2.1	Test de Hodge modifié « THM »	36
5.2.2	Test d'inhibition de carbapénèmase	36
5.2.3	Méthode d'inhibition de carbapénème « MIC »	37
5.3	Recherche de céphalosporinase (AmpC).....	38
5.3.1	Dépistage.....	38
5.3.2	Confirmation	38
5.4	Recherche de β -lactamase	38
5.4.1	Test de bordure autour du disque de pénicilline	38
5.4.2	Test de trèfle	39
5.5	Détection de staphylococcus spp résistant à la méthecilline	39
5.5.1	Test de diffusion du disque	39
5.5.2	Test de screening à l'oxacilline.....	40
5.5.3	Détermination de CMI	40
5.6	Détection de staphylococcus spp de sensibilité diminuée aux glycopeptides.....	40
5.7	Détection d'Enterococcus spp de sensibilité diminuée aux glycopeptides	40
5.7.1	Test de diffusion de disque	41
5.7.2	Test de dépistage sur gélose à vancomycine.....	41
5.7.3	Détermination de CMI	41
5.8	Détection de la résistance inductible à clindamycine	41
6	L'automatisation	42
7	Méthodes génotypiques	44
7.1	Méthodes d'identification génomique	44
7.1.1	Les méthodes d'amplification génique	44
7.1.1.1	Principe de la PCR.....	44
7.1.1.2	Différents types de PCR	45
7.1.2	Les techniques d'hybridation	45
7.1.2.1	Hybridation in situ par fluorescence « FISH"	45
7.1.2.2	Technologie microarray ADN	45
7.2	Les principaux avantages et inconvénients des méthodes génotypiques.....	46
8	Autres tests.....	47
8.1	Méthodes chromogéniques	47
8.1.1	Carba NP Test	47
8.1.2	Cica-Beta-Test	48
8.1.3	Nitrocifine	48
8.1.4	Test bleu Carba	48

Table de matières

8.2	Méthodes immunologiques.....	49
8.2.1	Test Latex : technique d'agglutination	49
8.2.2	Méthodes immunochromatographiques.....	49
8.3	Spectrométrie de masse	50

Partie pratique

Introduction

Rappel des objectifs

Chapitre I : Matériels et méthodes

1	Type et population d'étude	52
2	Critères d'inclusion, de non inclusion et d'exclusion.....	52
3	Période et lieu de l'étude.....	52
4	Matériels utilisés	53
4.1	Appareillage de routine	53
4.2	Appareillage introduit.....	53
4.3	Verreries	54
4.4	Outils de laboratoire	54
4.5	Antibiotiques et autres réactifs	54
4.6	Milieux de cultures	55
4.7	Logiciels	55
5	Méthodes.....	56
5.1	Préparation des milieux	56
5.1.1	Gélose Muller-Hinton	56
5.1.2.	Gélose Muller-Hinton au sang frais	56
5.1.3.	Gélose Muller-Hinton additionné de cloxacilline	56
5.2.	Préparation des solutions d'antibiotiques	57
5.3.	Contrôle qualité	59
5.3.1.	Contrôle de milieux de culture	59
5.3.2.	Contrôle des antibiotiques	60
5.3.3.	Contrôle des ATCC	61
5.4.	Étude de la sensibilité bactérienne aux antibiotiques	61
5.4.1.	Test de diffusion de disque.....	61
5.4.2.	Détermination de CMI	63
5.4.3.	Tests complémentaires	64
5.4.3.1.	Recherche de bêta-lactamases	64
5.4.3.2.	Recherche de BLSE.....	65
5.4.3.2.1.	Test synergie double disque	65

Table de matières

5.4.3.2.2. Test de disque combiné	65
5.4.3.2.3. Test de rapprochement	66
5.4.3.2.4. Test à la cloxacilline	66
5.4.3.3. Recherche de carbapénèmase	67
5.4.3.3.1. Test de Hodge modifiée « THM »	67
5.4.3.3.2. Test de synergie	68
5.4.3.3.3. Test à l'EDTA	68
5.4.3.4. Détection de la résistance inductible à clindamycine	69
5.4.3.5. Détection de staphylococcus spp résistant à la méthecilline par disque de céfoxitine	69

Chapitre II : Résultats et Discussion

1 Vue globale de l'activité au laboratoire de microbiologie de l'hôpital Belloua	70
1.1 Les prélèvements	70
1.2 La répartition des prélèvements selon leur provenance	71
1.3 La répartition des prélèvements selon leur nature et leur provenance	72
1.4 La répartition de prélèvements selon le sexe et l'âge des patients	73
2 Bilan de l'activité de la paillasse d'antibiogramme	74
2.1 Population de l'étude	74
2.2 Récapitulatif des positivités par prélèvements selon la provenance	74
2.3 Répartition de la population selon les souches bactériennes identifiées	76
2.4 Répartition des bactéries identifiées selon le type de prélèvement	78
2.5 Répartition des bactéries identifiées selon leur provenance	79
3 Etude de profils de sensibilité aux antibiotiques des principaux groupes bactériens	80
3.1 Profil de sensibilité aux antibiotiques d' <i>E.coli</i> dans les prélèvements urinaires	80
3.2 Profil de sensibilité aux antibiotiques de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> chez les patients hospitalisés	81
3.3 Profil de sensibilité aux antibiotiques de <i>Staphylococcus aureus</i>	82
4 Résultats des tests complémentaires	83
Conclusion et recommandations	86

Annexe

Les références bibliographiques

Liste des abréviations

Liste des abréviations et Acronymes

°C : Degré Celsius.

µg : Microgramme.

16S : Svedberg (vitesse de sédimentation).

AAC : Aminoglycosides acétyltransférases.

AARN : Algerian Antimicrobial Resistance Network.

ACC-1 : Ambler class C-1.

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

ADNc : ADN complémentaire.

ANT : Aminoside nucléotidyltransférase.

ARN : Acide Ribonucléique.

ARNm : Acide Ribonucléique messenger.

ARNr : Acide Ribonucléique ribosomal.

ARNt : Acide Ribonucléique de transfert.

ATB : Antibiotique.

ATCC : American Type Culture Collection.

AUC : Area under the curve (aire sous la courbe).

BGN : bacilles à Gram négatif.

BHI : Brain Heart Infusion.

BHI-V6 : Brain Heart Infusion additionnée de 6 µg/ml de vancomycine.

BLSE : Bétalactamases à Spectre Etendu.

C3G : Céphalosporine de 3eme générations.

CDT : Test de disque combiné.

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute.

Cmax : Concentration plasmatique maximale.

CMB : Concentration minimale bactéricide.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

cMLS_B : constitutive Macrolide-Lincosamide-StreptograminB resistance.

COVID-19 : CoronaVirus Disease 2019 : maladie à coronavirus de 2019.

CPM : Concentration préventive de l'apparition des mutations

DDST : Test de synergie double disque.

E. coli : *Escherichia coli*.

ECB : Etude CytoBacteriologie.

ECBU : Etude CytoBacteriologie des Urines.

EDTA : l'acide éthylène diamine tétra-acétique.

EF-G : Facteur d'élongation GTPas.

EPA : Effet postantibiotique.

EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.

FISH : Hybridation in situ par fluorescence.

FSM : Fenêtre de sélection de mutants.

Liste des abréviations

HGT : Transfert horizontal de gènes.
hVISA : hétéro -Vancomycine Intermediate *Staphylococcus aureus*.
I : Intermédiaire
iMLS_B : inducible Macrolide-Lincosamide-StreptograminB resistance
KPC : *Klebsiella pneumoniae* carbapénemase.
LCR : Liquide céphalorachidien.
LPS : Lipopolysaccharide.
MALDI-TOF MS : La spectrométrie de masse à temps de vol de désorption / ionisation laser assistée par matrice.
MBLs : Métallo-β-lactamases.
MDR : Multiple-drug-resistance.
mg : Miligramme.
MH : Muller- Hinton
MHLAC : Mueller-Hinton Liquide Ajusté en Cations.
MIC : Méthode d'inhibition de carbapénème.
ml : Millilitre.
MLS : Macrolide, Lincosamide et Streptogramine.
MPH : macrolides phosphotransférases.
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.
NDM : New Dehli metallo-beta-lactamase.
NTP : Nucléotides triphosphates.
OMS : Organisation mondiale de la santé.
OXA : Oxacillinase.
OXA-48 : Oxacillinase-48.
P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*
pb : Paires de bases .
PBP2a : Penicillin Binding Protein 2a.
PCR : Polymerase Chain Reaction
PK/PD : Pharmacocinétiques/Pharmacodynamique
PLP : Protéine Liant la Pénicilline
PLP2a : Protéine Liant la Pénicilline de type 2a
QRDR : Quinolones Resistance Determinant Region.
qRT-PCR : Polymerase Chain Reaction en temps réel quantitative.
QS : Quorum Sensing.
R : Résistante
REDOX : OxydoRéduction.
S : sensible.
S.aureus : *Staphylococcus aureus*.
SARM : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Methicilline.
SCN : Staphylocoque à coagulase négative.
SDR : Specific-Drug-Resistance.
THM : Test de Hodge modifié.
UI : Unité Internationale.

Liste des abréviations

VISA : Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* de sensibilité intermédiaire à la vancomycine).

VRSA : Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus*.

Liste des abréviations des antibiotiques

Bétalactamines		Aminosides	
Pénicilline	PEN	Gentamicine	GEN
Oxacilline	OXA	Gentamicine haut niveau	HLG
Cloxacilline	CLOXA	Streptomycine	STR
Ampicilline	AMP	Streptomycine haut niveau	HLS
Amoxicilline	AMX	Kanamycine	KAN
Amoxicilline + acide clavulanique	AMC	Amikacine	AMK
ticarcilline	TIC	Tobramycine	TOB
Ticarcilline + acide clavulanique	TCC	Nétilmicine	NET
Pipéracilline	PIP	Spectinomycine	SPT
Céfalexine	CEF	néomycine	NEO
Céfazoline	CZ		
Céfpriomo	CPO	Macrolides	
Céfoxitine	CX	Erythromycine	ERY
Céfotaxime	CTX	Azithromycine	AZM
Céfotétan	CTT	Clindamycine	CLI
Céftriaxone	CRO	Spiramycine	SPI
Céftazidime	CAZ		
Aztréonam	AT	Cyclines	
Imipénème	IPM	Tétracycline	TCY
Céfuroxime	CXM	Doxycycline	DOX
Pipéracilline + Tazobactame	TAZ		
Céftazidime + Acide clavulanique	CAZ+CLAV	Phénicolés	
Acide clavulanique	AC	Chloramphénicol	CHL
Imipénème + EDTA	IM+ED		
		Polypeptides	
		Colistine	COL
Quinolones		Glycopeptides	
Acide nalidixique	NAL	Vancomycine	VAN
Ofloxacin	OFX	Teicoplanine	TEC
ciprofloxacine	CIP		
		Autres	
Nitrofurantoines			
Furane	NIT	Acide fusidique	FUS
		Rifamycine	RIF
		fosfomycine	FOS

Liste des figures

Liste des figures

Figure 1 : La structure bactérienne.....	3
Figure 2 : Nomenclature algérienne des antibiotiques.....	4
Figure 3 : Mécanisme d'action des bêta-lactamines.....	5
Figure 4 : Mécanisme d'action des glycopeptides.....	5
Figure 5 : Mécanisme d'action de fosfomycine.....	6
Figure 6 : Mécanisme d'action de la Daptomycine.....	6
Figure 7 : Principales cibles des antibiotiques inhibant la synthèse des protéines.....	7
Figure 8 : Mécanisme d'action de l'acide fusidique.....	8
Figure 9 : Mécanisme d'action de la rifamycine, les sulfamides et triméthoprim.....	8
Figure 10 : Les paramètres PK/PD.....	10
Figure 11 : Représentation de la FSM avec ses limites inférieures et supérieures, à savoir, la CMI et la CPM.....	14
Figure 12 : Chronologie d'apparition des résistances au antibactériens.....	17
Figure 13 : Différents mécanismes de résistances bactériennes aux antibiotiques.....	20
Figure 14 : Le cycle de vie du biofilm.....	23
Figure 15 : Représentation de différents types de pompes à efflux chez les BGN et BGP.....	25
Figure 16 : Test de diffusion de disque sur la gélose et la droite de corrélation diamètre versus CMI.....	30
Figure 17 : Les concentrations critiques et les catégories cliniques d'antibiotique.....	31
Figure 18 : Détermination de la CMI. Haut : par macrodilution en milieu liquide. Bas : par microdilution.....	32
Figure 19 : Détermination de la concentration minimale bactéricide.....	32
Figure 20 : Tests phénotypiques de confirmation pour la production de BLSE.....	34
Figure 21 : Schéma simplifié pour la détection des bacilles à Gram négatif non sensibles aux carbapénèmes.....	35
Figure 22 : Test de Hodge modifié.....	36
Figure 23 : Algorithme de la détection des classes de carbapénémase.....	37
Figure 24 : Résultats de la méthode MIC.....	37
Figure 25 : Test de diffusion de disque de pénicilline.....	38
Figure 26 : Test de trèfle.....	39
Figure 27 : Test D montrant une résistance inductible à la clindamycine.....	41
Figure 28 : Exemples des automates de l'antibiogramme.....	43
Figure 29 : Le processus en trois étapes de la PCR.....	44
Figure 30 : Carba NP test.....	47
Figure 31 : Test bleu Carba.....	48
Figure 32 : Aperçu des tests-bandelettes développés contre la résistance aux β -lactamines..	49
Figure 33 : Procédure de détection des métabolites bêta-lactamases par spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	50
Figure 34 : Appareillage de routine.....	53
Figure 35 : Appareillage introduit.....	53
Figure 36 : Verreries utilisées.....	54

Liste des figures

Figure 37 : Les outils de laboratoire.....	54
Figure 38 : Milieux de culture	55
Figure 39 : Préparation de la gélose en boîte de pétri	56
Figure 40 : Différentes solutions d'antibiotiques préparées.....	58
Figure 41 : Test de diffusion de disque	62
Figure 42 : Test de diffusion de disque sur MH au sang frais.	63
Figure 43 : Détermination de la CMI par microdilution.	64
Figure 44 : Test de trèfle positif pour la souche <i>Staphylococcus aureus</i>	64
Figure 45 : Test de BLSE positif : apparition de l'image de synergie.....	65
Figure 46 : Test de disque combiné positif.	66
Figure 47 : Test de rapprochement positif.....	66
Figure 48 : Test à la cloxacilline	67
Figure 49 : Test de Hodge modifié.....	67
Figure 50 : Test de disque combiné.	68
Figure 51 : Test de disque combiné.	68
Figure 52 : Test « D » positif	69
Figure 53 : La répartition des prélèvements selon leur provenance.....	71
Figure 54 : La répartition des prélèvements selon leur nature et leur provenance.....	73
Figure 57 : Taux de positivité de prélèvements des patients externes.	75
Figure 55 : Taux de positivité de prélèvements de service pneumologie.	75
Figure 56 : Taux de positivité de prélèvements de service endocrinologie.	75
Figure 58 : La répartition de la population selon les souches bactériennes identifiées.	77
Figure 59 : Profil de sensibilité aux antibiotiques d' <i>E.coli</i> dans les prélèvements urinaires chez les patients hospitalisés.	80
Figure 60 : Profil de sensibilité aux antibiotiques d' <i>E.coli</i> dans les prélèvements urinaires des patients externes.	80
Figure 61 : Profil de sensibilité aux antibiotiques de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> chez les patients hospitalisés.....	81
Figure 62 : Profil de sensibilité aux antibiotiques de <i>Staphylococcus aureus</i> chez les patients hospitaliers	82
Figure 63 : Profil de sensibilité aux antibiotiques de <i>Staphylococcus aureus</i> chez les patients externes	82
Figure 64 : Exemples des tests complémentaires d' <i>E.coli</i>	84

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 1 : Avantages et limites des différentes techniques.	33
Tableau 2 : La capacité litières de différents services de l'hôpital.	52
Tableau 3 : Les étapes de préparation de gélose MH contenant de la cloxacilline	57
Tableau 4 : Concentrations des antibiotiques préparés.	57
Tableau 5 : La répartition des prélèvements reçus au laboratoire selon leur nature	70
Tableau 6 : La répartition des prélèvements selon leur provenance	71
Tableau 7 : Tableau récapitulatif de la demande en analyses microbiologiques selon la provenance.	72
Tableau 8 : La répartition de prélèvements selon le sexe et l'âge des patients.....	73
Tableau 9 : Récapitulatif des positivités par prélèvements selon la provenance.	74
Tableau 10 : Différentes souches bactériennes identifiées.	76
Tableau 11 : La répartition de la population selon les souches bactériennes identifiées.....	77
Tableau 12 : Répartition des bactéries identifiées selon le type de prélèvement.....	78
Tableau 14 : Répartition des bactéries identifiées selon leur provenance.	79

Liste des annexes

Liste des annexes

Annexe 1 : Classification des bêta-lactamases.	89
Annexe 2 : Classification des systèmes de transporteurs et leurs fonctions.....	89
Annexe 3 : Technique suivie dans la méthode d'inhibition de carbapénème « MIC ».....	90
Annexe 4 : Autres méthodes de détection de bêta-lactamases	91
Annexe 5 : Signes indicateurs pour la détermination des CMI de vancomycine chez staphylocoques :	92
Annexe 6 : Méthode de dépistage et de confirmation de sensibilité diminuée aux glycopeptide chez staphylococcus spp.....	92
Annexe 7 : Valeurs limites des diamètres des zones d'inhibition pour les souches de référence utilisées pour le contrôle de qualité.....	94
Annexe 8 : Liste d'antibiotiques à tester pour chaque bactérie :	95
Annexe 9 : Détermination de CMI par dilution en milieu liquide.....	96
Annexe 10 : Mode opératoire de test de Tréfle	96
Annexe 11 : Technique de test de Hodge modifiée.....	97
Annexe 12 : Résultats détaillés des tests complémentaires.....	98

Introduction

Introduction

L'avènement des antibiotiques au 20^{ème} siècle était comme un miracle qui a donné naissance à une nouvelle ère de la médecine. L'antibiothérapie a constitué à partir de 1941 une véritable révolution où les maladies infectieuses furent considérées comme définitivement vaincues. La pneumonie, la tuberculose, la pyélonéphrite, la septicémie, l'endocardite, la méningite bactérienne et tant d'autres font plus peur et sont désormais, non seulement, plus mortelles, mais aussi guérissables.

Cet âge d'or, malheureusement, a tenu à peine un demi-siècle, et voilà que la résistance aux antibiotiques fait surface. Bien que son émergence ait été observée dès le début, mais elle n'a pas cessé de prendre de l'ampleur, au point qu'elle devienne une menace et risque; selon l'OMS, de placer les médecins dans des situations d'impasse thérapeutique, et mettre en jeu le pronostic vital du patient surtout que l'innovation permanente de nouvelles molécules qu'on pensait être la solution et la voir se poursuivre sans fin, qui s'est arrêtée.

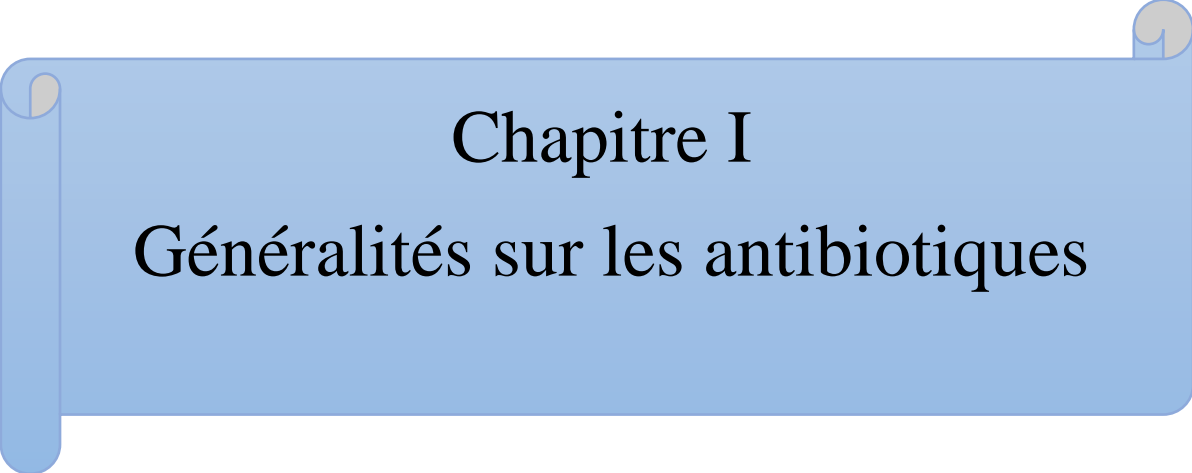
Ainsi, éviter que l'ère pré-antibiotique ne soit de retour, est un défi actuel majeur pour les acteurs d'antibiothérapie dont le laboratoire de microbiologie. [1, 2]

Et vu l'impact des résultats fournis qui pourront faire toute la différence dans la conduite thérapeutique adoptée, une paillasse dédiée exclusivement à l'antibiogramme dans un laboratoire de microbiologie est jugée nécessaire.

Dans cette optique, ce travail vient marquer sa contribution et a pour objectifs :

- L'installation de la paillasse d'antibiogramme au niveau du laboratoire de microbiologie de Belloua avec introduction des CMI et des tests complémentaires de sensibilité aux antibiotiques selon les recommandations de l'AARN.
- Introduction du contrôle qualité de l'antibiogramme, du matériel et techniques utilisés.
- Création et application de techniques pratiques améliorant la qualité du le travail.
- Améliorer la prestation du service en améliorant les résultats rendus et en augmentant la collaboration clinicien-microbiologiste.
- Participer à notre échelle à l'amélioration de l'usage des antibiotiques en fournissant des résultats complets et fiables.

Partie théorique

A blue horizontal scroll graphic with rounded ends and a vertical strip on the left side, resembling a rolled-up document. The text is centered on the scroll.

Chapitre I

Généralités sur les antibiotiques



1 Définition d'un antibactérien

La définition d'un « antibactérien » communément confondu avec « antibiotique » a connu de successives évolutions depuis celle proposée par Waksman, et demeure jusqu'à présent difficile de répondre avec exactitude sur ce que c'est un antibiotique. Cependant, une définition générale regroupe le fait que : [3]

Etymologiquement : dérive du grec « anti » : contre ; « biôtikos » : qui concerne la vie. Donc c'est contre la vie. [4]

Un antibactérien : est une substance chimique organique d'origine : [5]

- Naturelle : produite par des micro-organismes (champignons et bactéries). Exemples : pénicilline, streptomycine ;
- Semi-synthétique : par modification chimique des molécules naturelles dans un but d'améliorer et d'optimiser leurs activités. Exemples : Cephème, Amikacine, Nétilmicine ;
- Synthétique : synthèse purement chimique. Exemples : Quinolones.

Utilisée essentiellement dans le traitement des maladies infectieuses bactériennes. Ayant la capacité à des faibles concentrations d'inhiber la croissance des bactéries (antibactérien bactériostatique) ou de tuer ces derniers (antibactérien bactéricide).

L'activité des antibactériens est caractérisée par une sélectivité différentielle (Certaines bactéries sont sensibles à l'antibactérien tandis que d'autres le sont de façon limitée soit naturellement ou de manière acquise), donnant lieu aux antibactériens à spectre étroit et antibactériens à large spectre et d'une toxicité différentielle (basée sur la neutralisation de l'agent bactérien avec peu ou pas d'effets nocifs sur l'hôte).[6, 7]



2 Rappel sur la structure bactérienne[8]

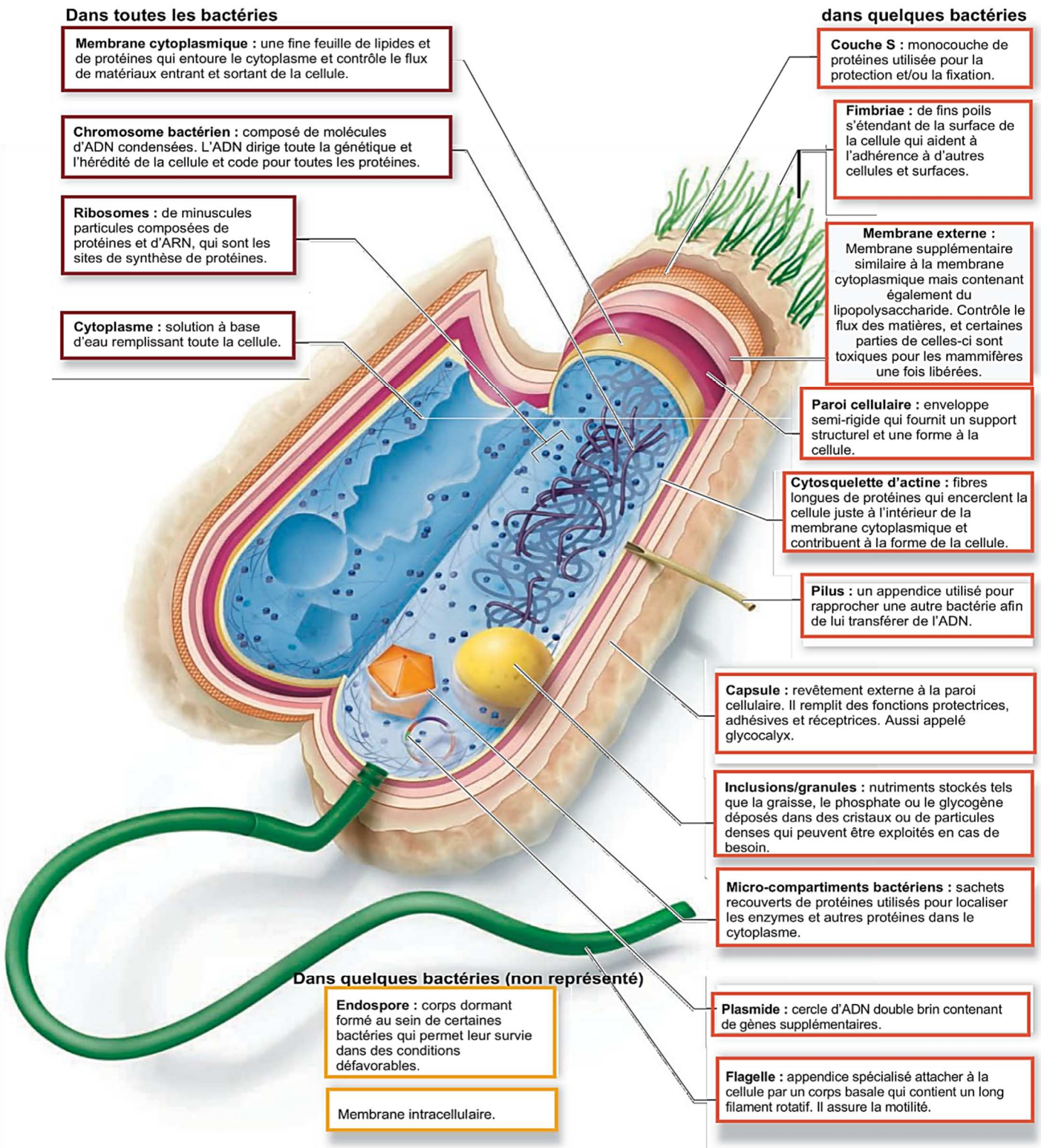


Figure 1 : La structure bactérienne.



3 Classification des antibactériens

Critères de classification [9]

La classification peut se faire selon :

- **L'origine** : naturelle, semi-synthétique ou synthétique.
- **La cible** : paroi, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines, synthèse des acides nucléiques.
- **Spectre d'activité** : liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large).
- **La nature chimique** : très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle β -lactame).

La nomenclature algérienne des antibiotiques

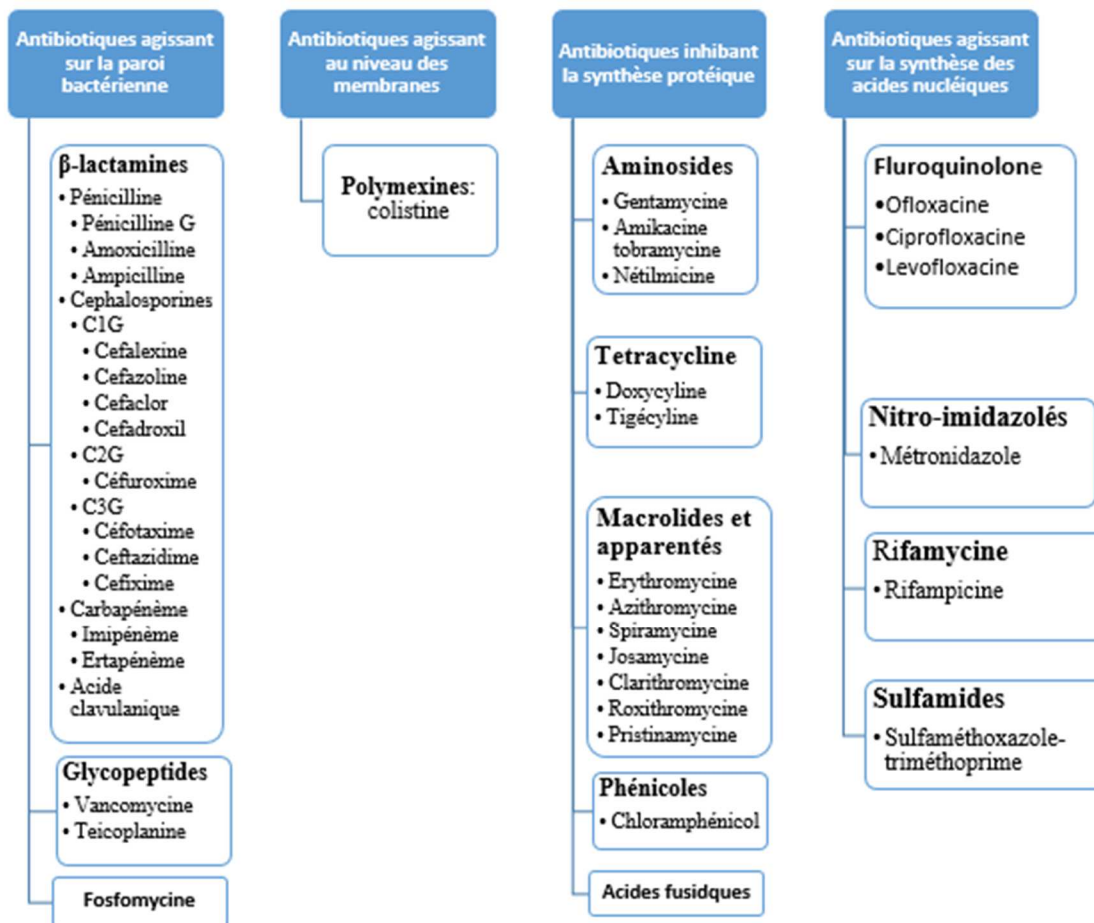


Figure 2 : Nomenclature algérienne des antibiotiques. [10]



4 Mode d'action des antibiotiques

4.1 Antibiotiques agissant sur la paroi bactérienne

4.1.1 Bêta-lactamines

Elles bloquent l'étape finale de synthèse du peptidoglycane par inhibition de certaines enzymes responsables de la transpeptidation : PLP. [9]

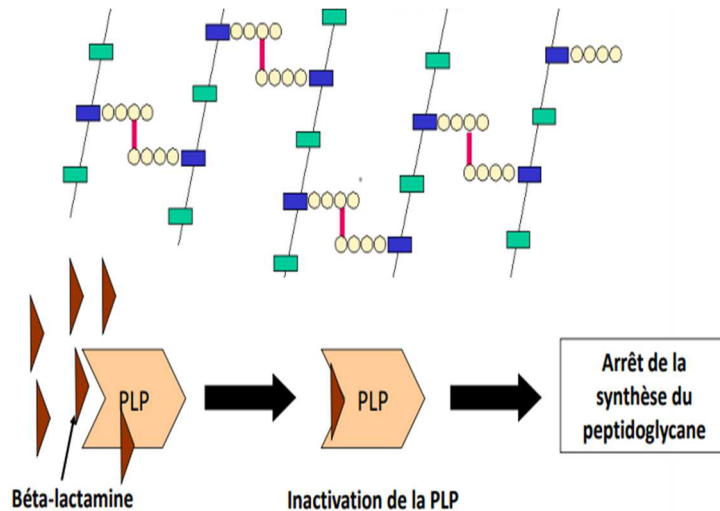


Figure 3 : Mécanisme d'action des bêta-lactamines. [11]

4.1.2 Glycopeptides

Ils inhibent la synthèse de la paroi des bactéries Gram positif en se fixant à l'extrémité D-alanyl-D-alanine du pentapeptide de base du peptidoglycane. Par encombrement stérique, les glycopeptides vont empêcher l'action des PLP, bloquant ainsi l'élongation du peptidoglycane. [12]

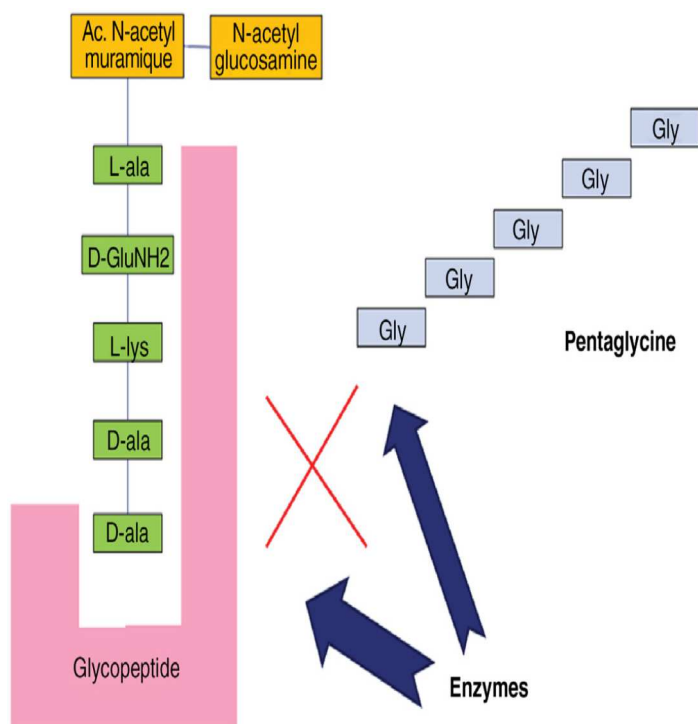


Figure 4 : Mécanisme d'action des glycopeptides. [12]



4.1.3 Fosfomycine

Elle inhibe l'énoltransférase pyruvate, enzyme indispensable à la biosynthèse d'un précurseur de l'acide N-acétylmuramique, motif de base du peptidoglycane de la paroi bactérienne.[12]

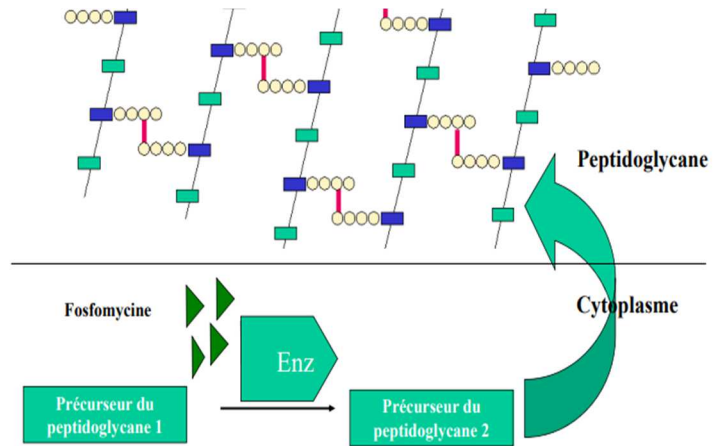


Figure 5 : Mécanisme d'action de fosfomycine. [11]

4.2 Antibiotiques agissant au niveau des membranes

4.2.1 Polymexines

Ils agissent par fixation sur le lipide A des lipopolysaccharide (LPS), provoquant le déplacement de cations divalents par formation de pores et donc altération de la membrane. [12]

4.2.2 Lipopeptides cycliques : Daptomycine

Etape 1 : la formation de complexe la daptomycine-calcium

Etape 2 : interaction entre la charge positive de complexe et la charge négative de la membrane cellulaire.

Etape 3 : l'interaction entre la daptomycine et phosphoglycopéptides aboutit à l'oligomérisation de la daptomycine au niveau de membrane cellulaire

Etape 4 : Les oligomères de la daptomycine se déplacent vers le foliole interne du CM produisant une structure en forme de pore qui entraîne la mort des cellules bactériennes

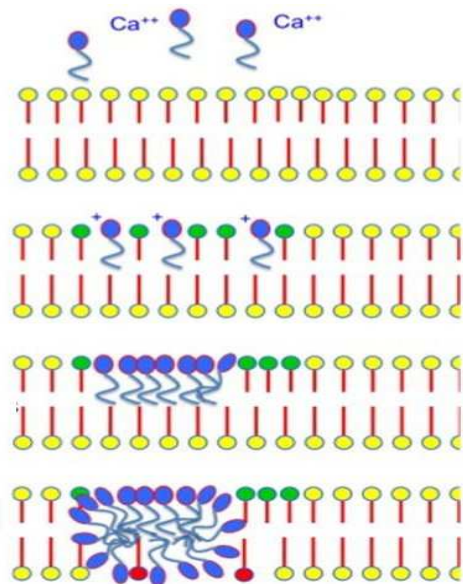


Figure 6 : Mécanisme d'action de la Daptomycine. [13]



4.3 Antibiotiques agissant sur la synthèse protéique

4.3.1 Aminosides

Agissent par fixation sur l'ARN 16S, au niveau de la sous-unité 30S du ribosome bactérien, entraînant un changement morphologique de l'ensemble du ribosome et une altération de toutes les étapes de la synthèse des protéines.[9]

4.3.2 Tétracyclines

Elles se fixent sur l'ARN 16S de la sous-unité 30S du ribosome bactérien. Par encombrement stérique, elles empêchent ainsi la liaison de l'aminocyl-ARNt sur le complexe ARNm-ribosome.[9]

4.3.3 Macrolides :

Les macrolides se fixent sur la sous-unité 50S de l'ARN 23S des ribosomes bactériens. Ils empêchent ainsi le transfert du complexe peptidyl-ARNt depuis le site P vers le site A, ce qui entraîne une inhibition de l'élongation de la chaîne peptidique.[9]

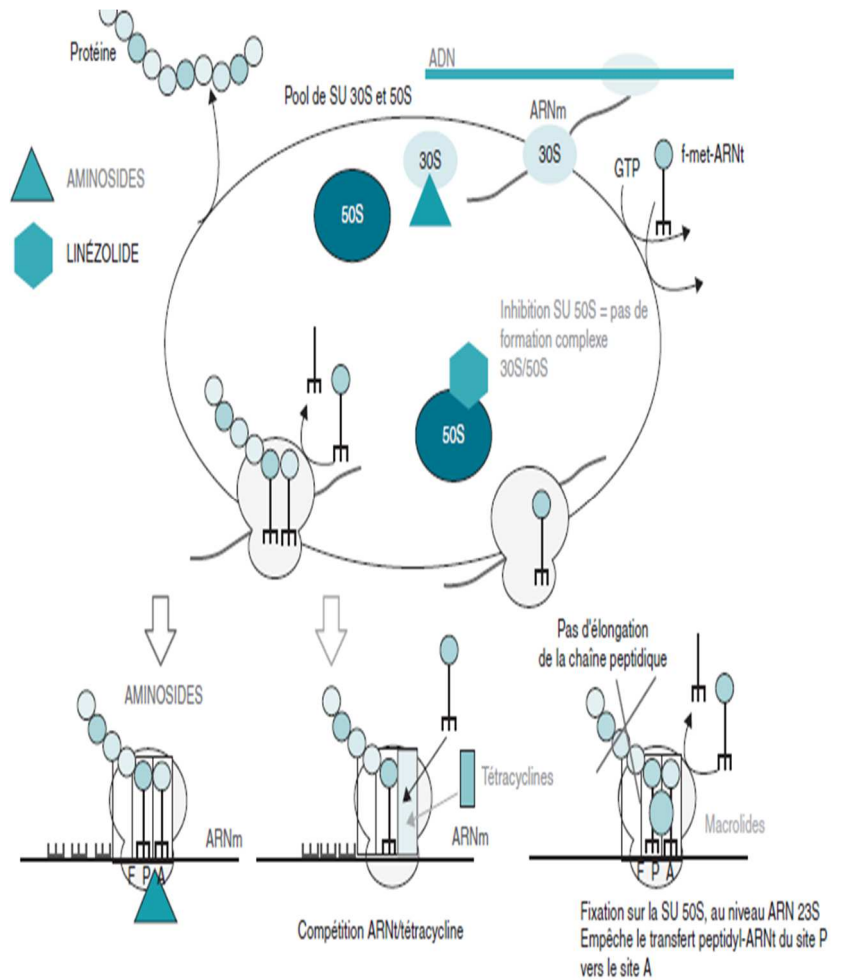


Figure 7 : Principales cibles des antibiotiques inhibant la synthèse des protéines. [9]

4.3.4 Phénicolés

Ils se fixent à la sous-unité 50S des ribosomes bactériens. Ils inhibent la synthèse des protéines en empêchant la liaison du complexe amino-acyl-ARNt à son site de fixation, et par conséquent la réaction de transpeptidation. [9]



4.3.5 Acide fusidique

Agit en inhibant la synthèse protéique par fixation au facteur d'élongation (EF-G) qui est responsable de la translocation de la chaîne des peptides. [12]

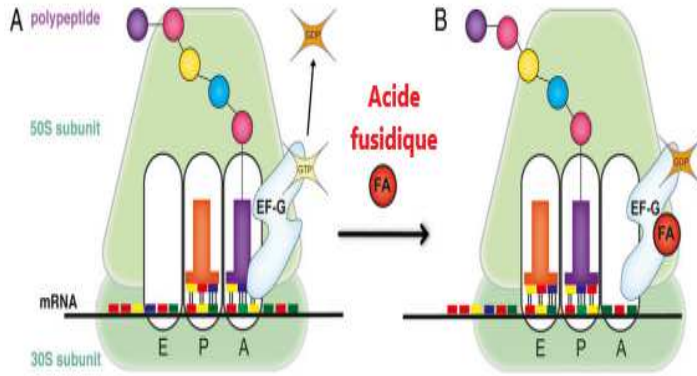


Figure 8 : Mécanisme d'action de l'acide fusidique [14]

4.4 Antibiotiques agissant sur la synthèse des acides nucléiques

4.4.1 Quinolones

Elles inhibent la transcription et la réplication de l'ADN par formation d'un complexe ADN-gyrase-quinolone indissociable, entraînant la mort rapide de la bactérie. [9]

4.4.2 Rifamycine

La rifampicine bloque la synthèse de l'ARN par inhibition de la sous-unité β de l'ARN polymérase bactérienne ADN-dépendante, enzyme responsable de la transcription. [12]

4.4.3 Sulfamides et Triméthoprime

Les sulfamides tant qu'analogues de l'acide para-aminobenzoïque inhibent de façon compétitive la dihydroptéroate synthétase, enzyme catalysant la première étape de la synthèse des folates. [12]

Le triméthoprime est un inhibiteur compétitif de la dihydrofolate réductase, enzyme catalysant la réduction du dihydrofolate en tétrahydrofolate. [12]

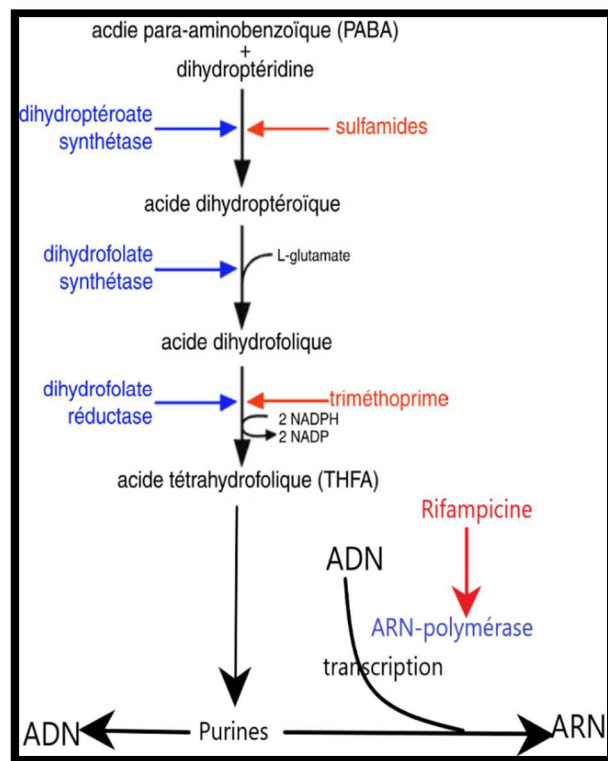


Figure 9 : Mécanisme d'action de la rifamycine, les sulfamides et triméthoprime. [12]

4.4.4 Nitro-imidazolés

Ils entraînent la fragmentation de l'ADN, par un mécanisme encore mal connu aboutissant à la mort de la bactérie. [9]



5 Généralités sur la notion pharmacocinétique/pharmacodynamie des antibactériens

5.1 Pharmacocinétique

La pharmacocinétique des antibiotiques suit les étapes habituelles d'absorption, distribution, métabolisme et élimination, mais présente quelques spécificités.

5.1.1 Absorption

Les antibiotiques ont une biodisponibilité variable selon la voie d'administration. Des molécules comme les fluoroquinolones et le groupe MLS ont une excellente biodisponibilité par voie orale, alors que les glycopeptides et les aminosides ont une biodisponibilité nulle, et donc une absorption 100% parentérale. [9]

5.1.2 Distribution

Certains sites sont difficilement accessibles aux antibiotiques comme le LCR, l'os, l'œil et la prostate. Des antibiotiques comme les fluoroquinolones et le groupe MLS sont capables d'y diffuser. Dans certaines circonstances comme la méningite, l'inflammation de la barrière hémato-méningée favorise la pénétration de certaines molécules comme les β -lactamines. [9, 15]

5.1.3 Métabolisme

Les antibiotiques peuvent être transformés par différentes réactions biochimiques aboutissant à leur inactivation totale, exemple linézolide, ou partielle, exemple claritromycine et acide fusidique. Parfois, ces molécules restent inchangées, exemple de vancomycine et aminosides. [12]

5.1.4 Élimination

Se fait par deux voies, soit urinaire comme pour les pénicillines, glycopeptides; soit biliaire comme pour les macrolides, lincosamides et rifampicine ; Soit élimination mixte exemple tétracycline. [7]

5.2 Pharmacodynamie

La pharmacodynamie étudie l'activité antimicrobienne des concentrations locales d'antibiotiques sur l'agent pathogène cible et la réponse de l'agent pathogène, dont la résistance. [16]



5.3 Paramètres PK/PD

Ces sont des paramètres prédictifs de l'efficacité bactério-clinique des antibiotiques et/ou de leur capacité à prévenir l'émergence de résistance, à condition impérative qu'ils atteignent certaines valeurs seuils. Parmi ces paramètres nous avons : [16]

5.3.1 Concentration minimale inhibitrice « CMI »

C'est la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle aucune croissance bactérienne n'est visible après 18 heures d'incubation à 35°C. C'est une valeur indicatrice de sensibilité bactérienne. [4, 9] On distingue :

- La CMI 50 : La plus faible concentration d'antimicrobien qui inhibe la croissance de 50% des souches d'une espèce bactérienne particulière, marqueur de la résistance naturelle de l'espèce à un antimicrobien. [17]
- La CMI 90 : La plus faible concentration d'antimicrobien qui inhibe la croissance de 90% des souches d'une espèce bactérienne particulière, marqueur de la résistance acquise de l'espèce à un antimicrobien. [17]

5.3.2 Concentration minimale bactéricide « CMB »

Il s'agit de la concentration minimale d'antibiotique qui élimine 99,99 % des bactéries d'un inoculum standardisé à 10^5-10^6 bactéries/ml, après 18 heures d'incubation à 35 °C. C'est une valeur indicatrice de puissance de l'antibiotique. [4, 9]

5.3.3 Pic sérique « C_{max} »

C'est la concentration maximale d'antibiotique dans le sérum. [7]

5.3.4 Surface sous la courbe ou l'aire sous la courbe « AUC »

Permet de déterminer la quantité totale d'antibiotique auquel est exposé l'organisme ; calculée sur 24H sur CMI. [7, 16]

5.3.5 Temps d'exposition « t > CMI »

C'est la durée pendant laquelle la concentration d'antibiotique reste supérieure à sa CMI (t > CMI) dans l'intervalle séparant deux administrations. [16]

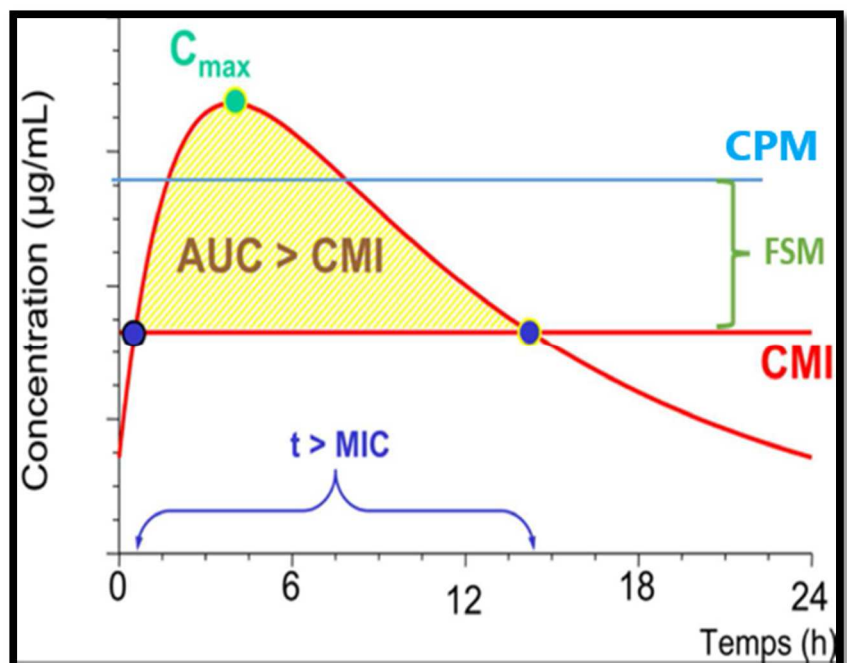


Figure 10 : Les paramètres PK/PD. [18]



5.3.6 Concentration préventive de l'apparition des mutations « CPM »

Il s'agit de l'équivalente à la CMI de la sous population spontanément résistante à partir d'un fort inoculum bactérien à un antibiotique donné. Il est impossible pour l'instant de déterminer la CPM en routine de façon aisée et rapide. Il s'avère cependant que, d'une façon générale, la CPM est de l'ordre de 5 à 10 fois la CMI.[16, 19]

5.3.7 Fenêtre de sélection de mutants « FSM »

C'est un paramètre dérivé de CPM. Elle représente un espace dans lequel la pression de sélection s'exerce le plus fortement, c'est à dire permet de tuer la population sensible mais favorise la survie des bactéries résistantes à l'antibiotique utilisé. [16, 20]

5.4 La classification des antibiotiques en fonctions des paramètres PK/PD

5.4.1 Antibiotiques à effet bactériostatique

C'est l'arrêt de la croissance bactérienne, il facilite seulement la destruction des germes par la défense de l'hôte. Le rapport CMB/CMI est compris entre 4 et 16. Exemples : Tétracyclines et macrolides.[7, 9]

5.4.2 Antibiotiques à effet bactéricide

Entraine la mort des bactéries. Le rapport CMB/CMI<2. Exemple : Bêta-lactamines et aminosides. Cette bactéricidie peut être :[9]

- **Concentration dépendante** : l'effet antibiotique est proportionnel à la dose administrée et à la quantité totale à laquelle l'organisme est exposé. Les critères de l'efficacité sont les rapports C_{max}/CMI et AUC/CMI . Exemple : imipénème. [7, 12]
- **Temps dépendante** : l'activité est proportionnelle au temps d'exposition du germe à l'antibiotique. Exemple céphalosporines et glycopeptides. [12]

Remarque : l'effet bactéricide temps ou concentration dépendant est variable non seulement en fonction de l'antibiotique mais aussi en fonction de la bactérie c'est l'exemple des fluoroquinolones qui ont une activité bactéricide concentration dépendante pour BGN et une activité bactéricide temps dépendante pour les bactéries Gram positives. [9]

5.4.3 Antibiotiques à effet post-antibiotique « EPA »

Il s'agit de la suppression persistante de la croissance bactérienne après une exposition à un antibiotique de concentration inférieure à la CMI. Exemples : carbapénème et aminoside. Ça s'explique par un arrêt prolongé des processus métaboliques bactériens par les taux résiduels d'antibiotiques, sans qu'ils soient létaux pour la bactérie. [12, 21, 22]



5.4.4 Antibiotiques à Effet inoculum

Il s'agit de l'influence de la quantité de bactéries sur l'antibiotique. Il peut décroître l'efficacité de certains antibiotiques. Quand ce nombre est élevé ($> 10^8$ cfu/ml, cas des collections suppurées par exemple), on observe une élévation franche des CMI des bêta-lactamines et des glycopeptides. En revanche, les aminosides et fluoroquinolones sont généralement peu influencés par l'effet inoculum. [7, 9]

5.5 Relation PK/PD et le mode d'administration des antibiotiques

Ces relations PK/PD permettent de définir les schémas d'administration optimaux, ainsi : [12]

- Les molécules dont l'efficacité est corrélée au rapport C_{max}/CMI seront préférentiellement administrées en perfusion courte afin de maximiser le C_{max} ;
- Les molécules dont l'efficacité est corrélée au rapport AUC/CMI seront administrées en doses espacées.
- Les molécules temps dépendants seront administrées en doses unitaires plus faibles, dont le rapprochement est dépendant de la demi-vie d'élimination de la molécule. Elles pourront également être administrées en perfusions prolongées voire continues.

5.6 Relations PK/PD et le suivi thérapeutique des antibiotiques

Pour qu'une antibiothérapie soit efficace, il faut que la concentration en antibiotique au site de l'infection soit suffisante et efficace, et ce d'autant plus dans les infections sévères ou la concentration en antibiotique in situ doit être supérieure à la CMI. Par ailleurs, il est aussi nécessaire d'être vigilant vis-à-vis du risque de toxicité des antibiotiques en dosant les antibiotiques au niveau sérique.[19]

Ce suivi est justifié pour trois raisons :

- Optimisation de la tolérance aux antibiotiques.
- Optimisation du traitement des infections bactériennes.
- Prévention de l'émergence de résistances.

5.6.1 Le suivi thérapeutique des bêta-lactamines

se fait par : [19]

- Dosage des résiduelles lors d'administration discontinues (même perfusion courte), ou dosage au plateau en perfusion continue de 24 heures
- Objectif : 8 CMI, ou 8 fois concentrations critiques inférieures.



5.6.2 Le suivi thérapeutique des aminosides

se fait par : [19]

- Dosage au pic sérique, si possible dès la première administration : évaluation de l'efficacité
- Dosage en résiduelle : dans les situations à risque (insuffisance rénale, co-administration de substances néphrotoxiques, etc.), au-delà de 5 jours de traitement.

5.6.3 Le suivi thérapeutique des fluoroquinolones

L'efficacité des fluoroquinolones est liée à l'obtention d'un rapport AUC/CMI égale au moins à 30 pour les bactéries à Gram positif, en particulier pour le pneumocoque, et des valeurs de l'ordre de 125-250 pour les bactéries à Gram négatif. L'obtention d'un rapport $C_{max}/CMI > 10$ est également prédictive de l'efficacité bactériologique vis-à-vis de *P. aeruginosa*. [16]

5.6.4 Le suivi thérapeutique des glycopeptides [19]

- Inutile sur les phénotypes sauvages.
- Se fait dans les infections sévères, ou à staphylocoques à CMI élevées, ou hémodynamique perturbée, ou brûlés, ou polytraumatisés, ou mucoviscidose ; endocardites, infections ostéoarticulaires.
- Dosage des résiduelles lors d'administrations discontinues (même perfusion courte), ou dosage au plateau en perfusion continue de 24 heures.
- Objectif : 8 CMI, ou 8 fois concentrations critiques inférieures.

5.7 Relations PK/PD et émergence de résistances

Plusieurs situations sont à distinguer : [16]

- Une infection par un micro-organisme d'emblée résistant.
- Une infection par une population microbienne sensible, mais dont l'inoculum élevé, associé à la probabilité de mutations spontanées, a permis l'apparition de mutants résistants au traitement.
- Une infection par une population microbienne sensible, mais dont certains éléments ont acquis des mutations de résistance par transfert génétique à partir de micro-organismes déjà présents dans l'organisme.

Dans ces deux derniers cas, la concentration de l'antibiotique administré peut favoriser la sélection des mutants résistants. Il est dit que l'antibiotique exerce une pression de sélection.



Ces mutants sont caractérisés par la CPM. Le maintien de concentration d'antibiotique à l'intérieure de la FSM favorise la survie des bactéries résistantes à l'antibiotique utilisé, alors que le maintien des concentrations au-delà de la CPM tout au long du traitement, permet une réduction importante de l'acquisition de bactéries mutantes résistantes en empêchant leur amplification. [4, 20]

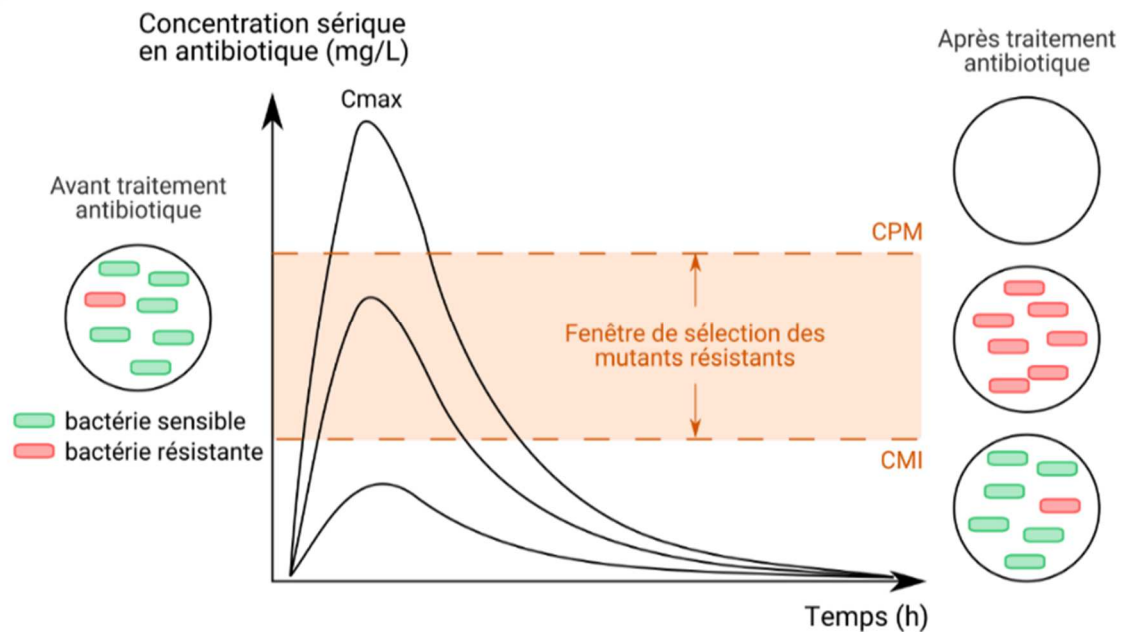
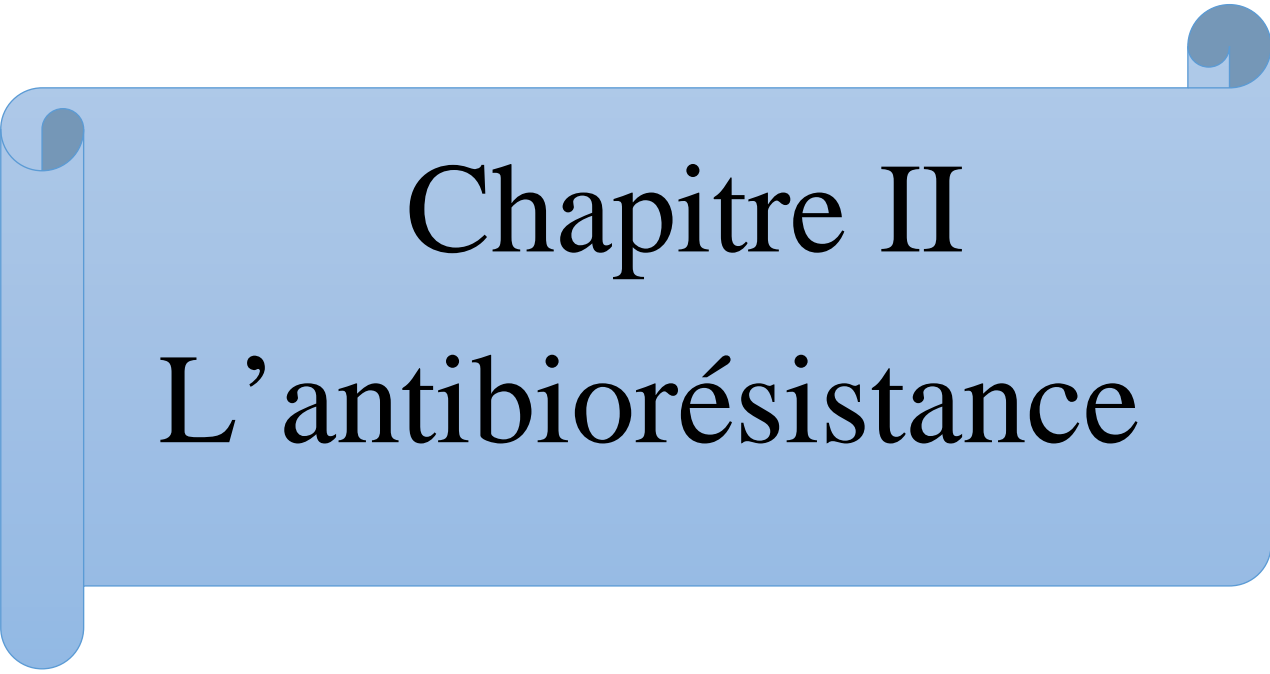


Figure 11 : Représentation de la FSM avec ses limites inférieures et supérieures, à savoir, la CMI et la CPM. [23]

A blue scroll graphic with rounded corners and a vertical strip on the left side, resembling a rolled-up document. The text is centered on the scroll.

Chapitre II

L'antibiorésistance



1 Définitions

La définition de résistance aux antimicrobiens est basée sur différents critères génétiques, microbiologiques et cliniques.[4]

Selon la définition microbiologique du terme, une souche est dite résistante lorsqu'elle se cultive en présence de concentration plus élevée en antibiotique comparativement à d'autres souches qui lui sont phylogénétiquement liées. Par conséquent, la résistance est une propriété qui ne peut être étudiée que par comparaison d'au moins deux souches, dont l'une de référence souvent appelée souche sauvage, cultivées dans les mêmes conditions.[4]

Selon la définition clinique, une souche est qualifiée de résistante lorsqu'elle survit à la thérapie antibiotique mise en place. En outre, il est important de signaler, qu'en conditions *in vivo*, la capacité de résistance ou de sensibilité de la souche à la thérapie antimicrobienne mise en place sera dépendante de différents paramètres, tels que la localisation de la bactérie, le dosage et le mode d'administration de l'antibiotique, et l'état du système immunitaire de l'individu traité.[4]

La résistance génétique peut être définie comme un changement dans le patrimoine génétique du micro-organisme, codant ainsi un gène altéré.[24]

1.1 La résistance naturelle

Les gènes de résistance font partie du patrimoine génétique de la bactérie. La résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce. Ce type de résistance est détecté dès les premières études réalisées sur l'antibiotique afin de déterminer son activité et contribue à définir son spectre antibactérien. Cette résistance peut être due à l'inaccessibilité de la cible pour l'antibiotique, à une faible affinité de la cible pour l'antibiotique ou encore à l'absence de la cible. La résistance bactérienne naturelle est permanente et stable. Elle est d'origine chromosomique, transmise à la descendance (transmission verticale) lors de la division cellulaire, mais elle n'est généralement pas transférable d'une bactérie à l'autre (transmission horizontale).[25]

Exemples de résistance naturelle [15, 26]

1/ Les entérobactéries : elles peuvent présenter des résistances naturelles aux β -lactamines classées de ce fait en plusieurs groupes :

- Entérobactéries du groupe II : (ex : *Klebsiella spp*) : possèdent une pénicillinase chromosomique ; résistantes naturellement à l'amoxicilline, mais sensibles à



l'amoxicilline-acide clavulanique (acide clavulanique = anti-pénicillinase) et aux céphalosporines (en l'absence de résistance acquise).

- Entérobactéries du groupe III : (ex : *Enterobacter*, *Morganella*, *Serratia*, *Providencia*) : possèdent une céphalosporinase chromosomique ; résistantes aux céphalosporines de 1^{ère} et 2^{ème} génération, mais sensibles aux C3G; résistantes également à l'amoxicilline avec ou sans acide clavulanique.

2/ Les bactéries anaérobies sont naturellement résistantes aux aminosides car le passage des aminosides à travers la membrane cytoplasmique nécessite un système de transport actif absent chez les anaérobies.

3/ Les mycoplasmes, bactéries dépourvues de parois présentent une résistance naturelle aux β -lactamines, puisque le mode d'action de cette famille d'antibiotique consiste à inhiber la synthèse du peptidoglycane.

1.2 La résistance acquise

C'est un caractère qui apparaît chez certaines souches au sein d'une espèce normalement sensible à cet antibiotique. C'est l'acquisition d'un facteur génétique qui se traduit par une réduction de la sensibilité à la molécule qui lui était fatale. Elle peut donc se faire soit par mutation chromosomique soit par acquisition des gènes transférés d'un autre micro-organisme (transmission verticale et horizontale).

Support génétique : le chromosome bactérien ainsi que les éléments extra chromosomique mobiles tels que les plasmides[27]

1.3 La multi-résistance

La multi-résistance aux antibiotiques caractérise les bactéries qui présentent une résistance, à au moins 3 classes d'antibiotiques ou bien résistantes à un agent antimicrobien clé souvent associée à une résistance croisée ou une co-résistance à plusieurs classes d'antimicrobiens, ce qui les rend multi-résistantes, exemple la résistance à la méthicilline chez *S.aureus* «SARM». [28]

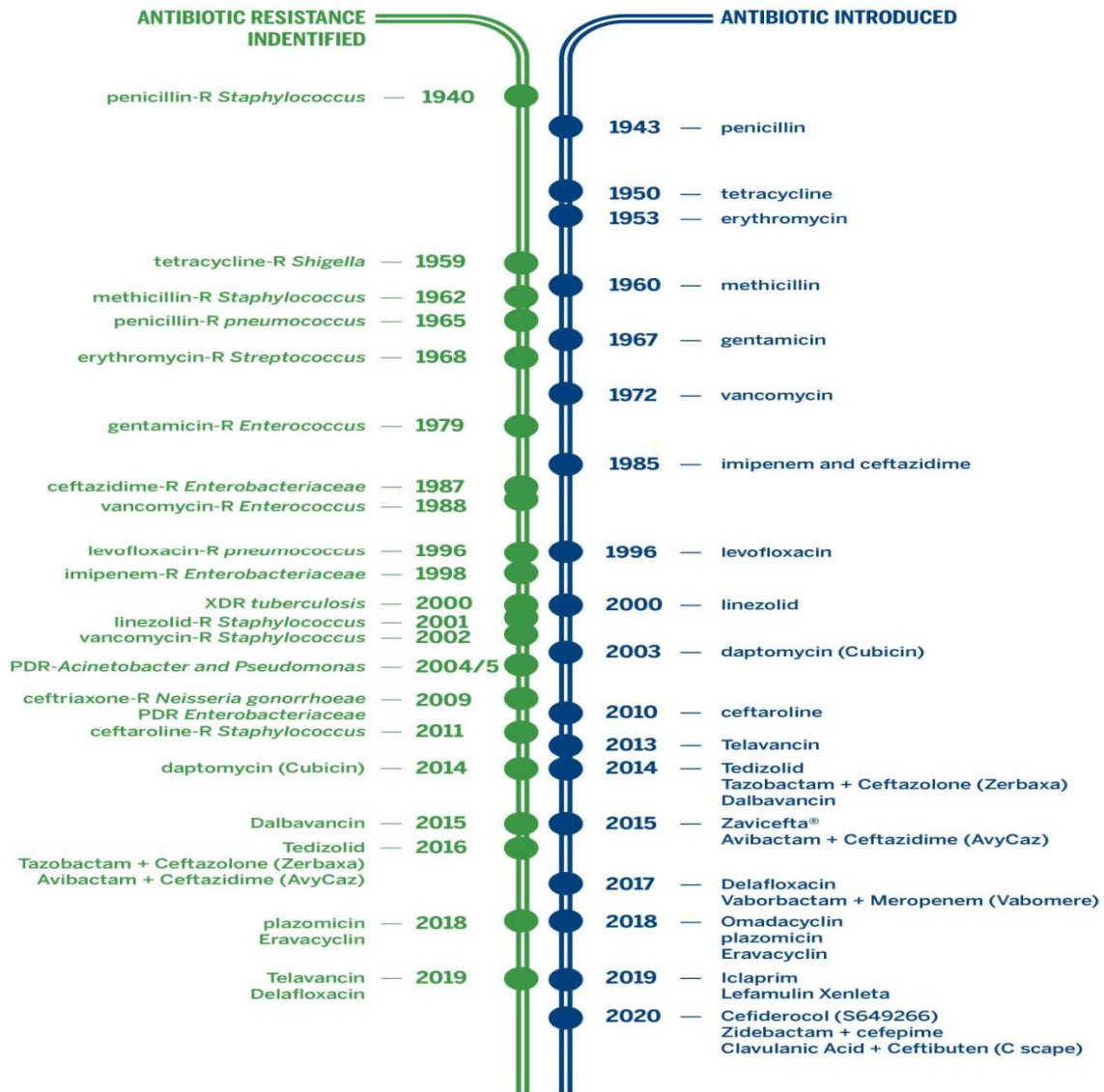


Figure 12 : Chronologie d'apparition des résistances au antibactériens. [29]

2 Support génétique de la résistance

2.1 La résistance chromosomique

Elle résulte d'une mutation spontanée. C'est un phénomène rare, dû au hasard. Il n'est pas provoqué par la présence de l'antibiotique. Mais l'antibiotique révèle la mutation de résistance en sélectionnant les bactéries mutantes résistantes (ou plus exactement, en détruisant les autres bactéries de l'espèce, celles restées sensibles à l'action de l'antibiotique). C'est un phénomène indépendant : l'apparition d'une mutation ne favorise pas l'apparition d'autres mutations de résistance à d'autres antibiotiques. La probabilité de deux mutations simultanées est donc très faible.



Cette indépendance des mutations constitue un des meilleurs arguments pour justifier l'association des antibiotiques. Elle est transmissible et permanente, et a donc un caractère héréditaire (transmission sur un mode vertical de bactérie mère à bactérie fille).

Une mutation n'affecte qu'un caractère, et la résistance ne concerne généralement qu'un antibiotique ou qu'une famille d'antibiotiques ayant le même mécanisme d'action.

Toutes les mutations ont pour conséquence la perte ou la modification d'une protéine structurale ou enzymatique.[26]

2.2 La résistance extra chromosomique

Une autre façon par laquelle les bactéries peuvent développer une résistance aux antibiotiques est l'acquisition d'un gène de résistance exogène de l'environnement ou d'une autre bactérie dans un processus appelé transfert horizontal de gènes (HGT). [30]

C'est le type de résistance le plus fréquent, contagieux et peut concerner plusieurs antibiotiques, voire plusieurs familles d'antibiotiques, entraînant des multi-résistances.

HGT est le transfert non généalogique de matériel génétique entre des organismes apparentés et non apparentés sans en être le descendant (sans nécessité de division cellulaire).[31]

Les éléments échangés sont des éléments génétiques mobiles : des plasmides (les plus fréquents), des transposons et des intégrons... via des mécanismes de transfert, dont les principaux sont : la conjugaison, la transformation, la transduction.

Pour qu'un gène acquis confère une résistance aux antibiotiques à la bactérie receveuse, il doit être incorporé dans le chromosome ou être transporté sur un plasmide afin qu'il puisse être de manière stable reproduit et exprimé.[30]

2.2.1 Eléments génétiques mobiles

2.2.1.1 Plasmides

Les plasmides sont des molécules d'ADN circulaires, double brin, extra-chromosomique, qui existent à l'état libre dans le cytoplasme des bactéries et certaines levures.[32]

2.2.1.1.1 Caractéristiques des plasmides bactériens

- Ils contiennent leur propre origine de réplication et peuvent se répliquer indépendamment du chromosome bactérien.[33]
- Ils ne sont pas essentiels à la survie de la bactérie (éléments facultatifs).[34]
- Ils peuvent être présents seuls ou en plusieurs.[32]
- Parfois, le plasmide peut intégrer l'ADN chromosomique de la bactérie.[35]



- les plasmides peuvent être perdus par la bactérie soit naturellement lors de la multiplication, soit par voie artificielle (traitement physico-chimique).[35]

2.2.1.1.2 Classification des plasmides [32, 35, 36]

Selon la capacité transmissible

- Plasmides conjugatifs ou plasmides autotransmissibles.
- Plasmides non conjugatifs ou plasmides non transmissibles.

Selon la fonction

Fertilité ou F-plasmide, plasmides de résistance ou R-plasmides, plasmides bactériocinogènes, plasmides de virulence et plasmides métaboliques.

Selon la compatibilité

Plasmides compatibles et plasmides incompatibles. Seulement les plasmides compatibles peuvent rester ensemble à l'intérieur d'une cellule. Les plasmides les plus abondants, souvent appelés plasmides épidémiques, sont IncF, IncI, IncA/ C et Inh.

2.2.1.2 Éléments Transposables

Ce sont des éléments mobiles d'ADN. Les transposons peuvent exister sur les plasmides, ou être intégrés dans le chromosome, et peuvent s'insérer également à des sites adjacents à d'autres transposons, flanquant des gènes de résistance et faisant des transposons composites plus grands. Ils peuvent être classés en transposons conjugatifs ou transposons non conjugatifs. [30]

2.2.1.3 Intégrons

Ils portent plusieurs gènes de résistance. Cette entité génétique n'a pas de mobilité mais peut être mobilisée si elle se fixe sur un plasmide ou un transposon. L'intégron peut donner de la mobilité aux gènes de résistance qu'il héberge sous forme de cassettes mobiles. [37]

Les intégrons se composent de trois composants : un gène d'intégrase, qui code pour une enzyme catalysant l'incorporation et l'excision de cassettes génétiques, un site d'attachement pour faciliter la recombinaison, et un promoteur qui permet l'expression de gènes incorporés. [30]

2.2.1.4 Bactériophages

Les bactériophages sont des virus bactériens avec un ADN ou ARN comme génome. Ils peuvent agir comme vecteur dans le transfert génétique (y compris transfert de résistance) par le mécanisme de transduction.[38, 39]



3 Mécanismes biochimiques de la résistance

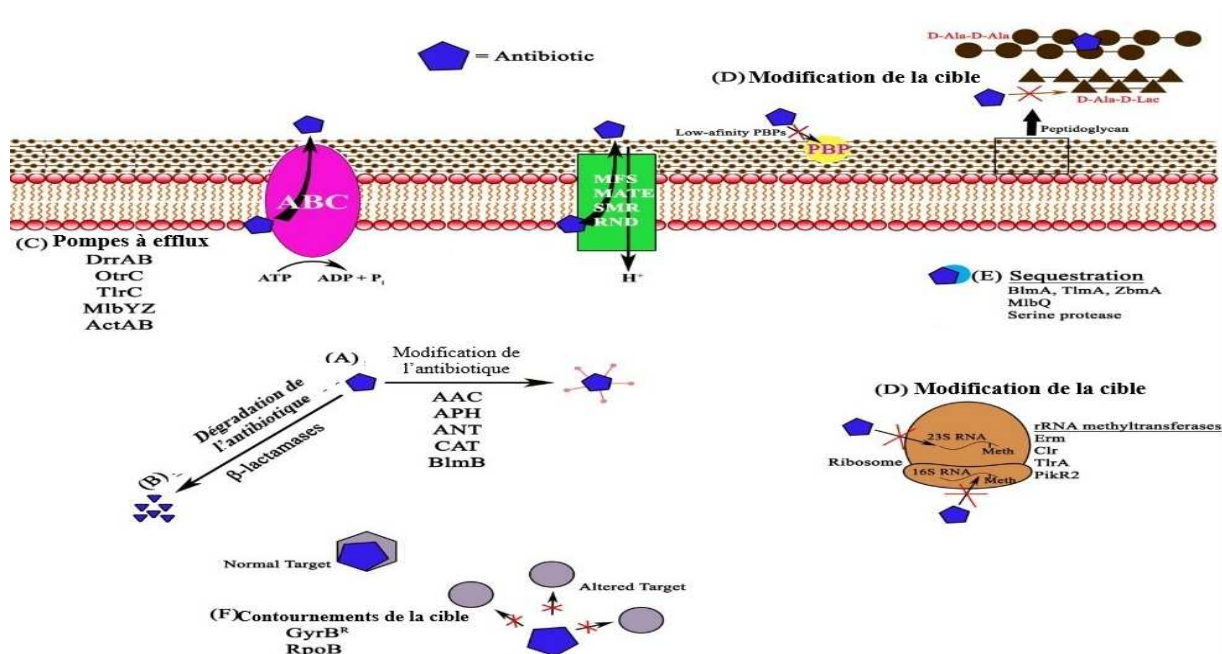


Figure 13: Différents mécanismes de résistances bactériennes aux antibiotiques. [40]

3.1 L'inactivation enzymatique des antibactériens

L'un des mécanismes de résistance le plus courant chez les bactéries est l'inhibition enzymatique. Ce mécanisme est basé sur plusieurs stratégies de modification de structure des composés antibactériens.

L'enzyme modifie le noyau actif de l'antibiotique par clivage ou addition d'un groupement chimique, ce qui empêche la fixation de l'antibactérien sur sa cible et provoque une perte d'activité.

3.1.1 Les enzymes hydrolytiques

3.1.1.1 Les β-lactamases

Les β-lactamases ont une structure proche de celle des PLP, elles assurent l'ouverture irréversible du cycle β-lactame engendrant un métabolite inactif.[41]

Divers schémas de classification ont été proposés pour les β-lactamases : (voir annexe 1) [31, 42]

- Sur la base de l'homologie des séquences de protéines, tous les β-lactamases sont divisées en quatre classes moléculaires A, B, C et D. les enzymes des classes moléculaires A, C et D sont des sérines hydrolases, tandis que les enzymes de la classe



moléculaire B sont des métalloenzymes et contiennent un ou deux atomes de zinc. C'est la classification d'Ambler.

- Ils peuvent être classés en fonction de leur profil de substrat ainsi que le profil d'inhibition des β -lactamases. C'est la classification de Bush, Jacoby et Medeiros.
- Une autre classification a été proposée par Giske qui consiste à résoudre le problème de complexité de terminologie scientifique actuelle en établissant une terminologie simplifiée des β -lactamases pour les cliniciens.

3.1.1.2 Les macrolides estérases

Les macrolides sont cyclisés par une thioestérase responsable de l'étape de fermeture du cycle qui génère du 6-désoxyérythronolide B macrocyle. Par conséquent, cette liaison clé est ciblée par des enzymes résistantes aux macrolides fonctionnant en mode d'ouverture d'anneau inversé.

Deux estérases d'érythromycine, codées par les gènes *ereA* et *ereB*. Les deux protéines entraînent des niveaux de résistance très élevés chez *E. coli*.

La présence de ces gènes sur des éléments génétiques mobiles implique leur capacité à se répandre dans la communauté microbienne.[43]

3.1.1.3 Les époxydases

La résistance enzymatique à l'antibiotique se produit par la destruction de l'époxyde réactif par l'ouverture du cycle :

- L'enzyme FosX, dont le gène a d'abord été isolé dans une bactérie du sol non pathogène *Mesorhizobium loti*.
- L'enzyme FosA, une métallo-enzyme présente dans les bactéries gram négatif.

Les deux enzymes catalysent l'ouverture du cycle époxyde à travers l'eau (FosX) et le glutathion (FosA), elles nécessitent un divalent catalytiquement important, le cation métallique Mg^{2+} . [43, 44]

3.1.2 Les transférases

3.1.2.1 Les acyltransférases

Les acétyltransférases ciblent les groupes hydroxyles (pour O-acétylation) et/ou amine (pour N-acétylation) sur les antibiotiques, et l'ester ou l'amide résultant est biologiquement stable et irréversible sans l'action d'une estérase ou d'une amidase apparentée.[43]



Exemple : Les aminoglycosides acétyltransférases (AAC)

Les AAC modifient les groupes hydroxyles et les groupes aminés des aminosides, bloquant ainsi l'interaction avec l'ARNr et entraînant une résistance.[31, 45]

3.1.2.2 Les phosphotransférases

Les kinases sont des enzymes catalysant le transfert du phosphate des nucléotides triphosphates (NTP) vers un ensemble diversifié de substrats.[46]

Exemple : Les macrolides phosphotransférases (MPH) [43]

Le transfert de phosphate est également adopté par les bactéries pour bloquer les macrolides tels que l'érythromycine. Les études sur ces produits ont révélé que la phosphorylation se produit sur l'hydroxyle libre (site 2 de la nomenclature des macrolides) du sucre désosamine qui interagit directement avec l'ARNr 23S.

Les gènes codant pour les MPH ont été isolés d'agents gram négatifs (*E.coli*) (mphA et mphB) et d'agents gram positifs (*S.aureus*) (mphC).

3.1.2.3 Les nucléotidyltransférases

Les nucléotidyltransférases transfèrent un fragment nucléotide monophosphate des NTP à un groupe hydroxyle accepteur de l'antibiotique.

Ils sont regroupés en deux principales classes selon la spécificité de leur cible :

- Les ANT qui modifient les aminosides.
- Les protéines Lin qui inactivent les lincosaminides.[43, 45]

3.1.2.4 Les glycosyltransférases

Le transfert de glycosyle est un mécanisme de résistance aux antibiotiques répandu dans les bactéries du sol, mais rarement rencontré parmi les agents pathogènes. [43]

3.1.3 Les enzymes REDOX

Ce sont des enzymes basés sur des réactions d'oxydo-réduction. L'exemple le mieux étudié est l'oxydation des tétracyclines par TetX, une enzyme qui catalyse la monohydroxylation des tétracyclines de manière dépendante de l'oxygène. Le gène codant pour TetX a été trouvé sur des transposons conjugués dans l'anaérobe *Bacteroides fragilis*.

TetX agit sur les tétracyclines de première et deuxième génération et il est également actif contre l'antibiotique de troisième génération tigécycline. Sous conditions aérobies, TetX utilise le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) en présence de magnésium et convertit la tigécycline en 11a-hydroxytigécycline. La molécule modifiée se lie faiblement au magnésium, ce qui est essentiel pour sa liaison au ribosome.[43]



3.2 Modification de la concentration intracellulaire des antibactériens

3.2.1 Altération de la perméabilité

Un antibactérien efficace doit pénétrer dans la cellule bactérienne et atteindre des concentrations suffisantes pour agir sur sa cible.[30]

La concentration intracellulaire d'un antibactérien peut être réduite en empêchant son entrée dans la cellule. Ce mécanisme de résistance est particulièrement pertinent chez les bactéries à Gram négatif car la membrane externe forme une barrière de perméabilité très efficace.[47]

3.2.1.1 Structures impliquées dans la résistance par mécanisme de l'imperméabilité

3.2.1.1.1 Biofilm

Un biofilm se forme en milieu aqueux ou avec une exposition à l'humidité lorsque des microorganismes s'organisent en communauté au sein d'une matrice exo-polysaccharidique, adhérente à des surfaces inertes et vivantes.[31]

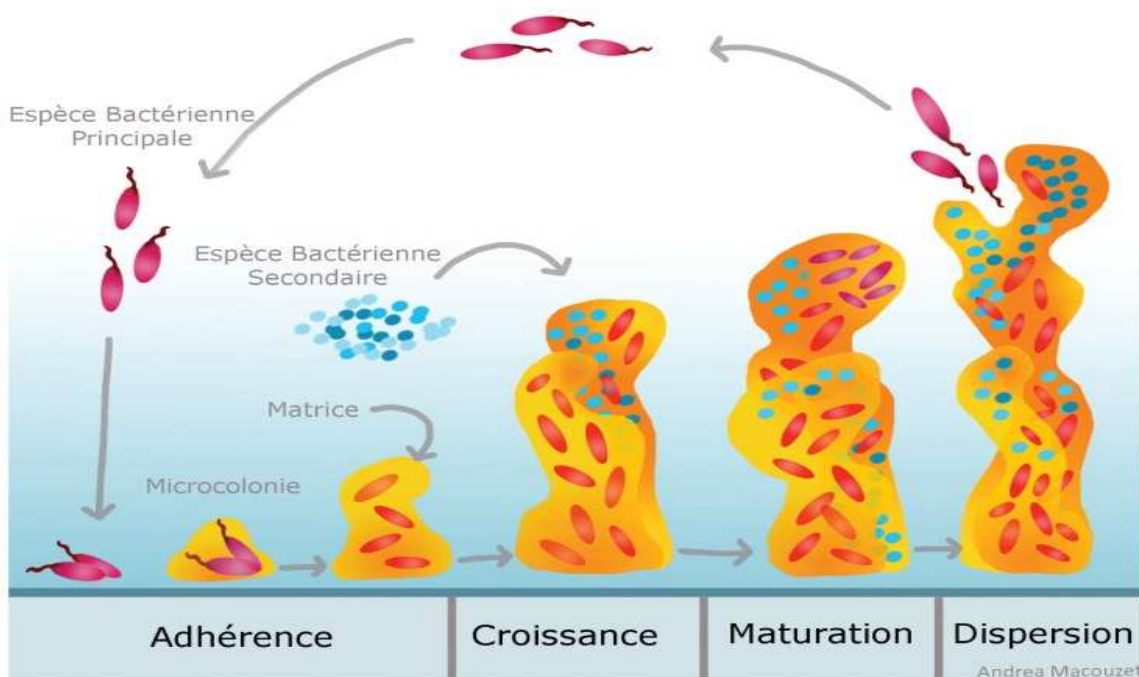


Figure 14 : Le cycle de vie du biofilm. [48]

Il peut y avoir plusieurs explications de l'échec des antibiotiques dans les biofilms, y compris :

- **La matrice d'exo-polysaccharides** : ces composés contribuent à retarder l'entrée des antibiotiques ou à permettre une pénétration incomplète dans le biofilm car ils s'adsorbent dans la matrice d'exo-polysaccharides.



Exemple : les aminosides chargés positivement se lient aux polymères du biofilm chargés négativement entraînant une pénétration lente.[49]

- **Le micro-environnement chimique :** à mesure que les biofilms mûrissent, la quantité de cellules augmente conduisant à l'activation du système QS (quorum sensing), qui sélectionne des cellules qui sont phénotypiquement résistantes à des concentrations élevées d'antibactériens ainsi qu'aux conditions environnementales dans le biofilm. **L'oxygène** est consommé par les cellules situées dans les couches superficielles du biofilm, créant des zones d'anaérobies dans les couches les plus profondes. Les aminosides sont moins efficaces en anaérobiose.

De plus, des gradients de **pH** sont générés par l'accumulation locale des déchets acides interférant directement avec l'action des antibiotiques.

En raison du manque d'oxygène et d'altération de pH, certaines bactéries cessent de se reproduire et entrent dans un état sans croissance, dans lequel elles sont protégées contre la mort (par manque de nutriments et même l'attaque de certains antibactériens).

Exemple : la pénicilline, qui devient inefficace car elle ne tue que les bactéries en croissance (la cible de la pénicilline est la synthèse de la paroi cellulaire).

De plus, il existe une réponse au stress osmotique au sein du biofilm qui induit des changements dans les porines qui réduisent la perméabilité de l'enveloppe cellulaire aux antibiotiques. [49]

- **Variantes phénotypiques :** l'intérieur du biofilm, une haute densité de bactéries favorise le transfert génétique, améliore la sélection de souches résistantes et augmente la fréquence de mutation. [31]

3.2.1.1.2 Les porines

Les bactéries GRAM négatif possèdent des porines qui sont des canaux protéiques insérés dans la membrane externe. Ils permettent la pénétration des éléments essentiels à la vie des bactéries et aussi les antibiotiques hydrophiles tels que les bêta-lactamines, les fluoroquinolones et tétracyclines. La résistance médiée par les porines peut résulter de :

- Changement de niveau de l'expression qui peut être due à plusieurs facteurs.
- Rétrécissement du canal et altération du champ électrostatique due au remplacement d'un résidu d'acide aminé.
- Mutation ayant un impact négatif sur la perméabilité des pores par synthèse des substances bactériennes ex : les polyamines.[50]



Ce mécanisme de résistance peut s'appliquer sur plusieurs familles d'antibiotiques quand elles empruntent la même porine ou être spécifique lorsque le canal est propre à une famille ; la résistance acquise de *P. aeruginosa* pour l'imipénème par perte de la porine aux carbapénèmes (OprD) en est un exemple.[51]

3.2.2 Les pompes d'efflux [4, 52]

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 à l'extérieur des métabolites et des composés considérés toxiques tels que les antibiotiques et d'autres médicaments.

La résistance provient de la réduction de concentration en antibactérien dans le cytoplasme de la bactérie, ce qui prévient et limite l'accès de l'antibiotique à sa cible.

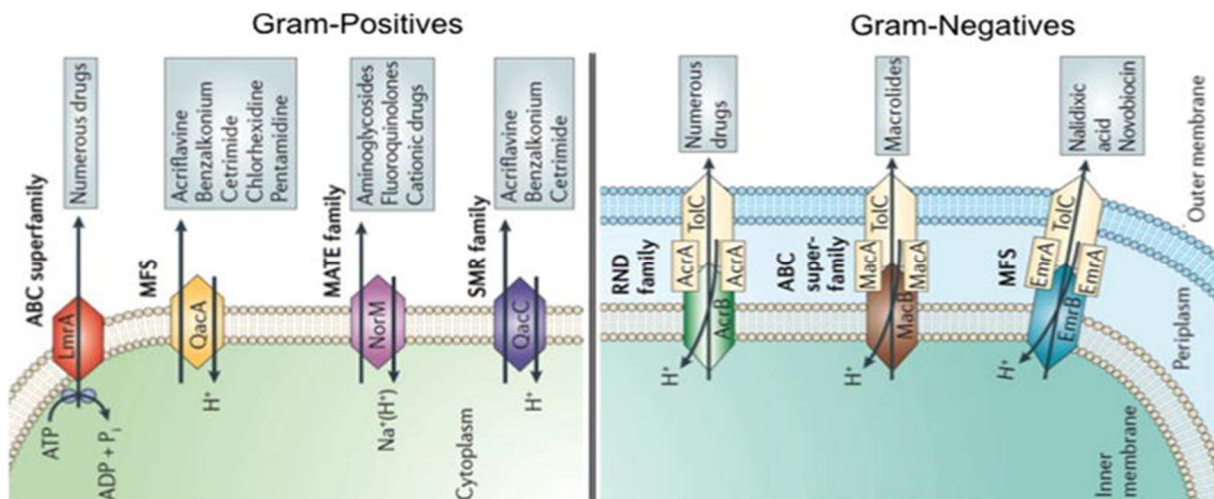


Figure 15 : Représentation de différents types de pompes à efflux chez les BGN et BGP. [13]

Ces pompes peuvent être :

- **Pompes SDR (specific-drug-resistance) :** confère une résistance vis-à-vis d'une seule classe d'antibiotique (pompes d'efflux Tet pour les tétracyclines). La résistance est extra chromosomique. (plasmides ou transposons).
- **Pompes MDR (multiple-drug-resistance) :** ce sont des transporteurs qui peuvent prendre en charge des composés de structure très différente et contribue de manière significative à la multi-résistance intrinsèque et acquise des bactéries vis-à-vis des antibiotiques. La résistance est chromosomique.

Exemples : AcrB chez *E.coli*, MexB chez *P.aeruginosa*.

Les pompes d'efflux bactériennes sont classées en six familles. Résumées dans l'annexe 2.

[53]



3.3 Altération de la cible

Il y a plusieurs composants dans la cellule bactérienne qui peuvent être des cibles d'agents antibactériens. Ces derniers peuvent être structurellement modifiées ou remplacées, de telle sorte que le composé antibactérien ne puisse plus se lier et exercer son activité au niveau de la bactérie. Ce type de résistance peut être la conséquence de l'acquisition de matériel génétique mobile (extra chromosomique), ou peut résulter d'une mutation spontanée au niveau de la séquence nucléotidique de la cible.

3.3.1 Modification des protéines cibles par mutations spontanées

Exemple de résistance aux quinolones [30, 31, 45]

Des mutations dans les gènes codant pour l'ADN gyrase (topoisomérase II) et la topoisomérase IV restent la cause la plus répandue de l'acquisition d'une résistance de haut niveau aux quinolones.

Ces mutations ponctuelles entraînent des modifications des acides aminés des protéines cibles, qui va réduire leur affinité pour le médicament, tout en permettant à l'enzyme de fonctionner.

Chez les bactéries gram négatif comme *E.coli*, les mutations se localisent dans les gènes codant pour les deux sous-unités de l'ADN gyrase (principalement GyrA), alors que les bactéries gram positif comme *S.aures*, présentent des mutations dans les gènes codant pour les deux sous-unités parC et ParE (principalement ParC) de la topoisomérase IV.

Ces mutations de résistance sont le plus souvent localisées dans le domaine amino-terminal des sous-unités et sont à proximité du site actif tyrosine. Ce domaine a été appelé « Quinolones Resistance Determinant Region » (QRDR)

3.3.2 Modification de la cible par les gènes acquis

Exemple de résistance aux aminoglycosides [51]

Ce mécanisme inclue la modification de la cible qui se produit via l'ARNr 16S méthyltransférases, qui confèrent une résistance aux aminosides par modification des résidus nucléotidiques clés, empêchant la liaison de l'antibiotique à sa cible dans l'ARNr.

Les méthyltransférases ARNr 16S peuvent être séparées en deux groupes basés sur le site de modification :

- Méthylation de la position N7 du nucléotide G1405, ce qui entraîne une résistance aux aminosides DOS 4,6-disubstitués, y compris la gentamicine et l'amikacine.



- Méthylation de la position N1 du nucléotide A1408, ce qui entraîne une résistance aux aminosides DOS 4,5-disubstitués et monosubstitués, y compris la néomycine et l'apramycine.

3.3.3 Protection de la cible

Bien que certains des déterminants génétiques codant pour des protéines qui assurent la protection des cibles ont été trouvées dans le chromosome bactérien, la plupart des gènes impliqués dans ce mécanisme de résistance sont portés par les éléments génétiques mobiles. Exemples d'antibiotiques concernés par ce mécanisme, on a les tétracyclines (TetM et TetO), les fluoroquinolones (Qnr) et l'acide fusidique (FusB et FusC). [13]

TetO et TetM interagissent avec le ribosome en changeant la conformation de ce dernier par modification géométrique du site de liaison à la tétracycline, pour déloger et interdire la liaison à cet antibiotique tout en permettant de procéder à une synthèse normale de protéines. [37]

3.3.4 Contournements de cibles

Exemple de la résistance à la méthicilline chez les staphylocoques [30, 45]

Certaines souches de staphylocoques sont résistantes à la méthicilline par un mécanisme qui les rend résistants à tous les β -lactamines actuels.

La résistance se fait par acquisition ou évolution de PLP alternatives qui peuvent catalyser la réticulation des peptidoglycanes sans être inhibés par les β -lactamines.

Les SARM ont développé une résistance à de nombreux β -lactamines par l'acquisition de l'enzyme PLP2a codée par le gène *mecA* porté par des éléments génétiques mobiles. Cette enzyme consiste en un domaine de transpeptidase insensible à la pénicilline, qui peut fonctionner avec le domaine de la Transglycosylase de l'enzyme PLP2 native pour maintenir la biosynthèse de la paroi cellulaire lorsque le domaine de transpeptidase de l'enzyme native est inhibé.

3.3.5 Séquestration de cibles (surproduction de cibles comme moyen de bloquer l'accès à la cible critique)

Exemple de la résistance intermédiaire aux glycopeptides chez les staphylocoques [45, 54, 55]

Chez les souches présentant ce mécanisme, on a observé une épaisseur de la paroi cellulaire deux fois plus importante, une proportion plus élevée de chaînes latérales peptidiques dans



lesquelles le résidu glutamine est non amidée et une légère augmentation du nombre de chaînes peptidiques non réticulées.

Le site a observé une augmentation du nombre de chaînes pentapeptidiques non réticulées, qui conservent leur site terminal de liaison d-Ala-d-Ala pour la vancomycine et une épaisseur accrue de la paroi cellulaire a conduit à la proposition de la fausse cible. Dans ce modèle, la vancomycine se lie à un nombre croissant des cibles d-Ala-d-Ala présentes dans la paroi cellulaire épaissie et mal réticulée, protège les sites cibles critiques d-Ala-d-Ala au point d'action de la transglycosylase les enzymes proches de la membrane cellulaire.

Ainsi, la vancomycine est séquestrée par liaison à des sites cibles supplémentaires d-Ala-d-Ala du site de synthèse de la nouvelle paroi cellulaire adjacent à la membrane cellulaire et cette liaison réduit la diffusion du médicament à travers le peptidoglycane modifié.

CHAPITRE III

Méthodes d'exploration de la sensibilité
aux antibiotiques



1 Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques

La standardisation est l'action de rendre une production conforme à certaines normes de référence ou soumission à un modèle, un type, une mesure ou une valeur standard. [56]

L'antibiogramme est soumis à des standards nationaux et internationaux strictes émis par des sociétés savantes spécialisées dans le domaine des antimicrobiens dont les principales sont :

- Le CLSI : institution américaine active depuis 50 ans dans le domaine de l'amélioration des laboratoires cliniques et industriels sous leurs aspects qualité, efficacité et sécurité.[57]
- l'EUCAST : est l'organe européen spécialisé dans la détermination des valeurs d'interprétation de l'antibiogramme ainsi que des aspects techniques des tests in vitro de sensibilité aux antibiotiques.[58]
- L'AARN (Algerian Antimicrobial Resistance Network) : répertorié en 2001 et financé jusqu'en 2013 par l'OMS.[59]

Les normes sont continuellement réévaluées et améliorées puis publiées périodiquement pour mettre à jour les pratiques des laboratoires de microbiologie.

La standardisation a pour but de : [59]

- Dépister rapidement et correctement les souches bactériennes résistantes aux antibiotiques.
- Surveiller l'évolution de la résistance aux antibiotiques dans un pays.
- Une harmonisation des pratiques de l'antibiogramme entre les laboratoires de microbiologie.
- Réduire le coût de l'antibiogramme en testant les antibiotiques adéquats et en tenant compte de la nomenclature de notre pays.
- Orienter la prescription d'antibiotique dont le microbiologiste est un interlocuteur incontournable.
- Initier le contrôle constant de la qualité de l'antibiogramme pour éviter les erreurs de lecture et d'interprétation.
- La facilité de l'interprétation des résultats lors de la confrontation clinico-biologique.



2 Méthode qualitative

2.1 Test de diffusion de disques

Il repose sur le principe de compétition entre la croissance d'une bactérie et la diffusion d'un antibiotique dans un milieu gélosé à partir d'un support papier pré-imprégné d'une charge connue d'antibiotique.[19]

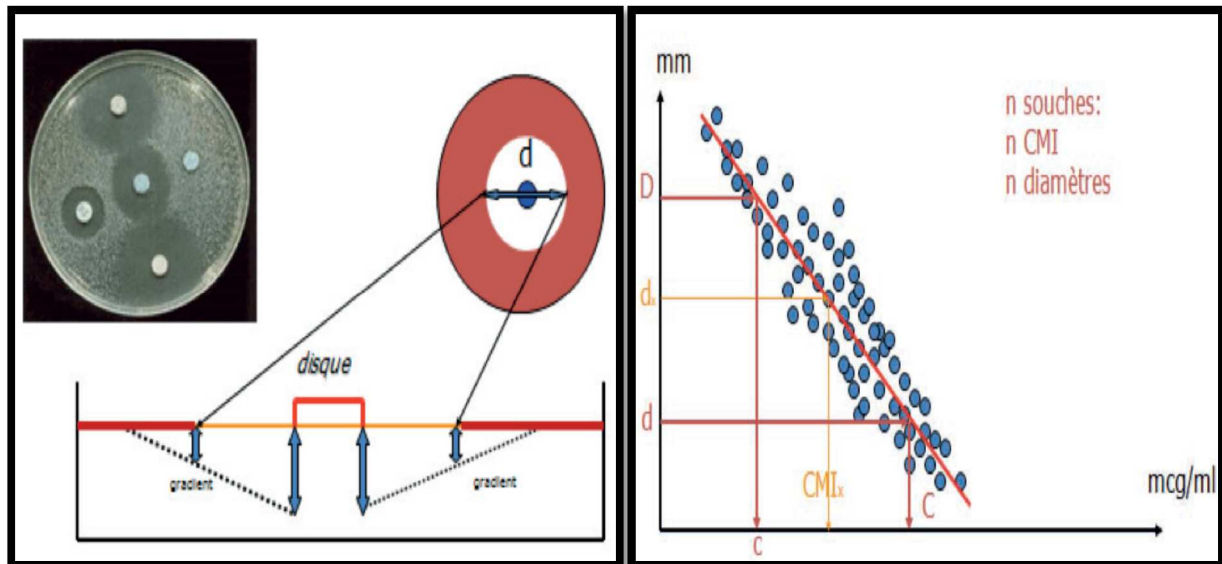


Figure 16 : Test de diffusion de disque sur la gélose et la droite de corrélation diamètre versus CMI. [60]

2.2 Définitions

Breakpoints

Ce sont des CMI seuils, des bornes, qui permettent de statuer sur la sensibilité ou la résistance d'une bactérie donnée à un antibiotique par comparaison à ces seuils de la CMI prise par cet antibiotique vis-à-vis de cette bactérie. Pour certains couples antibiotiques/bactéries, il n'existe qu'une seule concentration critique. [60]

Catégorisation clinique [61]

Trois catégories cliniques ont été retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité *in vitro*

- **Souches sensibles à posologie standard** : les souches catégorisées S sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte dans le cas d'un traitement par voie générale ou orale selon les recommandations des différents tableaux spécifiques d'espèces : $CMI \leq$ à la concentration critique basse.



- **Souches résistantes** : les souches catégorisées R sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quels que soient le type de traitement et la dose d'antibiotique utilisée : $CMI >$ à la concentration critique haute.
- **La catégorie intermédiaire «I» sensible à forte posologie** : Les souches catégorisées I sont celles pour lesquelles la CMI mesurée (ou le diamètre) est $>$ concentration critique basse et \leq à la concentration critique haute (diamètres critiques). La probabilité de succès thérapeutique est forte uniquement dans le cas d'un traitement par voie systémique avec une posologie forte, ou lorsque l'antibiotique se concentre au site de l'infection.
- **Absence de catégorie intermédiaire** : Pour certains antibiotiques il n'y a qu'une seule concentration critique, donc il n'existe pas de catégorie intermédiaire. En cas de sensibilité (CMI mesurée inférieure à la concentration critique), il convient de suivre attentivement les recommandations, car, dans certains cas, seule la forte posologie est recommandée.

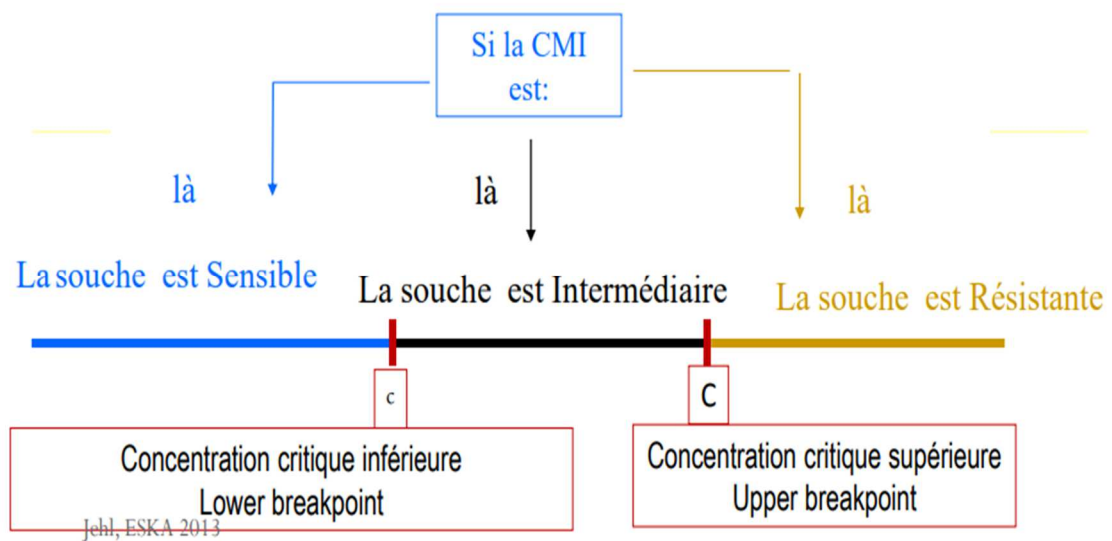


Figure 17 : Les concentrations critiques et les catégories cliniques d'antibiotique



3 Méthodes quantitatives

3.1 Détermination de la concentration minimale inhibitrice

C'est la plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe toute culture visible d'une souche bactérienne après 18 ou 24 heures de culture à 37°C. Elle est exprimée en mg/l ou µg/ml. Cette valeur caractérise l'effet bactériostatique d'un antibiotique. Elle est spécifique au couple antibiotique / bactérie, chaque souche ayant sa propre valeur, en fonction des résistances naturelles et/ou acquises pour la molécule testée.[19, 62]

La détermination des CMI des agents antimicrobiens se fait via :

3.1.1 Dilution en milieu liquide

Un inoculum connu de bactéries est ensemencé dans une série de dilution d'antibiotiques dans un milieu de liquide adéquat. Elle peut être réalisée par macrodilution dont le volume totale est de 1 ml, ou microdilution sur microplaque.[62] Figure 18

3.1.2 Dilution en milieu gélifié

Elle consiste à préparer une série de plaques de gélose contenant l'agent antimicrobien à tester à des concentrations croissantes. [62]

3.1.3 Gradient test « E-test »

Il s'agit d'une technique de diffusion en milieu gélifié à partir d'une bandelette imprégnée d'un gradient de concentration d'antibiotique permettant de donner une mesure précise de la CMI d'un antibiotique. La lecture de CMI se fait visuellement en repérant la graduation à laquelle la culture bactérienne est en contact avec la bandelette. [63]

3.2 Détermination de CMB

La CMB est définie comme étant la plus petite concentration d'antibiotique qui ne laisse que 0.01% ou moins de survivants de l'inoculum initial après 18h ou 24h d'incubation à une température de 37°C ou la plus faible concentration en agent capable d'entraîner la mort d'au moins 99,99% des bactéries d'un inoculum. Elle caractérise l'effet bactéricide d'un antibiotique.[64]

Figure 19

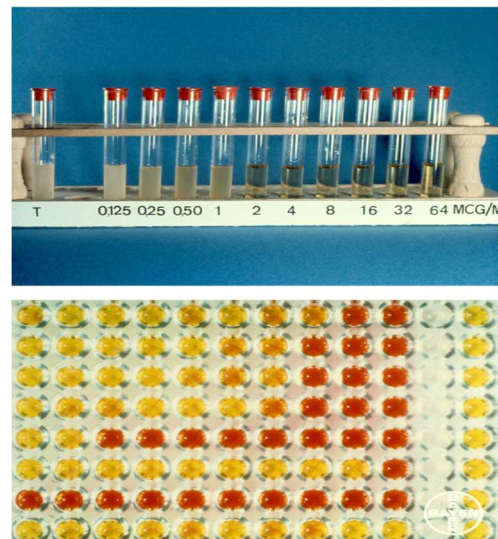


Figure 18 : Détermination de la CMI. Haut : par macrodilution en milieu liquide. Bas : par microdilution.

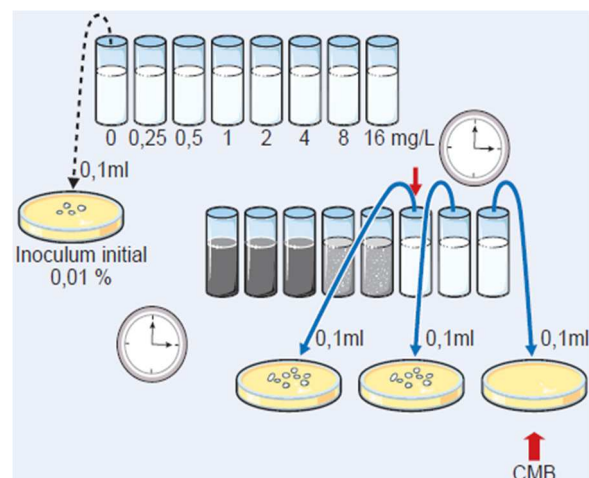


Figure 19 : Détermination de la concentration minimale bactéricide. [19]



4 Avantages et limites des différentes techniques [19, 62, 65-67]

Tableau 1 : Avantages et limites des différentes techniques.

	Avantages	Limites
Test de diffusion de disque	<ul style="list-style-type: none"> - il est techniquement simple à réaliser et très reproductible, les réactifs sont relativement peu coûteux, il ne nécessite aucun équipement spécial, il est flexible en ce qui concerne la sélection des agents antimicrobiens à tester. -L'impact médical est de plusieurs ordres : impact immédiat (traitement du malade concerné et alerte à la résistance), impact différé (traitements empiriques), collectif (surveillance de la résistance). -L'antibiogramme par diffusion reste incontournable dans la découverte de nouveaux mécanismes de résistance et dans la visualisation des interactions entre antibiotiques indispensables à l'interprétation phénotypique et est suffisant dans l'étude de la sensibilité des phénotypes sauvages. 	<p>Le résultat est généralement obtenu en 48-72 heures, ce qui est parfois trop long pour un phénomène aigu.</p> <ul style="list-style-type: none"> -L'antibiogramme est un test totalement artificiel. Les bactéries sont cultivées dans un milieu dont les composants ne sont pas tous chimiquement définis et dans des conditions de croissance, température, humidité, pH, concentration protéique, différentes de celles du lieu de l'infection. La concentration des antibiotiques in vitro est constante, ce qui n'est évidemment pas le cas dans le corps humain
Détermination de CMI	<ul style="list-style-type: none"> -déterminer la concentration précise inhibant la croissance bactérienne. -établir la sensibilité des organismes produisant des résultats ambigus. - Une optimisation des paramètres PK/PD et adaptation des posologies et mode d'administration. - Une détection des mutants bas niveaux et de mécanismes inconnus 	<p>Toutes les bactéries ne peuvent pas être étudiées en milieu liquide, et il est parfois indispensable de revenir à la méthode en milieu gélosé pour l'étude de certains mécanismes de résistance. (streptocoques, leptospire, mycoplasme)</p>
Détermination de CMB	<ul style="list-style-type: none"> -la détermination de l'activité bactéricide dans des infections sévères. - peut être un bon outil et relativement peu coûteux pour classer un grand nombre d'agents antimicrobiens par activité, à des fins de dépistage 	<p>doit être déterminé individuellement pour chaque micro-organisme car l'antimicrobien aura probablement des valeurs de CMB différentes pour différents micro-organismes d'essai</p>



5 Tests complémentaires phénotypiques

5.1 Recherche de BLSE

La détection de BLSE se fait devant une suspicion de diminution de la sensibilité aux C3G (CTX ≤ 27 mm, CAZ ≤ 22 mm et CRO ≤ 25 mm) et monobactames (AT ≤ 27 mm) chez les entérobactéries, *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.* Cette détection n'est plus recommandée pour des objectifs thérapeutiques mais plutôt pour études épidémiologiques, mesure d'hygiène et d'isolement. [59, 61]

La confirmation phénotypique d'une BLSE est basée sur l'inhibition in vitro de cette activité par l'acide clavulanique qui se traduit par une synergie entre ce dernier et C3G ou aztréonam, elle se fait par : [68]

5.1.1 Des méthodes qualitatives

- Test de synergie double disque « DDST » : apparition d'une image de synergie « bouchon de champagne » entre un disque de C3G et/ou AT et un disque contenant l'acide clavulanique. [59, 61] **Figure 20 a**

5.1.2 Des méthodes quantitatives

- Test de disque combiné « CDT » : augmentation de 5 mm du diamètre de la zone d'inhibition autour C3G associé à l'acide clavulanique et la même C3G seul. [68] **Figure 20 b**
- Dilution en milieu liquide : diminution d'au moins 3 dilutions de la CMI de C3G en présence de l'acide clavulanique par rapport à la CMI de C3G seul. [68]

E-test : soit une méthode qualitative : apparition d'une zone fantôme ou une ellipse déformée, soit quantitative : une réduction ≥ 8 fois est observée dans la CMI de la C3G associée à l'acide clavulanique par rapport à la CMI de la C3G seul. [68] **Figure 20 c**

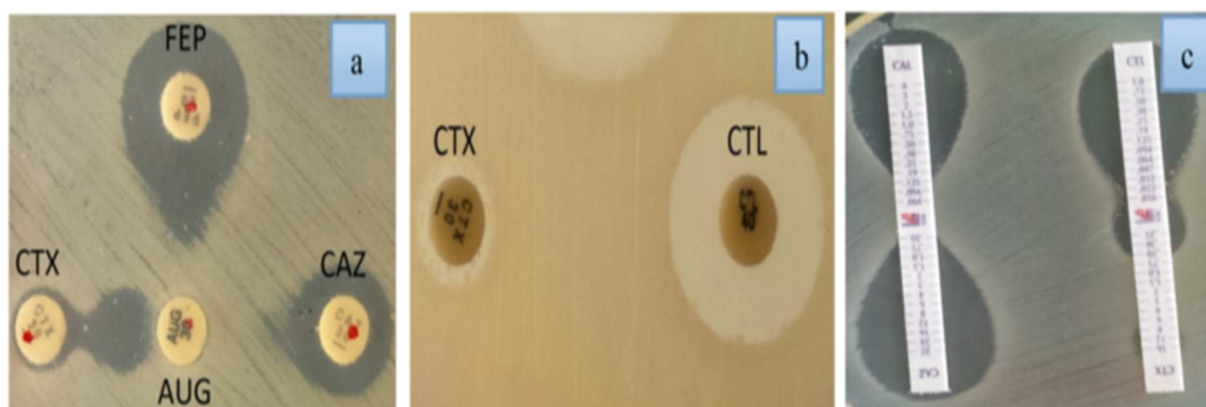


Figure 20 : Tests phénotypiques de confirmation pour la production de BLSE a) Méthode de synergie à double disque ; b) Méthode disque combinée ; c) E-test CTX / CTL positif. [69]



5.2 Recherche de carbapénémases

Une détection rapide et fiable des organismes Gram négatifs à sensibilité réduite aux carbapénémases est indispensable à des fins thérapeutiques, épidémiologiques et de contrôle des infections ; Une telle détection peut faire appel à diverses méthodes, comme le résume la figure 21. [49]

La non sensibilité aux carbapénèmes est suspectée devant une diminution de la zone d'inhibition des carbapénèmes (imipénème < 22mm ou ertapénème < 21mm) ou augmentation de la CMI (> 1µg/ml pour l'ertapénème et >2µg/ml pour les autres carbapénèmes). [59]

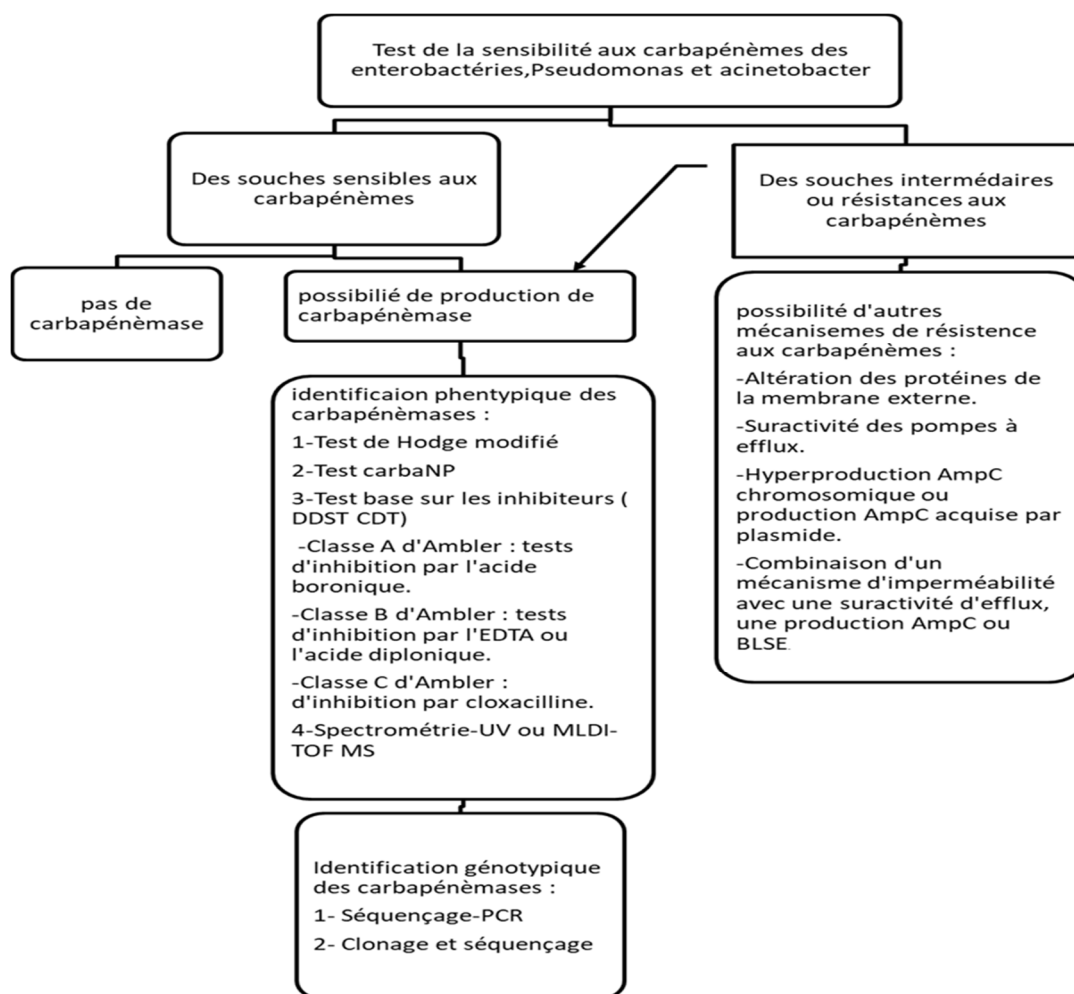


Figure 21 : Schéma simplifié pour la détection des bacilles à Gram négatif non sensibles aux carbapénèmes. [49]

DDST, test de synergie double disque; CDT, test de disque combiné ; EDTA, acide éthylène diamine tétraacétique; BLSE, β-lactamase à spectre étendu; MALDI-TOF MS, spectrométrie de masse à temps de vol par ionisation par désorption laser assistée par matrice; PCR, réaction en chaîne par polymérase.



5.2.1 Test de Hodge modifié « THM »

Ce test permet la mise en évidence d'une synergie enzymatique entre une souche productrice de carbapénèmase (souche à tester) et une souche sauvage de référence sensible en présence de carbapénème.[70]

-C'est un test simple et peu coûteux et sa sensibilité est élevée (95-100%). C'est le seul test permettant d'objectiver la production de carbapénèmases de type OXA. [71, 72]

-Mais ce test prend du temps, car il exige 24-48 h pour les premiers résultats après l'isolement d'une souche productrice de carbapénèmase, et ne peut pas distinguer le type de carbapénèmase.[72]

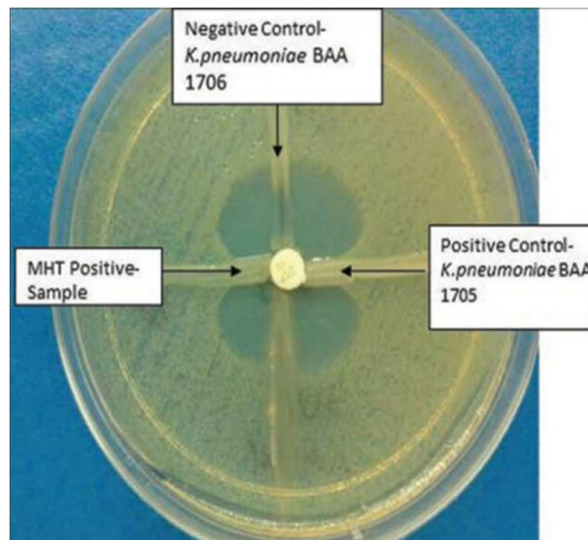


Figure 22 : Test de Hodge modifié [73]

5.2.2 Test d'inhibition de carbapénèmase [49, 57, 68]

Il est basé sur l'inhibition in vitro de l'activité carbapénèmase par l'ajout d'un inhibiteur spécifique à une classe de carbapénèmase :

- Pour la classe A : L'acide boronique (acide 3-aminophénylboronique) et l'acide clavulanique
- Pour les métallo-carbapénèmase de classe B : l'acide éthylène diamine tétra-acétique « EDTA » ou acide dipicolinique
- Pour l'OXA-48 : l'avibactame mais il n'a pas été inclus jusqu'à présent dans les panels phénotypiques.

L'ajout de cloxacilline, inhibiteur d'AmpC β -lactamases, à ces tests permet de différencier l'hyperproduction d'AmpC plus la perte de porine et la production de carbapénèmases.

Ce test s'effectue par la méthode de synergie, de double disque, test de disque combiné ou même l'incorporation de l'inhibiteur dans le milieu de culture.

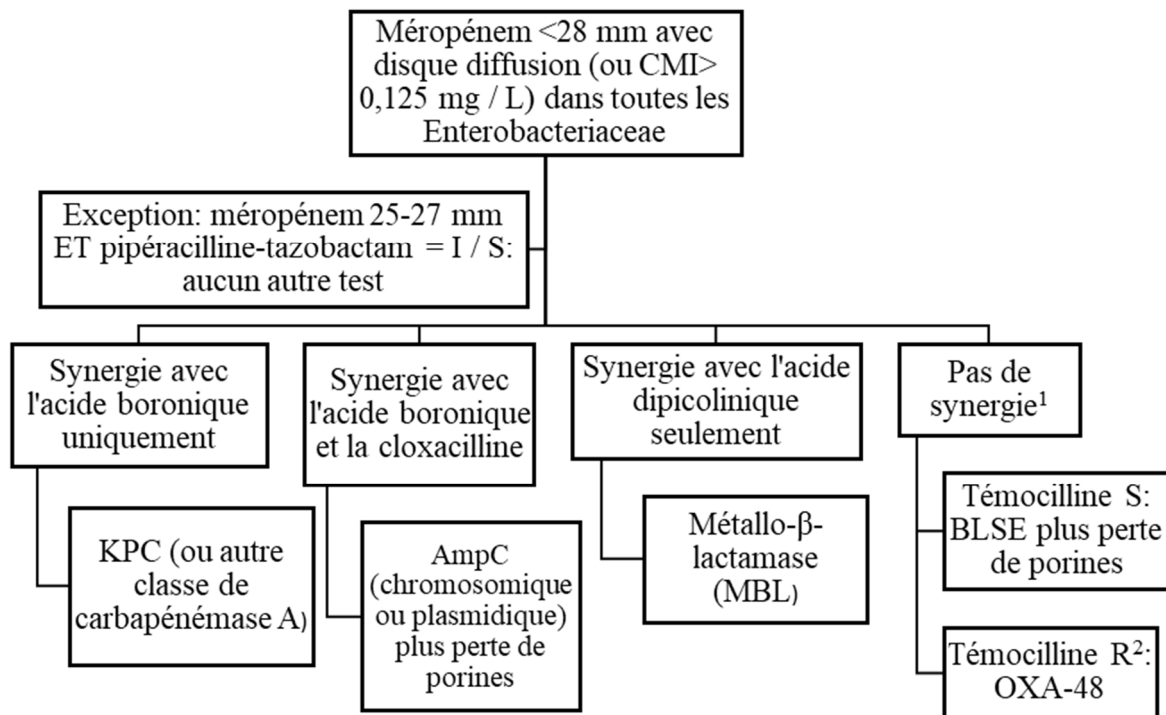


Figure 23 : Algorithme de la détection des classes de carbapénémase. [68]

5.2.3 Méthode d'inhibition de carbapénème « MIC »

Le principe de cette méthode est de détecter l'hydrolyse enzymatique en incubant un carbapénème avec la suspension bactérienne à étudier. (Technique voir annexe3)

Ce test montre des sensibilités de 98 à 100% et des spécificités de 100%. Il s'est avéré peu coûteux et facile à interpréter mais son inconvénient est qu'il nécessite généralement au moins 18 heures pour obtenir les résultats[68, 74]

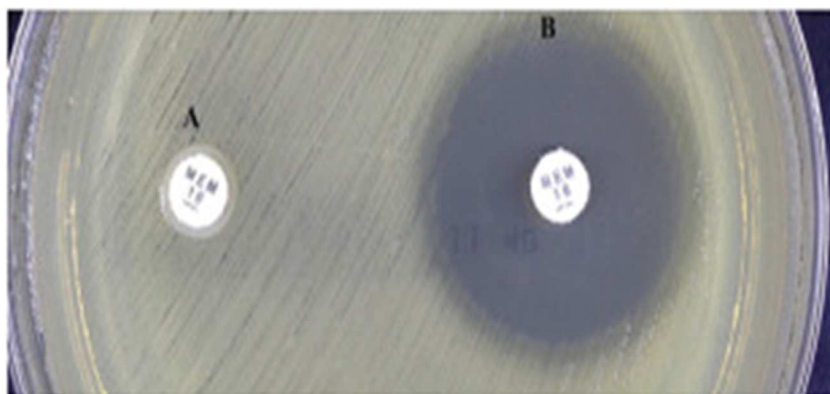


Figure 24 : Résultats de la méthode MIC A. Souche productrice de carbapénémase: croissance non inhibée de la souche sensible conduisant à une absence de zone d'inhibition. B. Souche négative à la carbapénémase donnant une zone d'inhibition claire [75]



5.3 Recherche de céphalosporinase (AmpC)

5.3.1 Dépistage

Une CMI de céfoxitine > 8 mg / L (diamètre de la zone d'inhibition < 19 mm) associée à une résistance phénotypique à la ceftazidime et / ou le céfotaxime peuvent être utilisés comme critères phénotypiques pour l'investigation de la production d'AmpC dans les Enterobacteriaceae de groupe 1. [68]

Bien que cette stratégie ne détecte pas ACC-1, un AmpC à médiation plasmidique qui n'hydrolyse pas la céfoxitine, il convient de noter que la résistance à la céfoxitine peut également être due à une carence en porine. Donc l'utilisation de la céfoxitine pour la détection de la production de l'AmpC n'offre pas une sensibilité optimale qui est de 97,4%, et la spécificité est de 78,7%. [68, 69]

5.3.2 Confirmation

Les tests de confirmation phénotypiques AmpC sont généralement basés sur l'inhibition de l'AmpC par la cloxacilline ou des dérivés d'acide boronique. Cependant, ces derniers ne sont pas spécifiques des enzymes AmpC. [68]

Ces tests sont incapables de différencier entre l'AmpC acquis et l'hyperproduction constitutive de l'AmpC chromosomique. [76]

5.4 Recherche de β -lactamase

La détection de β -lactamase est obligatoire pour toute souche de *N.gonorrhoeae* et *Haemophilus spp*, *Moraxella catarrhalis*, *Enterococcus spp* et *Staphylococcus spp*. [59]

5.4.1 Test de bordure autour du disque de pénicilline

La production de bêta-lactamase a été évaluée sur la base du diamètre et l'aspect de la bordure de la zone d'inhibition autour du disque de pénicilline G. La production de β -lactamase se traduit seulement par un diamètre ≤ 26 ou un diamètre ≥ 26 et une bordure nette de la zone d'inhibition alors que l'absence de β -lactamase se traduit par un diamètre ≥ 26 et une bordure floue. [57, 61]

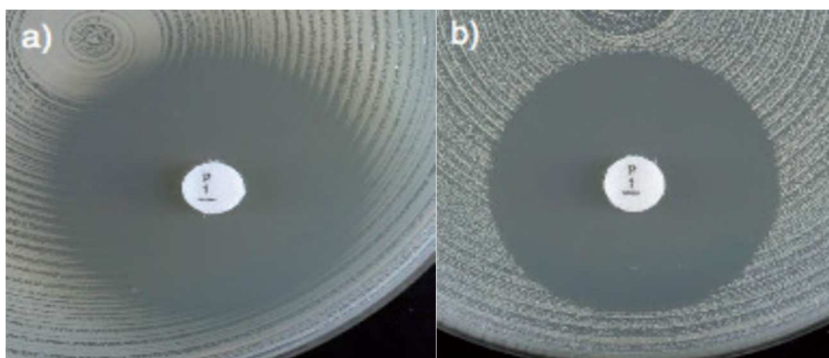


Figure 25 : Test de diffusion de disque de pénicilline. a) une bordure floue : Souche sensible. b) une bordure nette : [61]



5.4.2 Test de trèfle

Ce test permet la mise en évidence d'une synergie enzymatique entre une souche productrice de β -lactamases (souche à tester) et une souche sauvage de référence sensible en présence de l'ampicilline ou pénicilline. [59]

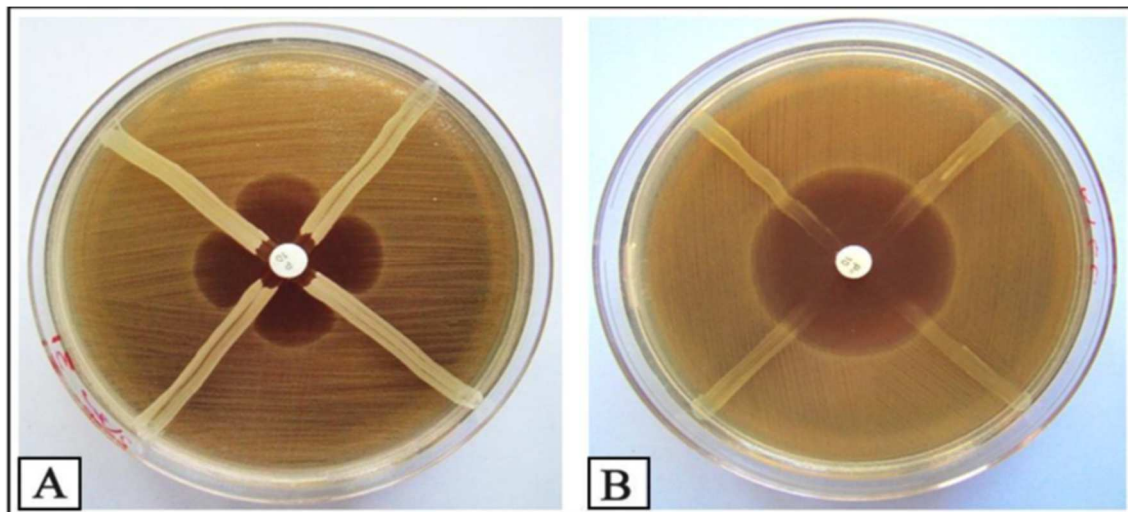


Figure 26 : Test de trèfle –(A) Résultat positif : donnant naissance à un motif en forme de feuille de trèfle autour du disque [de pénicilline (P10U)]; (B) Résultat négatif : aucun motif de feuille de trèfle produit par ATCC 25922 comme contrôle négatif. [77]

- **Autres méthodes :** (voir annexe 04)
 - Test de masuda
 - Test iodométrique

5.5 Détection de *staphylococcus spp* résistant à la méthicilline

Les tests phénotypiques de détection du SARM sont des méthodes simples et relativement peu coûteuses pour détecter la résistance à la méthicilline, mais la détermination précise de la résistance à la méthicilline chez *S.aureus* via des tests phénotypiques est influencée par les variations de la taille d'inoculum, des temps d'incubation, des pH du milieu et des concentrations de sel du milieu.[78]

5.5.1 Test de diffusion du disque

Dans l'antibiogramme standard, le disque de céfoxitine (30 μ g) doit être testé parce que la céfoxitine est un marqueur très sensible et spécifique de la résistance à la méthicilline médiée par *mecA / mecC*.[59]

Les souches avec le diamètre de la zone d'inhibition de céfoxitine est ≤ 22 mm pour *staphylococcus aureus* et ≤ 24 mm pour SCN doivent être signalées comme résistantes à la méthicilline.[59]



5.5.2 Test de screening à l'oxacilline

L'examen soigneusement, faite sous lumière transmise, de boîtes de gélose MH additionné de 4% de NaCl et 6µg/ml d'oxacilline, préalablement ensemencées par la souche à étudier, révélant une croissance, indique la présence d'une résistante à la méthicilline. [57, 78]

5.5.3 Détermination de CMI

La résistance à la méthicilline est détectée par une valeur de CMI de céfoxitine ≥ 4 mg/L. [68]

5.6 Détection de *staphylococcus spp* de sensibilité diminuée aux glycopeptides

La diffusion du disque ne peut pas être utilisée pour tester le hVISA ou le VISA, mais peut probablement être utilisée pour tester le VRSA, ces souches ne présenteront aucun diamètre d'inhibition autour de vancomycine. L'identification de telles souches devra être confirmée.

Mais un diamètre inférieur à 17 mm doit faire pratiquer la CMI des deux glycopeptides, et aussi un diamètre supérieur à 17 mm ne fournit pas une certitude que la souche est sensible aux glycopeptides et il faut faire attention aux différents signes indiqués dans l'annexe 5 qui sont autant d'indications à déterminer les CMI. [56, 68, 78]

Il existe différents tests de dépistage et de confirmation (annexe 6)

- Détermination de CMI.
- Gélose de dépistage à l'oxacilline.
- Gélose de dépistage à la teicoplanine.
- Macro E-test.
- PAP/AUC.

5.7 Détection d'*Enterococcus spp* de sensibilité diminuée aux glycopeptides

Il est essentiel que les boîtes soient incubées pendant 24 h complètes afin de détecter les isolats avec une résistance inductible. La détection de la résistance médiée par vanA est facile alors celle de vanB est plus difficile. [68]

Lors de l'interprétation des résultats, il est important de s'assurer que l'isolat n'est pas *E. gallinarum* ou *E. casseliflavus*, qui peuvent être identifiés à tort comme *E. faecium* en raison d'un test d'arabinose positif parce que ces deux souches présentent une résistance naturelle à la vancomycine (vanC), alors que l'isolement d'une souche *E. faecium* résistante à la vancomycine est une alerte car il y a un risque d'épidémie qui nécessite une enquête de dépistage. [59, 68, 79]



5.7.1 Test de diffusion de disque

Dans l'antibiogramme standard ; le disque de vancomycine est testé. Après incubation de 24h, les bords de zone d'inhibition sont examinés sous lumière transmise ; une résistance doit être suspectée lorsque le bord de la zone de la vancomycine est flou ou lorsque des colonies se développent dans la zone d'inhibition. Les isolats sont signalés comme sensibles à la vancomycine uniquement lorsque les bords de la zone étaient nets et ≥ 12 mm. [57, 68]

5.7.2 Test de dépistage sur gélose à vancomycine

Un test positif est défini par la croissance de plus d'une colonie sur gélose BHI (Brain Heart Infusion) additionnée de 6 μ g/ml de vancomycine (BHI-V6) préalablement ensemencé par la souche à étudier.[57, 68]

Si le test est positif, il faut effectuer une CMI à la vancomycine pour *Enterococcus spp.* qui poussent sur de la gélose de dépistage BHI-V6. [57]

Ce test possède des niveaux de sensibilité et de spécificité de 96 à 99% et 100%, respectivement. Il est fiable pour la détection des isolats positifs pour vanA et vanB. [62, 68]

5.7.3 Détermination de CMI

Les entérocoques dont la CMI de la vancomycine ≥ 4 mg/L sont considérés comme résistants.[68]

5.8 Détection de la résistance inductible à clindamycine

Cette détection se fait chez toutes les bactéries pour lesquels le groupe MLS est étudié, lorsque la souche est résistante à l'érythromycine et sensible ou intermédiaire à clindamycine. [59]

Elle s'effectue par

- **Test « D »** : c'est une méthode basée sur la diffusion de disque où il y aura un aplatissement de zone d'inhibition entre les deux disques d'érythromycine et clindamycine.[57]



Figure 27 : Test D montrant une résistance inductible à la clindamycine [59]

- **La méthode de dilution en milieu liquide** : se fait par visualisation de la croissance bactérienne en présence de l'érythromycine et clindamycine dans le même tube ou cupule : culture positive : milieu trouble/ culture négative : milieu non trouble). [57]



6 L'automatisation

L'automatisation de l'antibiogramme s'est développée pour pallier aux inconvénients de la technique manuelle, dont la réalisation est lente. Ce terme désigne des appareils effectuant la lecture et l'interprétation de tests faits manuellement. Ces appareils fonctionnent selon deux grands principes :

-Ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.

-Ou bien ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques. Les méthodes d'étude de la croissance des bactéries font appel à des méthodes optiques directes :

- Analyse de l'image recueillie par une caméra.
- Turbidimétrie (densité optique d'une suspension proportionnelle à la masse des particules en suspension).
- Néphélométrie (mesure de la lumière diffractée). En règle générale, la néphélométrie a une sensibilité supérieure mais un domaine de linéarité plus étroit que la turbidimétrie.[80]

Exemples de différents automates : [81]

- L'automatisation de la méthode par diffusion repose sur des lecteurs automatiques de diamètres de zones d'inhibition comme l'Adagio et la gamme Sirscan.
- La méthode par microdilution en bouillon peut être réalisée avec des microplaques contenant des dilutions sériées d'antibiotiques prêtes à l'emploi (Sensititre, Microscan).
- des systèmes semi-automatisés incluent un lecteur automatique de CMI (Optiread, Autoscan 4).
- Des systèmes entièrement automatisés, qui gèrent l'incubation, la décision de lecture et la lecture elle-même, sont proposés. Ces automates à antibiogramme comprennent des systèmes qui sont une adaptation directe de la méthode de référence, comme le MicroScan WalkAway et l'ARIS 2X.
- Le Phoenix s'en rapproche : lecture colorimétrique de la croissance bactérienne, incubation d'environ 12 h.
- Le Vitek 2 est basé sur un principe différent : calcul des CMI à partir d'un algorithme appliqué à la vitesse de croissance en l'absence et en présence d'antibiotique, incubation de 6-8 h.



Avantages et inconvénients [80, 81]

- Génération des résultats plus rapidement.
- Economie de main-d'œuvre
- Reproductibilité des résultats.

Cependant

- Le coût élevé des équipements et des consommables par rapport aux méthodes manuelles.
- L'incapacité de tester toutes les bactéries et tous les agents antimicrobiens cliniquement pertinents.
- Un taux d'erreur plus élevé devrait être accepté pour les évaluations utilisant des souches avec des phénotypes difficiles à détecter que pour les études qui testent des populations d'isolats habituellement rencontrés dans le laboratoire clinique.



Figure 28 : Exemples des automates de l'antibiogramme. [82]



7 Méthodes génotypiques

La caractérisation moléculaire du ou des mécanismes génétiques sous-tendant un résultat phénotypique donné, qui, dans certains cas, prend trop de temps, n'est pas concluant ou n'est pas disponible. Elle peut être utilisée pour rechercher la présence d'un gène donné ou d'une mutation ponctuelle et ainsi apporter un soutien direct pour garantir qu'un traitement optimal et une stratégie de contrôle sont entrepris en temps opportun.

En outre, la caractérisation moléculaire est fréquemment utilisée comme méthode indirecte pour faciliter les enquêtes épidémiologiques après une épidémie.[83]

7.1 Méthodes d'identification génomique

7.1.1 Les méthodes d'amplification génique

7.1.1.1 Principe de la PCR

Son principe est similaire à celui de la réplication naturelle de l'ADN dans les cellules, dans lequel chacun des deux brins d'ADN complémentaires peut servir de modèle pour la synthèse d'un nouveau brin. L'enzyme qui assure la synthèse du nouveau brin le long du brin matrice est appelée «ADN polymérase» et la synthèse d'ADN ne peut se produire que de l'extrémité 5' à l'extrémité 3' du nouveau brin. L'ADN polymérase nécessite un petit segment de départ (amorce) du nouveau brin pour commencer à ajouter les éléments constitutifs de l'ADN (les nucléotides). Lorsque la bonne séquence d'amorces est choisie, seules les séquences d'intérêt sont amplifiées. Donc à partir d'une simple copie d'une séquence particulière d'acides nucléiques, cette séquence peut être spécifiquement amplifiée et détectée. [84]

La PCR comprend trois étapes :
[83] (figure29)

- dénaturation de l'ADN double marque à 95 ° C,
- hybridation des amorces de PCR à 50 à 60 ° C,
- extension de l'ADN à 72 ° C

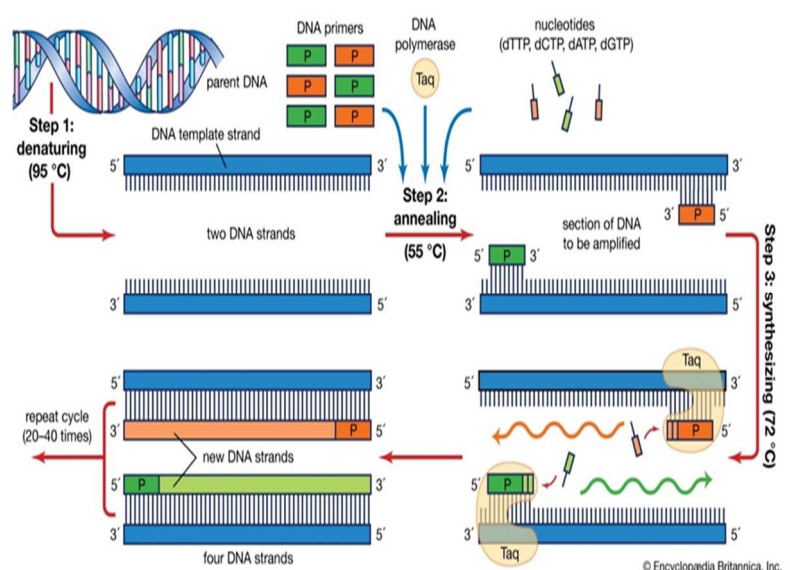


Figure 29 : Le processus en trois étapes de la PCR [85]



7.1.1.2 Différents types de PCR

- **la PCR en temps réel (qRT-PCR)**

La PCR en temps réel basée sur la détection et la quantification d'un «reporter» fluorescent. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. [86]

Dans la PCR multiplexe, plusieurs fragments d'ADN cibles sont amplifiés simultanément. [87]

- **PCR isotherme**

Ça ne nécessite aucun thermocycleur pour changer la température de réaction car l'ensemble du processus s'effectue à une température constante. [83]

7.1.2 Les techniques d'hybridation (identification bactérienne avec sondes nucléiques)

Les tests d'hybridation sont utilisés pour détecter les gènes de résistance en les hybridant à des sondes marquées ; Le principe des sondes nucléiques est de faire agir l'ADN ou l'ARN bactérien à identifier (la cible), avec une séquence d'ADN ou d'ARN spécifique de la bactérie recherchée (la sonde). [88]

Il existe deux types d'hybridation : l'hybridation in situ et l'hybridation après transfert.

7.1.2.1 Hybridation in situ par fluorescence (FISH)

Dans FISH, des sondes d'ADN fluorescentes sont utilisées pour détecter la présence de gènes de résistance directement dans des cellules bactériennes isolées de patients. Les cellules des échantillons sont étalées sur des lames de microscope et des sondes marquées par fluorescence sont ajoutées. Les sondes et l'ADN génomique bactérien doivent être dénaturés pour permettre à la sonde de se lier à sa séquence cible in situ. Après l'hybridation, toute la sonde restante est lavée et un microscope laser à fluorescence est utilisé pour visualiser les sondes se liant aux séquences cibles et pour détecter la présence de gènes de résistance. [89]

7.1.2.2 Technologie microarray ADN (les puces à ADN)

Les puces à ADN sont des outils génomiques qui ont été utilisés avec succès au cours de la dernière décennie pour évaluer la diversité génomique bactérienne en détectant la présence ou l'absence de gènes dans un organisme d'essai par rapport à une souche ou à des gènes de référence.[90]



Une puce à ADN est un support physique subdivisé en milliers de cases dans chacune desquelles on dépose une séquence d'ADN simple brin contenant un gène particulier. On dispose sur cette lame des ADNc obtenus à partir des ARNm issus d'une cellule donnée, marqués par une molécule fluorescente. L'hybridation reflète alors les gènes exprimés dans une cellule donnée. De cette manière, on peut comparer les gènes exprimés dans différentes cellules (par exemple : bactérie sauvage et bactérie résistante, cellules différenciées, cellules tumorales...). [91]

7.2 Les principaux avantages et inconvénients des méthodes génotypiques [83, 86, 92]

- Ce sont des méthodes sensibles, spécifiques et peuvent être utilisées pour détecter la présence d'un certain nombre de gènes associés à la résistance simultanément.
- Cependant les méthodes moléculaires pour la détection des gènes de résistance fournissent des données supplémentaires, et non en remplacement de test de sensibilité phénotypique aux antibiotiques donc on ne peut pas les utiliser en 1^{ère} intention.
- Leur coût plus élevé par rapport aux méthodes phénotypiques.
- la PCR ne détecte que des pathogènes prédéfinis, dont les amorces sont incluses dans le panel, et ne fournit pas d'antibiogramme.
- Les tests PCR conventionnels sont bien adaptés pour détecter la présence ou l'absence de gènes de résistance mais sont moins adaptés pour la détection de mutations ponctuelles dans les gènes cibles, sauf si un séquençage ultérieur est effectué pour détecter ces mutations.
- La qRT-PCR peut détecter des mutations ponctuelles dans un gène donné si la séquence spécifique des sondes d'ADN ciblant la zone de mutation sont utilisées.
- Cependant, un avantage que la PCR conventionnelle a sur la qRT-PCR est que cette dernière ne peut être utilisée que pour détecter la présence de courts fragments d'ADN, de manière optimale jusqu'à 150 pb, tandis que la PCR conventionnelle peut facilement détecter des fragments beaucoup plus gros.



8 Autres tests

8.1 Méthodes chromogéniques

8.1.1 Carba NP Test

Cette méthode met en évidence l'acidification d'un milieu contenant un indicateur de pH « rouge phénol » qui vire du rouge au jaune.[93]

Par exemple cette acidification a lieu lors de l'hydrolyse de l'imipénème par une carbapénémase. Des bactéries prélevées sur une gélose sont lysées à l'aide d'un tampon de lyse dans deux tubes séparés. [74]

C'est une méthode peu couteuse et facile à mettre en place au sein des laboratoires avec une bonne sensibilité et spécificité envers toutes les carbapénémases. [94]

Il faut toutefois noter que la sensibilité pour les souches exprimant une OXA-48-like est variable et peut donner des résultats négatifs.[95]

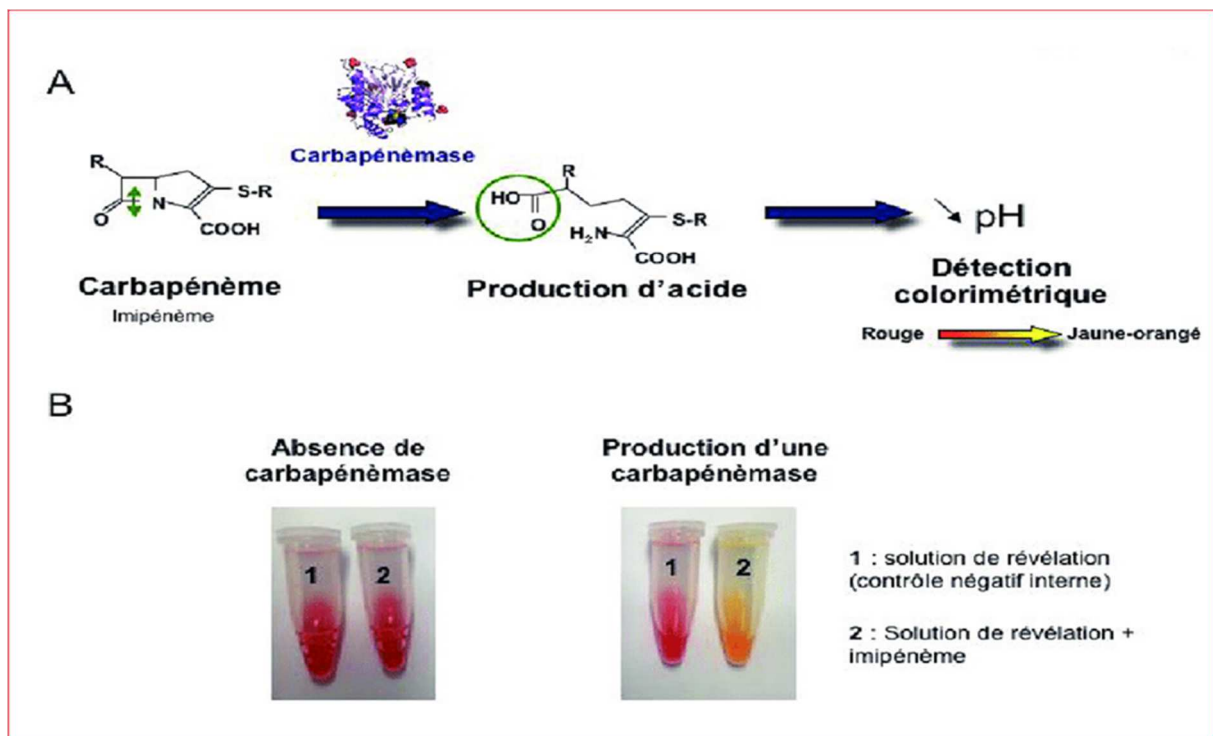


Figure 30 : Carba NP test A. Principe du Carba NP test. B. Résultats du Carba NP test avec une souche ne produisant pas de carbapénémase (*E. coli* produisant la BLSE CTX-M-15, panel de gauche) et avec une souche produisant une carbapénémase (*K. pneumoniae* produisant KPC-2, panel de droite). [96]



8.1.2 Cica-Beta-Test

Le Cica-Beta-Test permet une détection rapide des BLSE (en 15 min) à partir d'une culture bactérienne de 24 h. Ce test utilise 4 bandelettes : une bandelette ne contenant aucun inhibiteur, une deuxième contenant l'acide clavulanique (détection des BLSE), une troisième contenant l'acide boronique (détection des enzymes de type AmpC) et une quatrième contenant l'EDTA (détection des métallo- β -lactamases). Le test est basé sur l'utilisation d'une céphalosporine chromogène, HMRZ-86, possédant un groupement protecteur qui prévient la rupture de son cycle β -lactame. Cependant, cette céphalosporine est hydrolysée par les BLSE, les enzymes de type AmpC et les métallo- β -lactamases en donnant un changement de coloration du jaune au rouge après 2 à 15min à température ambiante. Si la bactérie possède une BLSE, seule la bandelette concernée doit rester jaune puisque l'acide clavulanique l'aura neutralisée. Par contre, si toutes les bandelettes virent au rouge, il est alors impossible de préciser la nature de la multi-résistance au moyen de ce simple test. La sensibilité de cette technique a été estimée à 85 % pour la détection des BLSE. [97]

8.1.3 Nitrocefine

C'est une céphalosporine chromogène qui passe du jaune à la lecture lorsque la liaison amide du cycle bêta-lactame est hydrolysée par la bêta-lactamase. Il est sensible à l'hydrolyse par toutes les bêta-lactamases connues produites par des bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

C'est une technique sensible pour détecter les souches productrices de bêta-lactamases de *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae*, *Staphylococcus* spp, *Enterococcus* spp et *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. La nitrocefine est le seul test fiable pour détecter *Enterococcus* spp. productrice de bêta-lactamase. [98, 99]

8.1.4 Test bleu Carba

Ce test met aussi en évidence le changement de pH du milieu réactionnel en utilisant comme indicateur coloré le bleu de bromothymol. L'hydrolyse de l'imipénème qui est utilisée comme un substrat pour les carbapénémase est ainsi mise en évidence. Ce test a montré une sensibilité et spécificité proche de 100% pour la détection des MBLs, KPC et Oxa-48. [100]

Figure 31

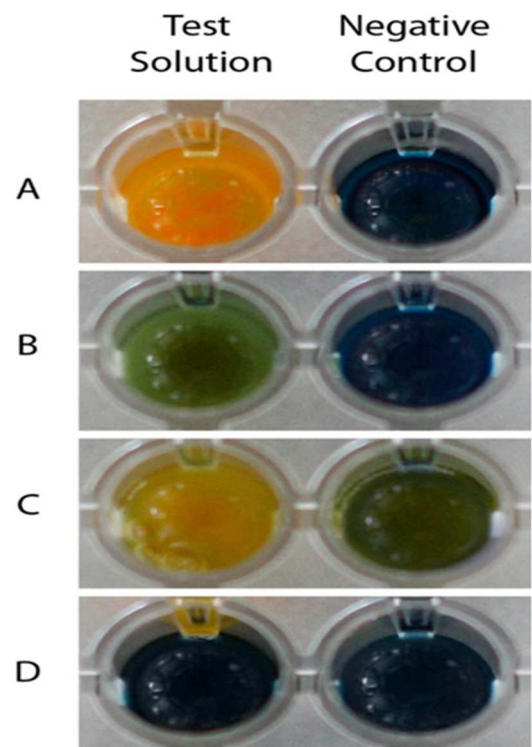


Figure 31 : Test bleu Carba [100]



8.2 Méthodes immunologiques

8.2.1 Test Latex : technique d'agglutination

Il est basé sur l'agglutination de particules de latex sensibilisées avec des anticorps monoclonaux contre PBP2a. C'est test simple, rapide, non onéreux mais il manque de sensibilité et de spécificité. [101, 102]

8.2.2 Méthodes immunochromatographiques

Les performances de cette méthode dépendent essentiellement des caractéristiques des anticorps monoclonaux (affinité, spécificité) dirigés contre les enzymes responsables des résistances aux antibiotiques. Tout comme les méthodes moléculaires, ces tests ne détectent que ce qui est recherché. Par contre, ils détectent directement la production de l'enzyme responsable de la résistance. De plus, contrairement aux tests phénotypiques et biochimiques, ils ne sont pas influencés par l'activité enzymatique même faible de l'enzyme.

Une des limitations majeures de ces tests est la présence ou l'apparition de mutants avec modification du site de reconnaissance d'un des anticorps ce qui induira des résultats faussement négatifs.

Ces tests sont présentés sous forme de cassettes qui intègrent une bandelette qui permet la détection de l'enzyme recherchée. Différents tests ont déjà été décrits pour la détection spécifique d'OXA-48 et KPC ou la détection simultanée d'OXA-48, NDM et KPC. Ces tests montrent des spécificités et sensibilités proches de 100 % et sont considérés comme de bons tests de confirmation pour l'identification des entérobactéries productrices de carbapénèmes. Leur utilisation est facile à mettre en place dans n'importe quel laboratoire de microbiologie. A l'heure actuelle, ces tests ne permettent pas la détection des CTX-Ms et de l'ensemble des cinq principales carbapénèmes chez les entérobactéries.[103-105]

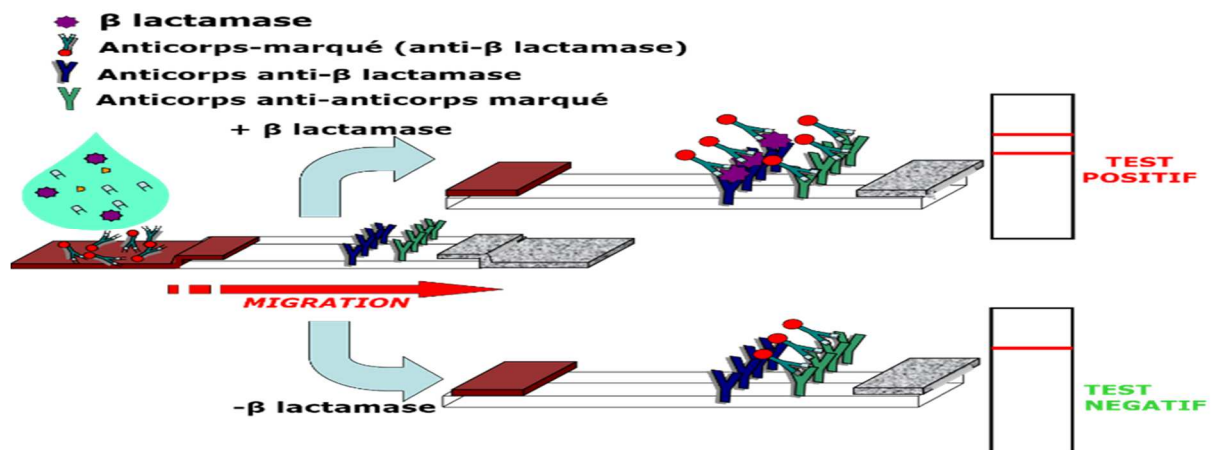


Figure 32 : Aperçu des tests-bandelettes développés contre la résistance aux β -lactamines. [106]



8.3 Spectrométrie de masse

Dans le domaine de la biologie, la spectrométrie de masse à ionisation douce, telle que MALDI-TOF MS, est établie pour l'analyse de molécules biologiques importantes, telles que les protéines, les peptides, les oligonucléotides, les lipides ou les glycanes. Elle détecterait principalement des protéines ribosomales, des protéines domestiques et des protéines structurales qui sont abondantes dans la cellule, relativement indépendantes de l'état de croissance du micro-organisme. [107]

MALDI-TOF MS (La spectrométrie de masse à temps de vol de désorption / ionisation laser assistée par matrice) est devenu populaire dans les laboratoires de diagnostic de routine.

Elle est utilisée pour l'identification directe en faisant correspondre le spectre de masse généré à partir de l'analyte avec les spectres dans une base de données. [108]

Quatre utilisations principales ont été testées avec succès: [1] la détection et l'expression de mécanismes de résistance aux antibiotiques qui est la méthode la plus explorée jusqu'à présent (par exemple, β -lactamase, activité d'ARNm méthyltransférase), [2] des profils de pic de masse spécifiques dans les spectres, [3] la détection de stabilité biomarqueurs marqués par des isotopes et [4] l'estimation de l'effet des antibiotiques sur la croissance des micro-organismes.[109]

Preparation scheme for the detection of β -lactamase activity

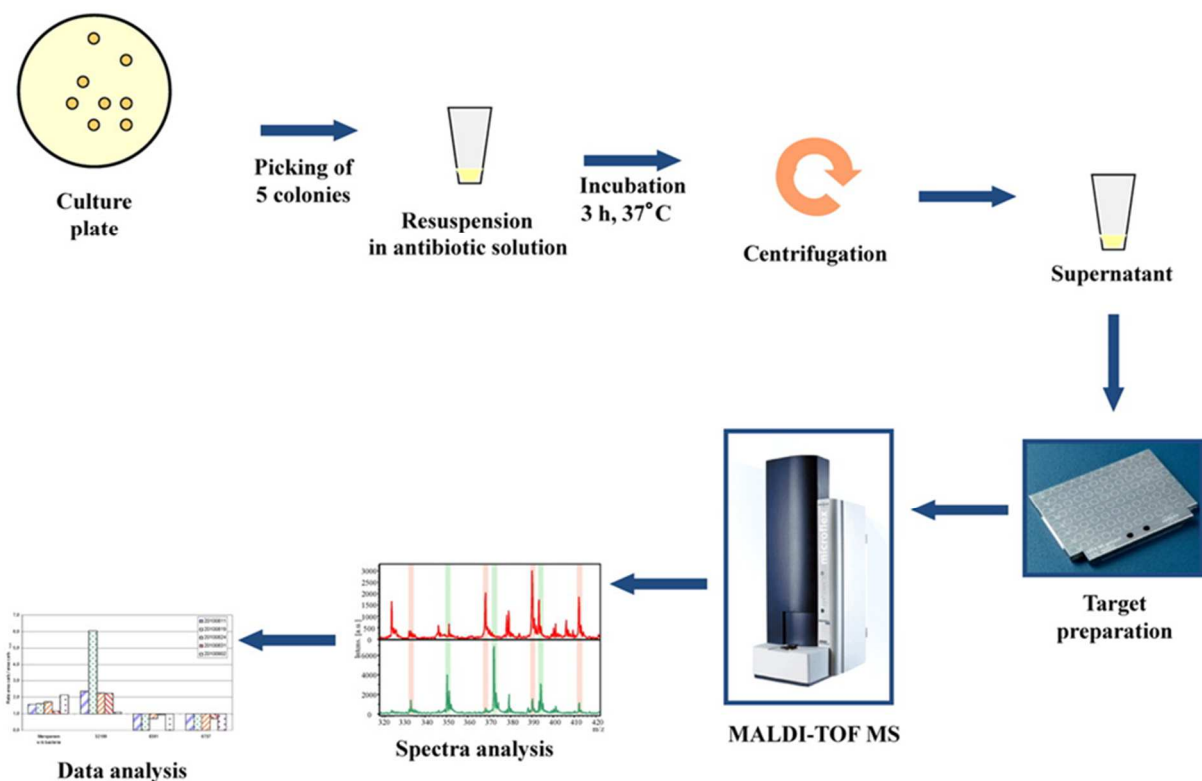


Figure 33 : Procédure de détection des métabolites bêta-lactamases par spectrométrie de masse MALDI-TOF. [110]



Actuellement, la principale avenue avec MALDI-TOF MS est à la recherche de pics spécifiques liés aux porines, des enzymes (par exemple, VanA / B, mecA, KPC-2 ou même des modifications lipidiques. [111, 112]

- Inconvénients de la méthode : [110]
- La méthode implique toujours un temps d'incubation supplémentaire, mais moins que pour les antibiogrammes, mais retardent en outre le diagnostic pour la mise en place d'une antibiothérapie optimale.
- La détection directe des déterminants de la résistance est restée difficile à atteindre parce que de nombreuses protéines impliquées dans la résistance aux médicaments, telles que les bêta-lactamases, ne sont souvent pas exprimées à des niveaux élevés par rapport à d'autres protéines bactériennes. Cela en fait presque impossible d'identifier et de différencier les protéines bêta-lactamases du reste du spectre des protéines.

Partie pratique

Introduction

Avant l'installation de la paillasse d'antibiogramme, le laboratoire de microbiologie souffrait d'instabilité dans les moyens de détermination de l'antibiogramme notamment la rupture fréquente de plusieurs disques d'antibiotiques, parfois majeurs, comme l'imipénème, l'ertapénème et C3G, ce qui rendait les résultats le plus souvent incomplets.

La pratique des tests complémentaires était quasiment absente et les souches d'ATCC n'étaient pas régulièrement réisolées et bien entretenues, induisant ainsi leur perte et donc la perte de l'élément clé du contrôle qualité du matériel et méthodes utilisés.

Rappel des objectifs

L'objectif principal de ce travail est la mise en place de la paillasse d'antibiogramme au niveau du laboratoire de microbiologie de Belloua avec introduction des CMI, des tests complémentaires et du contrôle qualité de l'antibiogramme, du matériel et techniques utilisés avec la création et application de techniques pratiques améliorant la qualité du le travail.



Chapitre I : Matériels et méthodes



1 Type et population d'étude

Il s'agit d'une étude prospective concernant tous les prélèvements reçus au niveau du laboratoire de microbiologie de l'unité Belloua nécessitant un antibiogramme. Ces prélèvements proviennent des patients hospitalisés et externes.

2 Critères d'inclusion, de non inclusion et d'exclusion

Aucun critère particulier dans ces trois volets n'a été défini.

Il est à noter que la mise en place progressive de la paillasse en particulier durant la période de confinement liée à la COVID-19 a induit la perte de 30 souches qui n'ont pas bénéficié de CMI et/ou de tests complémentaires.

Néanmoins, ayant subi un antibiogramme de base, ces dernières ont été incluses dans l'analyse statistique des profils de sensibilité aux antibactériens.

3 Période et lieu de l'étude

Cette étude est menée de la période allant de 5 janvier 2020 au 17 mars 2020 puis poursuivie du 01 septembre 2020 au 17 septembre 2020.

L'étude est réalisée au niveau de laboratoire de microbiologie de l'unité Belloua de CHU NEDIR Mohamed de Tizi-Ouzou.

L'unité Belloua est une structure sanitaire dont la capacité litière est de 335 lits et englobe douze spécialités réparties en services médicaux et services chirurgicaux.

Tableau 2 : La capacité litières de différents services de l'hôpital.

	Service	Nombre de lits
Spécialités Médicales	Pneumologie	60
	Rééducation	47
	Rhumatologie	24
	Dermatologie	15
	neurologie	22
	Endocrinologie	62
	Oncologie	12
	Réanimation	6
Spécialités Chirurgicales	Ophthalmologie	20
	O.R.L	22
	Chirurgie-thoracique	13
	Gynécologie	32



4 Matériels utilisés

4.1 Appareillage de routine

1. Spectrophotomètre.
2. Etuve à 37°C.
3. Bain marié thermostaté.
4. Stéréo microscope.
5. Balance électrique.
6. Agitateur magnétique chauffant.
7. Agitateur Vortex.
8. Autoclave.
9. Séchoir.
10. Réfrigérateur -20°C.
11. Microscope.



Figure 34 : Appareillage de routine.

4.2 Appareillage introduit

1. **Lampe** : un dispositif que nous avons monté afin de faciliter la lecture des antibiogrammes surtout ceux faits sur MH au sang frais.
2. **Ensemencur rotatif** : un dispositif que nous avons monté pour un ensemencement plus facile et rapide que l'ensemencement manuel.



Figure 35 : Appareillage introduit : la lampe (à gauche) et l'ensemencur rotatif (à droite)



4.3 Verreries

1. Erlenmeyer.
2. Pipettes pasteur.
3. Verre de montre.
4. Lames et lamelles.
5. Tubes à essai.

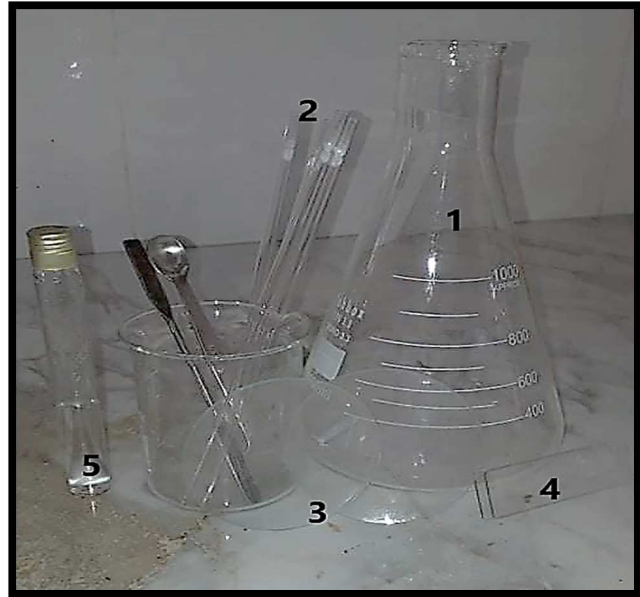


Figure 36 : Verreries utilisées.

4.4 Outils de laboratoire

1. Bec bunsen.
2. Boîte de pétri.
3. Écouvillons.
4. Pince.
5. Pied de coulisse.
6. Microplaque.
7. Micropipette réglable 5µl à 50µl.
8. Micropipette réglable 10µl à 100µl.
9. Micropipette réglable 100µl à 1000µl.
10. Embouts stériles.
11. Spatule.
12. Portoirs.
13. La jarre CO₂.



Figure 37 : Les outils de laboratoire.

4.5 Antibiotiques et autres réactifs

1. Disques des antibiotiques.
2. Poudres des antibiotiques.
3. L'eau distillée stérile.
4. L'eau physiologique stérile.
5. Sang.
6. L'oxydase.
7. Peroxyde d'hydrogène « H₂O₂ ».



4.6 Milieux de cultures

1. Gélose Muller-Hinton.
2. Gélose Hektoen.
3. Gélose nutritive.
4. Gélose Chapman.
5. Gélose chrommagare.
6. Gélose Colombia.
7. Muller-Hinton poudre.



Figure 38 : Milieux de culture

4.7 Logiciels

WHONET est un logiciel utilisé pour la surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques. Plusieurs pays l'utilisent. Une mise à jour régulière est faite pour ce programme, tenant compte des nouvelles recommandations des différents comités d'antibiogramme, notamment : CLSI et EUCAST.

En Algérie, ce logiciel est utilisé depuis 1999 par l'ensemble des membres du réseau national de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques (A.A.R.N). Grâce à cet outil, les résultats d'antibiogrammes sont saisis puis analysés par les microbiologistes, membres du réseau. Ceci permet l'édition d'un rapport périodique d'évaluation des données de la résistance bactérienne aux antibiotiques au niveau national.



5 Méthodes

5.1 Préparation des milieux

5.1.1 Gélose Muller-Hinton

➤ **A partir des flacons commercialisés**

Les flacons de gélose MH sont mis dans le bain marie à 100°C jusqu'à l'obtention d'une gélose liquide, puis retirés et coulés directement dans des boîtes de pétri stériles sur une épaisseur de 4mm ± 0,5 mm. Les boîtes sont laissées pour se solidifier à température ambiante.

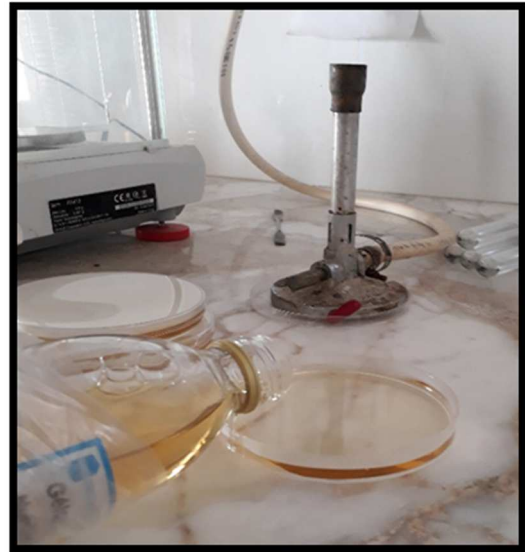


Figure 39 : Préparation de la gélose en boîte de pétri

➤ **A partir de la poudre**

35 g de la poudre de MH est rajoutée à 1L d'eau distillé stérile dans l'erenmyer, puis le mélange est homogénéisé et déposé sur l'agitateur magnétique chauffant pendant 1 min.

Une fois agité, le volume est versé dans des flacons stériles qui sont mis dans l'autoclave à 120°C pendant 15 min puis retirés et coulés directement dans des boîtes de pétri stériles sur une épaisseur de 4mm ± 0,5mm.

Bien que cette méthode demande un travail supplémentaire par rapport à celle utilisant les milieux commercialisés mais elle est moins chère et plus précise en terme de concentration.

5.1.2. Gélose Muller-Hinton au sang frais

À partir d'un flacon de 180 ml de gélose MH préalablement liquéfié au bain marie et légèrement refroidi, nous ajoutons 2,5% de sang. Le mélange est bien homogénéisé puis coulé dans des boîtes de pétri stériles sur une épaisseur de 4mm ± 0,5mm.

5.1.3. Gélose Muller-Hinton additionné de cloxacilline

Les étapes de préparation de ce milieu est résumé dans le tableau ci-dessous :



Tableau 3 : Les étapes de préparation de gélose MH contenant de la cloxacilline

	Entérobactéries groupe 1 et 2	Entérobactéries groupe 3 <i>P.aeruginosa</i> <i>Acinitobacter spp</i>
Concentration en cloxacilline	0,5 mg/ml (500 mg/l)	1mg/ml (1000 mg/l)
Préparation de milieu	100 mg de cloxacilline sont pesées et versées dans 20ml d'eau distillée. Ce volume est ajouté à 180 ml de MH préalablement liquéfié et légèrement refroidi. Le mélange est bien homogénéisé puis coulé sur les boîtes pétri stériles.	200 mg de cloxacilline sont pesées et versée dans 20 ml d'eau distillée. Ce volume est ajouté à 180 ml de MH préalablement liquéfié et légèrement refroidi. Le mélange est bien homogénéisé puis coulé sur les boîtes pétri stériles.

NB :

Tous ces milieux sont préparés en respectant les conditions d'asepsies.

En cas de nécessité, ces derniers sont séchés au séchoir pendant quelques minutes avant usage.

Les géloses excédentaires sont stockées au réfrigérateur dans des sachets hermétiquement fermés pour éviter le dessèchement, l'oxydation des géloses au sang frais et les contaminations.

5.2. Préparation des solutions d'antibiotiques

➤ **Utilisées pour l'antibiogramme**

-Pour chaque antibiotique, le poids correspondant à la concentration définie est pesé puis dissout dans le volume correspondant d'eau distillée. Les solutions sont conservées au réfrigérateur à +4°C. Les antibiotiques préparés et leurs concentrations sont présentés ci-dessous :

Tableau 4 : Concentrations des antibiotiques préparés.

ATB	AMP	AMC	CAZ	CTX	FOS	RIF	IMP	ERTA
Concentration (µg/ml)	10	20	30	30	200	5	10	10
Quantité pesée (mg)	10	20	30	30	200	5	10	10



Figure 40 : Différentes solutions d'antibiotiques préparées.

➤ Utilisées pour les CMI

- **Préparation de la solution de colistine** ; sous sa forme commerciale, ce médicament correspond à un sel : le Colistiméthate de Sodium et est exprimé en unité internationale, alors qu'en routine, elle est testée sous forme de colistine base et est exprimée en microgrammes. Les formules suivantes permettent la conversion :

1M UI de colistiméthate de sodium \longrightarrow 80 mg de colistiméthate de sodium \longrightarrow 34 mg de colistine de base

-Une solution primaire de 3,4 mg/ml est préparée à partir d'un flacon de Colistiméthate de sodium de 1M UI qui équivaut à un poids de 80 mg soit 34 mg de colistine base.

-A partir de cette solution primaire, une solution mère de 1024 μ g/ml est préparée suivi d'une gamme de dilution.

- **Préparation de solution de pénicilline**

La formule de conversion :



1 UI de pénicilline G sodique  **0,6 µg de pénicilline G sodique**

Nous préparons une solution de 60 mg/ml, à partir d'un flacon de pénicilline G sodique de 1M UI qui est l'équivalent de 600 mg de pénicilline sodique.

A partir de cette solution, nous préparons une solution mère de 1024µg/ml, suivi d'une gamme de dilution.

- **Préparation de la solution d'ampicilline et de vancomycine**

Une quantité de 10,24 mg de poudre d'antibiotique (ampicilline ou vancomycine) est pesée et dissoute dans 10ml de l'eau distillée stérile pour obtenir une solution mère à 1024µg/ml qui servira pour la préparation de gamme de dilution.

5.3. Contrôle qualité

Le contrôle qualité permet de garantir : la précision et la fiabilité de la technique des tests de sensibilité, la performance des réactifs utilisés dans les tests et la performance du personnel qui effectue les tests et la lecture.

5.3.1. Contrôle de milieux de culture

Caractères macroscopiques

Ça consiste à vérifier :

- la régularité de la surface : répartition homogène de gélose sur la boîte pétri. (l'écoulement doit être fait sur plan strictement horizontal).
- la couleur : chaque milieu a une couleur spécifique qui doit être vérifiée. (ex : jaune pâle pour gélose MH simple et rouge vif pour MH au sang frais).
- l'épaisseur : elle doit être 4mm+/- 0.5 ce qui correspond à une quantité de 20 ml de MH pour une boîte de pétri de 90 mm de diamètre.

Stérilité

Les milieux de culture conformes macroscopiquement sont incubés à 37° pendant une nuit. Le milieu stérile est vérifié par l'absence d'une éventuelle poussée d'un contaminant.



Fertilité

Consiste à vérifier la capacité d'un milieu de culture à récupérer quantitativement certains micro-organismes cibles.

Sélectivité

Consiste à vérifier la capacité d'un milieu de culture à favoriser la croissance de certains micro-organismes spécifiques cibles au détriment de certains micro-organismes non cibles.

5.3.2. Contrôle des antibiotiques

➤ Contrôle des solutions d'antibiotiques

Les solutions d'antibiotique préparées sont contrôlées chaque jour par la réalisation de l'antibiogramme avec :

- *E.coli* ATCC 25922 : AMP, AMX, AMC, IMP, ERT, CAZ, CTX, FOS, RIF.
- *P.aeruginosa* ATCC 27853 : IMP, ERT, CAZ, CTX.
- *S.aureus* ATCC 25 : AMP, AMX, AMC, ERT, CTX, RIF, FOS.

La lecture des diamètres d'inhibition lus dans les 10 jours suivants leur préparation a révélé qu'ils sont toujours maintenus dans l'intervalle de conformité.

Au-delà de 10ème jour, nous remarquons que les diamètres commencent à présenter des perturbations et certaines solutions présentent aussi un changement de couleur (AMC).

Après ce contrôle nous avons déduit que la stabilité de ces solutions d'antibiotiques préparées est 10 jours.

➤ Contrôle des disques d'antibiotiques :

- Avant d'utiliser toute cartouche d'antibiotique, il faut vérifier la date de péremption, surtout pour les β -lactamines, ainsi que la charge des disques.
- Le stock de cartouches d'antibiotiques doit être conservé, à -20°C , les cartouches dans leurs étuis correctement rebouchés. Les applicateurs, munis de cartouches d'antibiotiques sont conservés à $+4^{\circ}\text{C}$.
- Tout disque mouillé, ou ayant été directement au contact de la glace, ou bien encore conservé à température ambiante ne devrait pas être utilisé.
- Les cartouches doivent être retirées du congélateur 1 à 2 heures avant leur utilisation



- Chaque nouveau lot de disques d'antibiotique arrivé est soumis à un contrôle de qualité avec les ATCC : *E.coli* ATCC 25922. *P.aeruginosa* ATCC 27853. *S.aureus* ATCC 25.
- Les diamètres mesurés sont comparés aux diamètres critiques. Voir annexe 7.

5.3.3. Contrôle des ATCC

Nous le faisons de façon hebdomadaire, en les réisolant chacune sur son milieu adéquat, et en leur réalisant un antibiogramme de contrôle dont les diamètres mesurés sont comparés aux diamètres de référence.

Elles sont conservées au réfrigérateur à -4°C pendant une semaine.

5.4. Étude de la sensibilité bactérienne aux antibiotiques

5.4.1. Test de diffusion de disque

➤ Technique

A partir d'une culture visible et pure de 24H, nous réalisons une suspension bactérienne avec de l'eau physiologique de turbidité 0,5 de Mc Farland (mesurée à l'aide de spectrophotomètre) qui doit être utilisée de préférence dans les 15 min suivantes sa préparation.

A l'aide d'un écouvillon stérile, nous ensemençons la suspension bactérienne sur la gélose MH simple employée pour les bactéries non exigeantes (les entérobactéries, *Pseudomonas spp*, *Acinetobacter spp*, *Staphylococcus spp*) et la gélose MH au sang pour les bactéries exigeantes (*Streptococcus spp*). L'ensemencement se fait sur la totalité de la surface de la gélose dans trois directions ou à l'aide de l'ensemenceur rotatif.

Après l'ensemencement, nous déposons sur la gélose des disques d'antibiotiques appropriés pour chaque germe (voir annexe 8) ou des solutions d'ATB dans des trous préalablement réalisés (ces solutions sont utilisées à la place du disque en cas de rupture, péremption ou inadéquation révélé par les tests de contrôle)

Le nombre de disques maximale par boîte est de sept pour les bactéries non exigeantes et cinq pour les exigeantes

L'incubation se fait en respectant les conditions recommandées pour chaque bactérie (voir annexe 8)



➤ La lecture

A l'aide de la lampe, on mesure les diamètres des zones d'inhibition, lus à l'œil nu, au millimètre le plus proche avec un pied à coulisse. Pour les bactéries sur MH simple, les diamètres sont pris au fond des boîtes fermées, pour les bactéries sur MH au sang, ils sont pris à partir de boîtes ouvertes et bien éclairées.

Devant l'apparition des colonies au niveau de zone d'inhibition :

- Soit on effectue des tests d'identification (états frais, test d'oxydase, catalase) à fin de distinguer une éventuelle contamination.
- Soit on ne prend pas en considération, c'est le cas de fosfomycine avec les entérobactéries et les staphylocoques car la résistance acquise à la fosfomycine est homogène.

NB : Les souches suscitant des tests complémentaires sont conservées dans le milieu de conservation à base de lait à -20°C pour les réaliser ultérieurement.

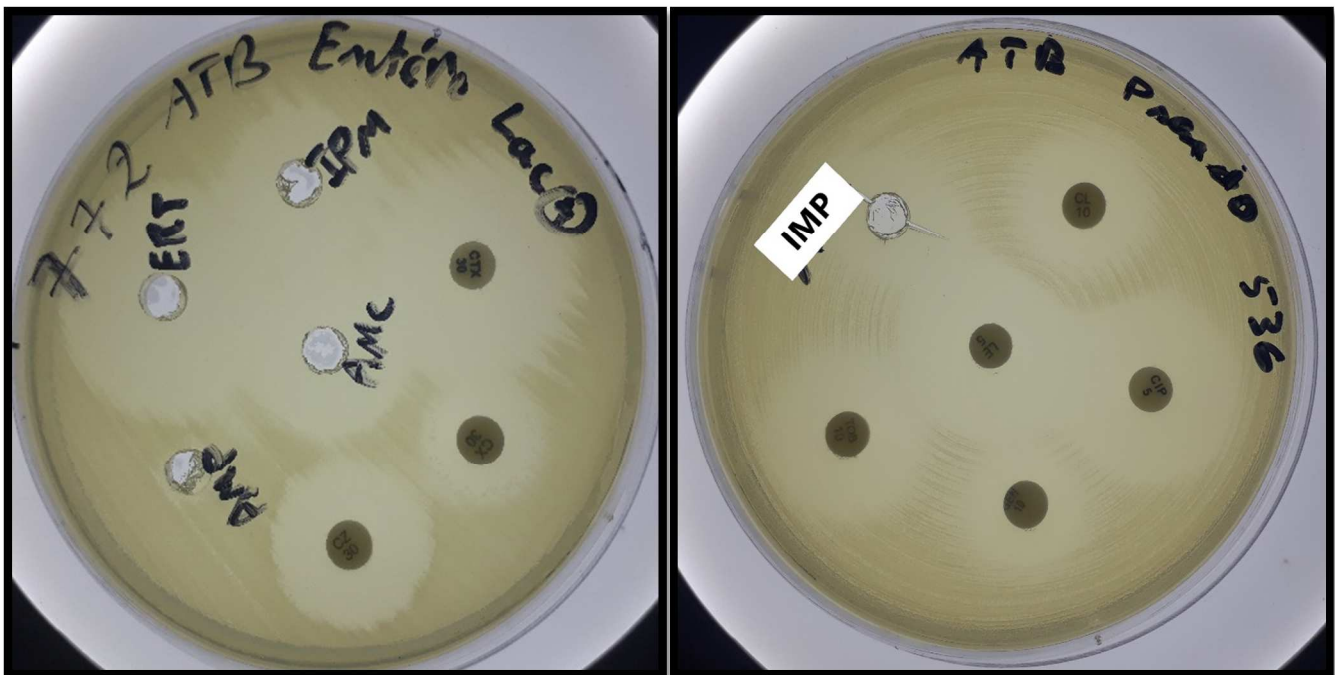


Figure 41 : Test de diffusion de disque à l'aide d'un écouvillon (à gauche) et de l'ensemencement rotatif (à droite).



Figure 42 : Test de diffusion de disque sur MH au sang frais.

5.4.2. Détermination de CMI

Pour la détermination de CMI, nous avons opté pour la méthode de dilution en milieu liquide sur des microplaques (la microdilution).

Nous déterminons la CMI de :

- Colistine pour les entérobactéries, *Pseudomonas spp* et *Acinetobacter spp*.
- Vancomycine pour *staphylococcus spp*.

La CMI de vancomycine n'était pas lancée avec les *Enterococcus spp* car toutes les souches ne présentaient pas les critères de suspicion d'une résistance aux glycopeptides.

- Ampicilline et pénicilline pour *streptococcus spp* autre que β -hémolytique.

Pour la technique suivie (voir annexe 9), sauf que, vu la non disponibilité de MHLAC, nous avons utilisé à sa place le milieu de l'hémoculture.

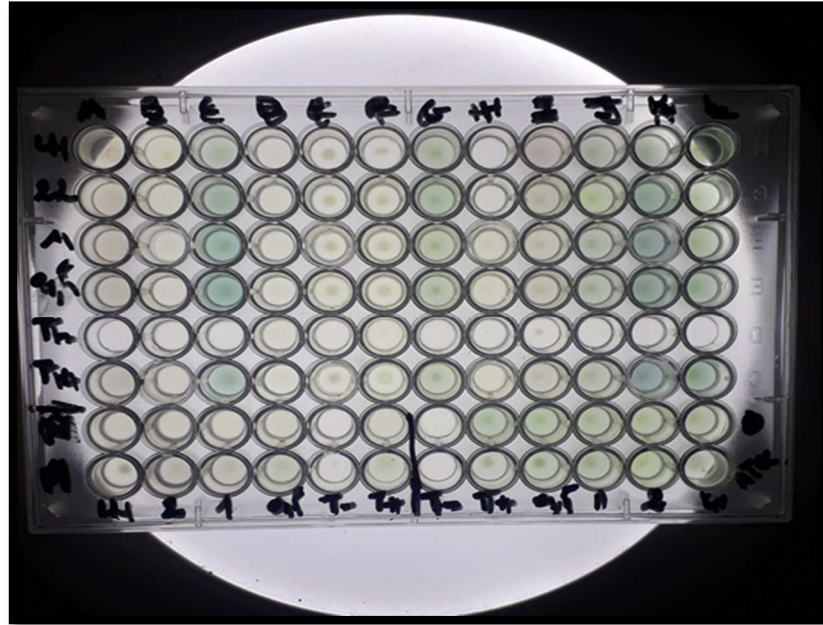


Figure 43 : Détermination de la CMI par microdilution.

5.4.3. Tests complémentaires

5.4.3.1. Recherche de bêta-lactamases

Les souches suspectées d'avoir une bêta-lactamase sont confirmées par le test de trèfle (technique voir annexe 10). La souche productrice de la β -lactamase, donnant lieu à un motif de trèfle.

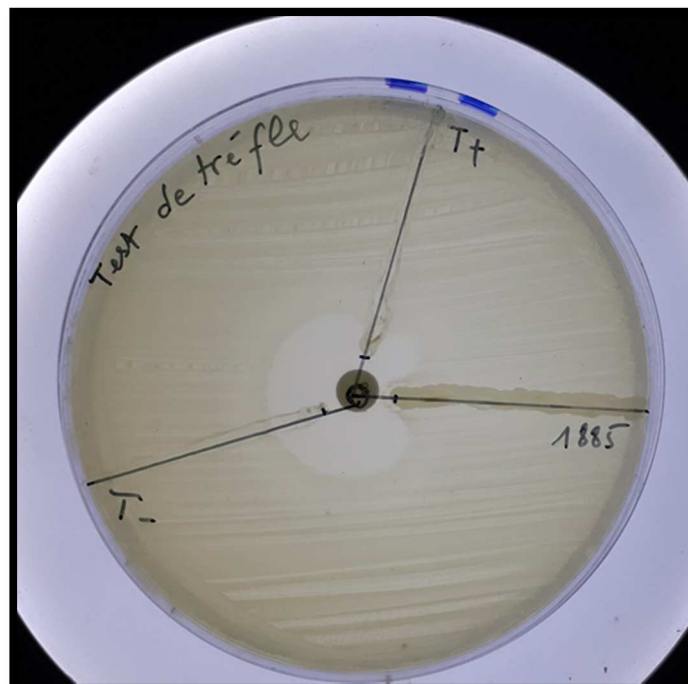


Figure 44 : Test de trèfle positif pour la souche *Staphylococcus aureus*.



5.4.3.2. Recherche de BLSE

Après la lecture interprétative de l'antibiogramme, les souches qui présentent les critères de suspicions d'une BLSE sont confirmées par les tests suivants :

5.4.3.2.1. Test synergie double disque

Nous déposons 10 μ L d'AMC (20/10 μ g) à 25 mm centre à centre d'un disque de AT (30 μ g), CRO (30 μ g), CTX (30 μ g) et/ou 10 μ l de CAZ sur la gélose MH préalablement ensemencée par la souche à tester puis l'incuber 18 à 24h à 35°C.

Le test est positif s'il y a apparition d'une image de synergie entre AMC et l'un des ATB testés.

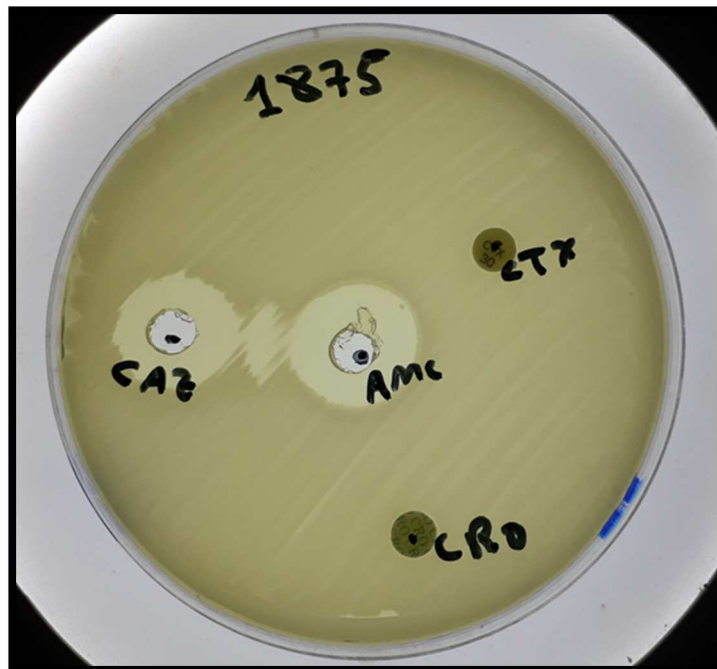


Figure 45 : Test de BLSE positif : apparition de l'image de synergie.

5.4.3.2.2. Test de disque combiné

La gélose est ensemencée par la souche à tester, puis, nous déposons l'AMC avec CTX (pour entérobactéries) ou la CAZ (pour Pseudomonas et Acinetobacter) à une distance de 25 mm.

Après l'incubation d'une heure à température ambiante, nous rajoutons du CTX ou CAZ dans le trou de l'AMC puis on incube les boîtes 18 à 24h à 37°C.

Le test est positif lorsque le diamètre autour de l'AMC et CTX (ou CAZ) est plus grand que le diamètre de CTX (ou CAZ) seul.



Figure 46 : Test de disque combiné positif.

5.4.3.2.3. Test de rapprochement

Un disque de CTX est déposé à différentes distances (10mm, 20mm et 25mm) de disque d'AMC sur une gélose MH préalablementensemencée par la souche à tester.



Figure 47 : Test de rapprochement positif.

5.4.3.2.4. Test à la cloxacilline

Ces trois tests précédents sont réalisés aussi sur le milieu MH additionné de cloxacilline afin d'inhiber la céphalosporinase hyperproduite qui entraîne l'apparition des phénotypes sauvages et faciliter la détection de BLSE.



Figure 48 : Test à la cloxacilline à gauche: sur MH simple, à droite sur MH-CLOXA : augmentation de diamètre autour C3G.

5.4.3.3. Recherche de carbapénèmase

Après la lecture interprétative de l'antibiogramme, les souches qui présentent les critères de suspicions de la production de carbapénèmase sont confirmées par les tests suivants :

5.4.3.3.1. Test de Hodge modifiée THM

Le mode opératoire est détaillé dans l'annexe 11.

Les souches productrices d'une carbapénèmase présentent un étranglement de la strie au voisinage du dépôt de disque d'antibiotique correspondant à une croissance de la souche de référence *E. coli* 25922, protégée par l'enzyme de la souche productrice testée.



Figure 49 : Test de Hodge modifié positif avec la souche *E. coli* (3a), T(+) : témoin positif /T(-) : témoin négatif.



5.4.3.3.2. Test de synergie

Nous déposons 10 μ L d'AMC à 25 mm centre à centre d'un disque de l'IMP sur la gélose MH préalablementensemencée par la souche à tester puis l'incuber 18 à 24 h à 35°C.

Le test est positif s'il y a apparition d'une image de synergie entre l'AMC et l'IMP.

5.4.3.3.3. Test à l'EDTA

Consiste à déposer 10 μ l d'imipenème seul et 10 μ l d'imipenème avec une goutte d'EDTA. Puis comparer les diamètres après incubation de 24H à 35°C. Ce test est positif si le diamètre apparu autour de l'imipenème + EDTA est plus grand de 3 à 5 mm que celui apparu avec l'imipenème seul.

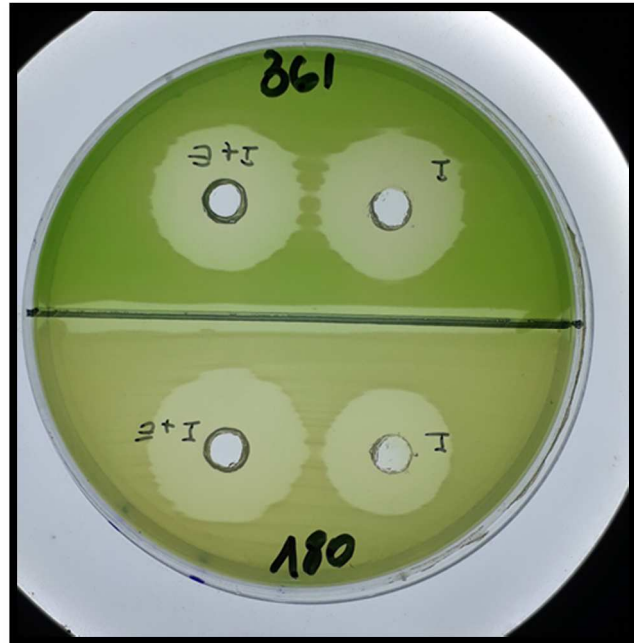


Figure 50 : Test de disque combiné.
Souche 180 : Test positif / 361 : Test négatif.

Ce test est aussi réalisé sur MH additionné de cloxacilline afin de différencier l'hyperproduction de céphalosporinase plus la perte de porine et la production de carbapénémases.

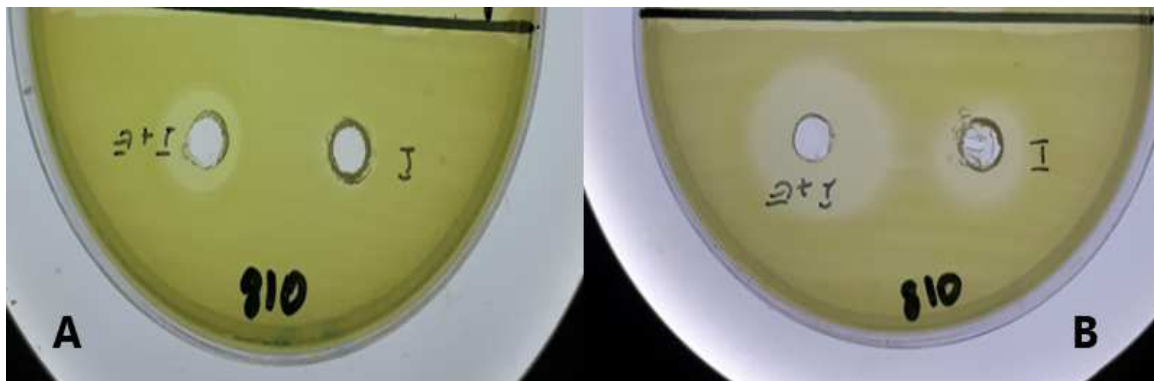


Figure 51 : Test de disque combiné (A) sur MH simple (B) sur MH-CLOXA.



5.4.3.4. Détection de la résistance inductible à clindamycine

Ca consiste à disposer un disque de clindamycine (2 μ g) et érythromycine (15 μ g) séparés d'une distance de 15 mm sur MH pour *staphylococcus spp* et MH au sang frais pour *streptococcus spp*.

Les résultats ont été interprétés comme suit :

- Phénotype MS : sensible à la clindamycine (diamètre de zone de l'inhibition >21mm) avec zone circulaire d'inhibition autour du disque.
- Phénotype iMLSB (résistance inductible) : sensible à la clindamycine avec une zone d'inhibition en forme de D autour du disque de clindamycine (aplatissement de la zone entre les deux disques).
- Phénotype cMLSB (résistance constitutive) : résistant à la clindamycine (diamètre de la zone de l'inhibition <14) avec une forme circulaire d'inhibition.



Figure 52 : Test « D » positif

5.4.3.5. Détection de *staphylococcus spp* résistant à la méthecilline par disque de céfoxitine

Ça consiste à déposer un disque de céfoxitine (30 μ g) sur la gélose MH préalablement ensemencée par la *staphylococcus spp* à tester.



Chapitre II : Résultats et Discussion



1 Vue globale de l'activité au laboratoire de microbiologie de l'hôpital Belloua

1.1 Les prélèvements (N=907)

Le nombre de prélèvements acheminés au laboratoire pour étude cyto bactériologique est de 907.

Les liquides céphalorachidiens, au nombre de 145, ne sont adressés que pour une étude cytologique.

Tableau 5 : La répartition des prélèvements reçus au laboratoire selon leur nature (N=907)

Type de prélèvement	L'effectif	Pourcentage (%)
Urines	596	65,71
Pus superficiels	104	11,47
Liquide de ponction des séreuses	99	10,92
Prélèvements vaginaux	36	3,97
Sécrétions broncho-pulmonaires	30	3,31
Hémoculture	17	1,87
Autres ponctions profondes	13	1,43
Drains thoraciques	12	1,32
Totale	907	100

A l'hôpital Belloua, La nature des prélèvements reçus reflète l'activité des services. Il regroupe des spécialités médico-chirurgicales « froides » et donc le laboratoire de microbiologie ne reçoit que très peu de prélèvements d'urgence comme les LCR et les hémocultures. De plus, il assure le traitement de prélèvements provenant de patients externes sans rendez-vous expliquant le nombre important des urines.



Chapitre II : Résultats et Discussion



1.2 La répartition des prélèvements selon leur provenance (N=907)

Tableau 6 : La répartition des prélèvements selon leur provenance (N=907)

SERVICES	EFFECTIF
Externes	327
Endocrinologie	195
Pneumologie	112
Neurologie	66
Rééducation	57
Rhumatologie	43
Dermatologie	25
Gynécologie	25
Chirurgie thoracique	19
Ophthalmologie	14
ORL	14
Réanimation	6
Oncologie	4
Totale	907

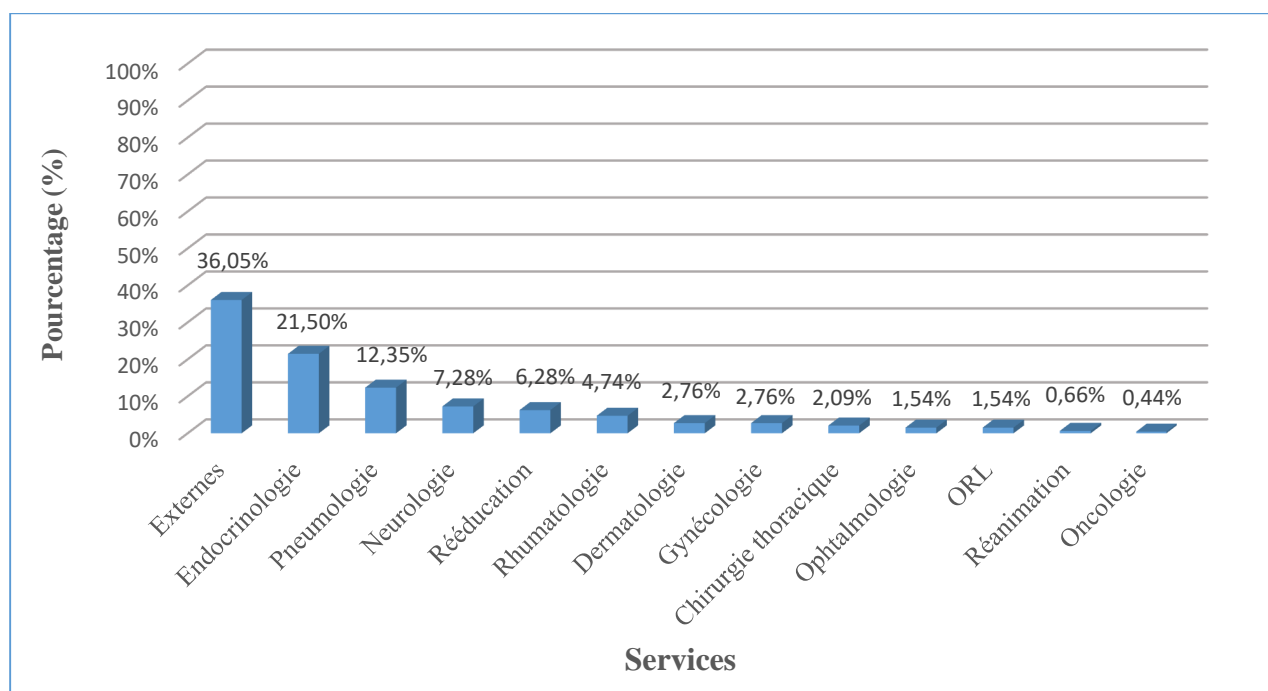


Figure 53 : La répartition des prélèvements selon leur provenance. (N=907)



Chapitre II : Résultats et Discussion



1.3 La répartition des prélèvements selon leur nature et leur provenance (N=907)

Tableau 7 : Tableau récapitulatif de la demande en analyses microbiologiques selon la provenance. (N=907)

Type de prélèvements Services	Urines	Pus superficiels	Liquide de ponction des séreuses	Prélèvements vaginaux	Sécrétions broncho-pulmonaires	Hémoculture	Autres ponctions profondes	Drains thoraciques	Total
Externe	235	33	36	17	1	0	5	0	327
	71,87%	10,09%	11%	5,20%	0,31%		1,53%		100%
Endocrinologie	162	13	2	18	0	0	0	0	195
	83,08%	6,67%	1,02%	9,23%					
Pneumologie	20	1	47	0	27	7	0	10	112
	17,86%	0,89%	41,96%		24,11%	6,25%		8,93%	100%
Neurologie	65	0	0	0	0	1	0	0	66
	98,48%					1,52%			100%
Rééducation	54	3	0	0	0	0	0	0	57
	94,74%	5,26%							100%
Rhumatologie	34	0	8	0	0	1	0	0	43
	79,07%		18,60%			2,33%			100%
Dermatologie	13	9	0	0	0	3	0	0	25
	52%	36%				12%			100%
Gynécologie	6	12	0	1	0	2	4	0	25
	24%	48%		4%		8%	16%		100%
Chirurgie thoracique	2	7	6	0	0	1	2	1	19
	10,53%	36,84%	31,58%			5,26%	10,53%	5,26%	100%
Ophthalmologie	0	14	0	0	0	0	0	0	14
		100%							100
ORL	2	9	0	0	0	1	2	0	14
	14,29%	64,28%				7,14%	14,29%		100%
Réanimation	2	1	0	0	2	0	0	1	6
	33,33%	16,67%			33,33%			16,67%	100%
Oncologie	1	2	0	0	0	1	0	0	4
	25%	50%				25%			
Total	596	104	99	36	30	17	13	12	907

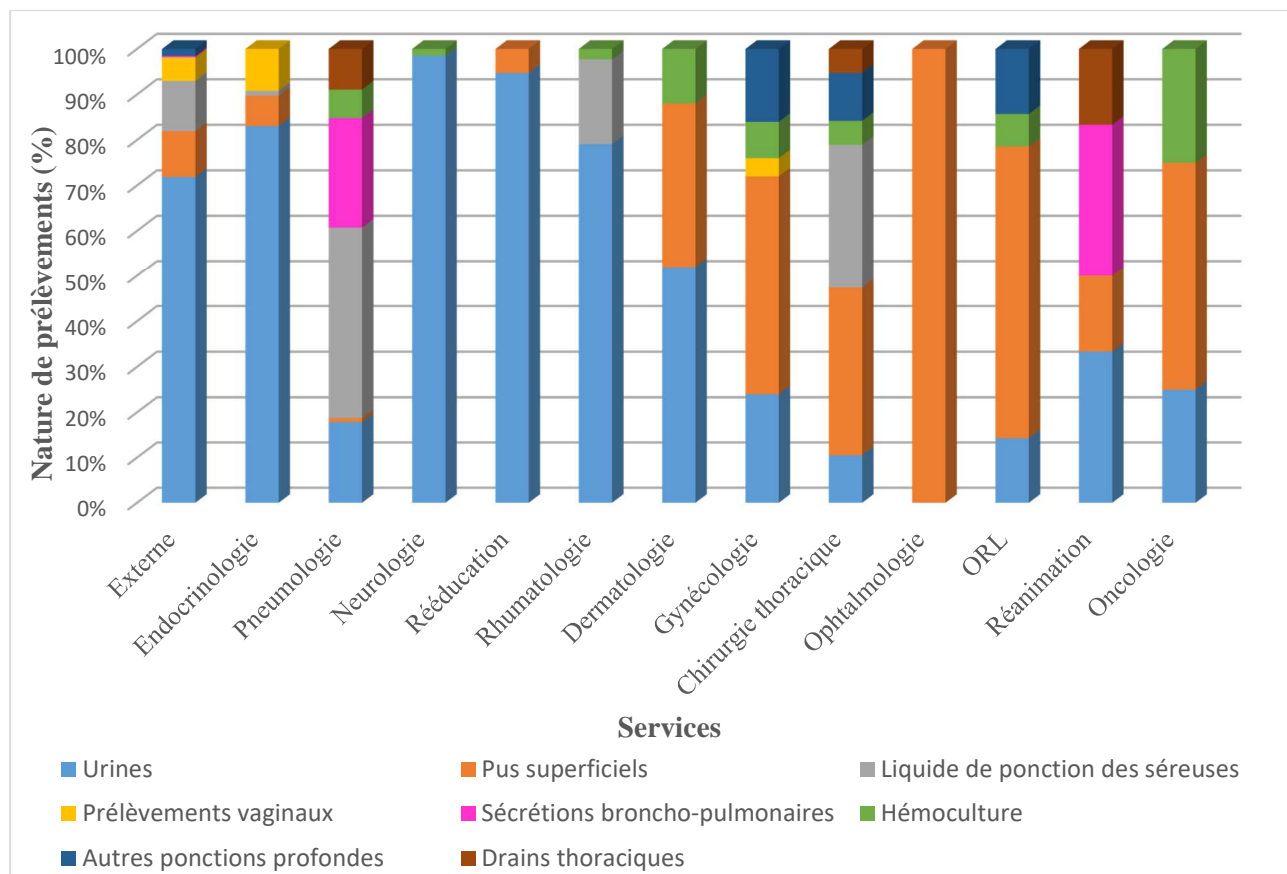


Figure 54 : La répartition des prélèvements selon leur nature et leur provenance. (N=907)

Les ECBU et les ECB des pus sont les deux prélèvements les plus demandés par les services médico-chirurgicaux de l'hôpital Belloua.

Nous observons une répartition reflétant l'activité des différents services.

1.4 La répartition de prélèvements selon le sexe et l'âge des patients (N=907)

Tableau 8 : La répartition de prélèvements selon le sexe et l'âge des patients. (N=907)

Nature de prélèvement \ Sexe	Adulte		Pédiatrique	
	Féminin	Masculin	Féminin	Masculin
Urines	353	215	16	12
Pus superficiels	62	38	2	2
Liquide de ponction des séreuses	47	50	2	0
Prélèvements vaginaux	35	0	1	0
Sécrétions broncho-pulmonaires	20	10	0	0
Hémoculture	6	11	0	0
Autres ponctions profondes	10	1	0	2
Drains thoraciques	0	12	0	0
Totale	533	337	21	16
	870		37	



2 Bilan de l'activité de la paillasse d'antibiogramme

2.1 Population de l'étude

Parmi 907 prélèvements dont la culture a été lancée, 200 ont nécessité un antibiogramme soit 22.05%.

2.2 Récapitulatif des positivités par prélèvements selon la provenance (N=907)

Tableau 9 : Récapitulatif des positivités par prélèvements selon la provenance. (N=907)

	Urines		Pus superficiels		Liquide de ponctions séreuses		Prélèvements vaginaux		Sécrétion broncho-pulmonaire		Hémoculture		Autres ponctions profondes		Drains thoracique	
	N	N+	N	N+	N	N+	N	N+	N	N+	N	N+	N	N+	N	N+
Externe	235	41	33	23	36	0	17	2	1	1	/		5	0	/	0
Endocrinologie	162	11	13	9	2	0	18	1	/		/		/		/	0
Pneumologie	20	3	1	0	47	0	/		27	6	7	1	/		10	12
Neurologie	65	8	/	/	/	/	/		/		1	0	/		/	0
Rééducation	54	19	3	3	/	/	/		/		/		/		/	0
Rhumatologie	34	2	/	/	8	0	/		/		1	0	/		/	0
Dermatologie	13	1	9	5	/	/	/		/		3	0	/		/	0
Gynécologie	6	3	12	5	/	/	1	0	/		2	0	4	0	/	0
Chirurgie thoracique	2	0	7	4	6	1	/		/		1	0	2	0	1	1
Ophtalmologie	0	0	14	3	/	/	/		/		/	/	/		/	0
O.R.L	2	1	9	5	/	/	/				1	0	2	0	/	0
Réanimation	2	1	1	1	/	/	/		2		/	/	/		1	1
Oncologie	1	0	2	2	/	/	/		/		1	0	/	0	/	0

- N : nombre total de prélèvements
- N+ : nombre de prélèvements positif



Chapitre II : Résultats et Discussion

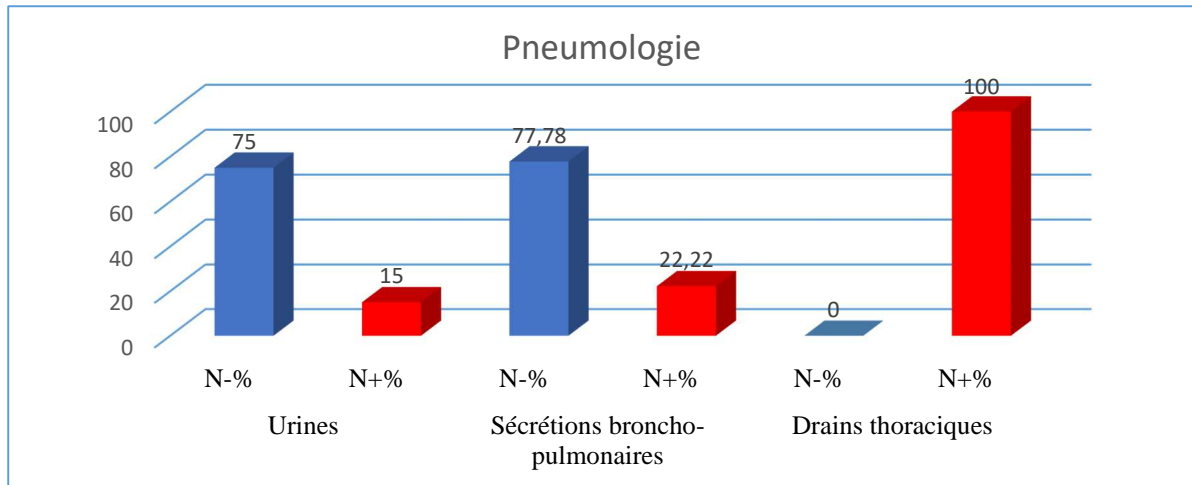


Figure 56 : Taux de positivité de prélèvements de service pneumologie.

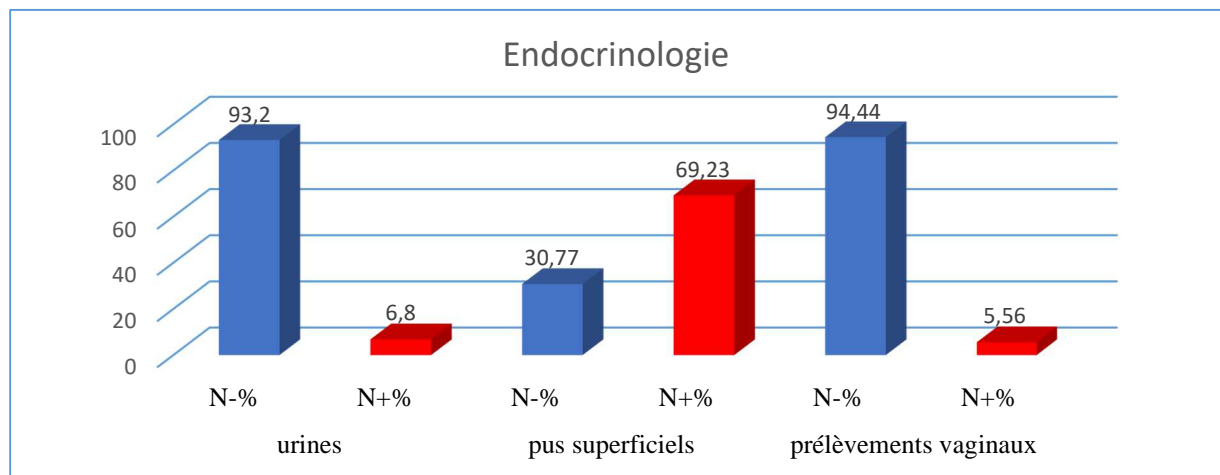


Figure 57 : Taux de positivité de prélèvements de service endocrinologie.

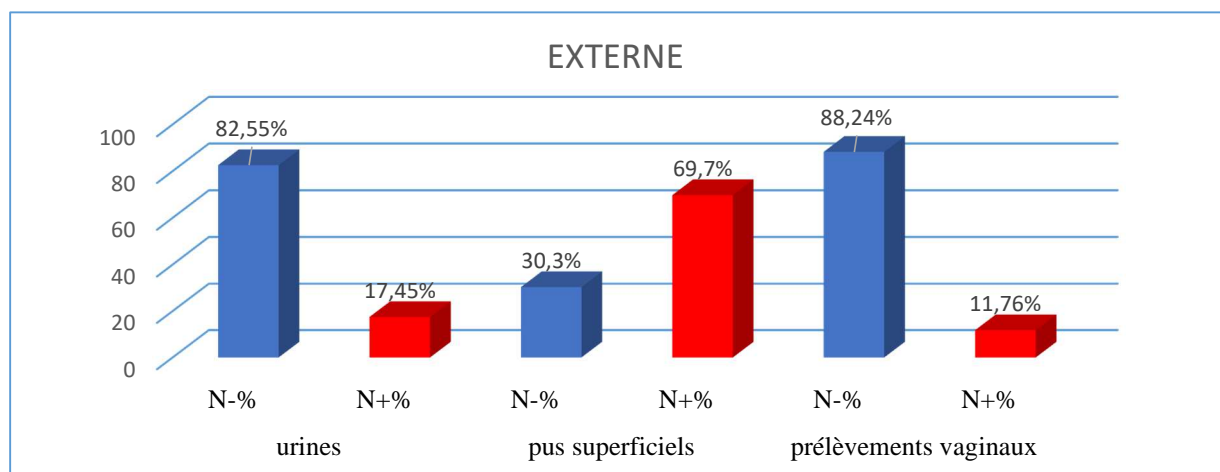


Figure 55 : Taux de positivité de prélèvements des patients externes.



2.3 Répartition de la population selon les souches bactériennes identifiées (N=200)

Tableau 10 : Différentes souches bactériennes identifiées. (N=200)

Micro-organisme	L'effectif	(%)
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	1	0,5
<i>Acinetobacter baumannii</i>	9	4,5
<i>Burkholderia cepacia</i>	1	0,5
<i>Citrobacter koseri (diversus)</i>	2	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	9	4,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	4	2
<i>Enterococcus faecium</i>	5	2,5
<i>Enterococcus sp.</i>	5	2,5
<i>Escherichia coli</i>	56	28
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	2	1
<i>Klebsiella aerogenes</i>	1	0,5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	1,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	2,5
<i>Klebsiella sp.</i>	2	1
<i>Morganella morganii</i>	3	1,5
<i>Proteus mirabilis</i>	11	5,5
<i>Providencia rettgeri</i>	1	0,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29	14,5
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	0,5
<i>Serratia marcescens</i>	1	0,5
<i>Serratia odorifera</i>	2	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	21	10,5
<i>Staphylococcus, coagulase negative</i>	8	4
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	0,5
<i>Streptococcus sp.</i>	14	7
<i>Streptococcus, beta-haemolytic</i>	2	1
<i>Streptococcus, non-haemolytic (gamma)</i>	1	0,5

Vu le faible effectif de certaines souches identifiées, nous les avons rassemblées dans des groupes comme le montre le tableau ci-dessous :



Chapitre II : Résultats et Discussion



Tableau 11 : La répartition de la population selon les souches bactériennes identifiées.
(N=200)

Les souches bactériennes	L'effectif	Pourcentage (%)
<i>E.coli</i>	56	28
<i>Proteus mirabilis</i>	11	5,5
<i>Kleibselle spp</i>	11	5,5
Autres entérobactéries	19	9,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29	14,5
<i>Acinetobacter baumannii</i>	9	4,5
Autres BGN non fermentaires	4	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	21	10,5
Staphylococcus coagulase négative	8	4
<i>Enterococcus spp</i>	14	7
<i>Streptococcus spp</i>	18	9
Totale	200	100

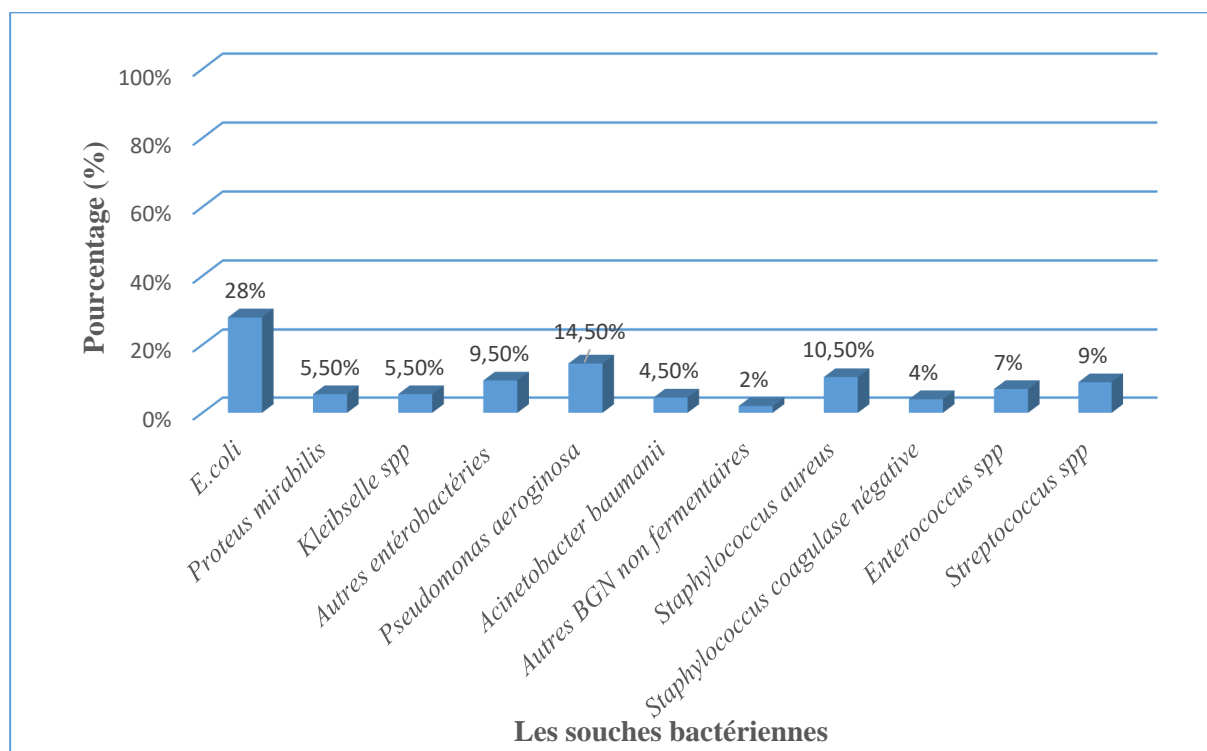


Figure 58 : La répartition de la population selon les souches bactériennes identifiées
(N=200).



Chapitre II : Résultats et Discussion



2.4 Répartition des bactéries identifiées selon le type de prélèvement (N=200)

Tableau 12 : Répartition des bactéries identifiées selon le type de prélèvement (N=200)

	Urines	Pus superficiels	Liquide de ponction des séreuses	Prélèvement vaginaux	Sécrétions broncho-pulmonaires	Hémoculture	Drains thoraciques	Total
<i>E.coli</i>	50	6	0	0	0	0	0	56
<i>Proteus mirabilis</i>	4	6	1	0	0	0	0	11
<i>Kleibelle spp</i>	8	3	0	0	0	0	0	11
Autres entérobactéries	3	12	0	0	1	1	2	19
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	12	0	0	4	0	6	29
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	3	0	0	2	0	3	9
Autres BGN non fermentaires	2	2	0	0	0	0	0	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	14	0	1	0	0	0	21
Staphylococcus coagulase négative	3	3	0	0	0	0	2	8
<i>Enterococcus spp</i>	6	7	0	0	0	0	1	14
<i>Streptococcus spp</i>	4	12	0	2	0	0	0	18
Total	94	80	1	3	7	1	14	200



Chapitre II : Résultats et Discussion



2.5 Répartition des bactéries identifiées selon leur provenance (N=200)

Tableau 13 : Répartition des bactéries identifiées selon leur provenance. (N=200)

	<i>E.coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Kleibella spp</i>	Autres entéro-bactéries	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Autres BGN non fermentaires	<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphylococcus coagulase négative	<i>Enterococcus spp</i>	<i>Streptococcus spp</i>
Externe	25	5	7	7	5	1	1	14	3	3	9
Rééducation	12	3	1	2	2	1	1	0	0	2	0
Endocrinologie	5	0	2	0	2	2	0	1	1	3	6
Pneumologie	2	0	0	3	9	5	0	1	2	0	0
Gynécologie	2	0	1	2	3	0	0	0	0	3	0
Chirurgie thoracique	0	2	0	3	3	0	0	0	0	0	0
Dermatologie	2	0	0	0	0	0	1	4	0	0	1
Neurologie	6	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
ORL	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0
Ophtalmologie	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	1
Réanimation	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Rhumatologie	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Oncologie	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Totale	56	11	11	19	29	9	4	21	8	14	18



3 Etude de profils de sensibilité aux antibiotiques des principaux groupes bactériens

3.1 Profil de sensibilité aux antibiotiques d'*E.coli* dans les prélèvements urinaires

➤ Chez les patients hospitalisés (N=23)

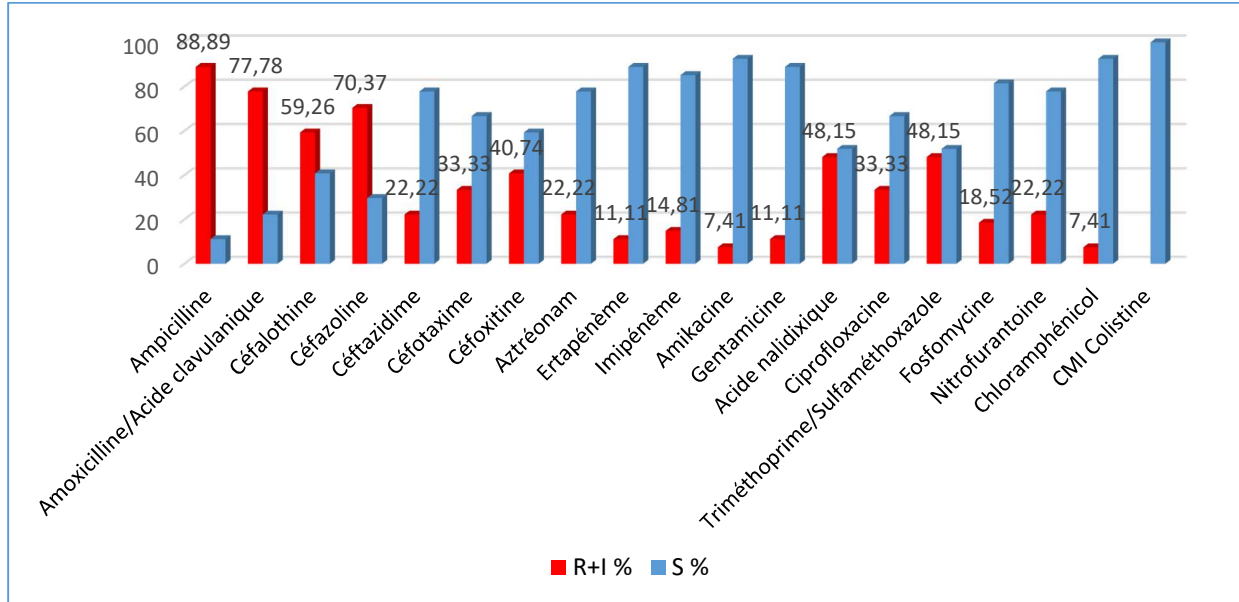


Figure 59 : Profil de sensibilité aux antibiotiques d'*E.coli* dans les prélèvements urinaires chez les patients hospitalisés (N=23).

➤ Chez les patients externes (N=27) :

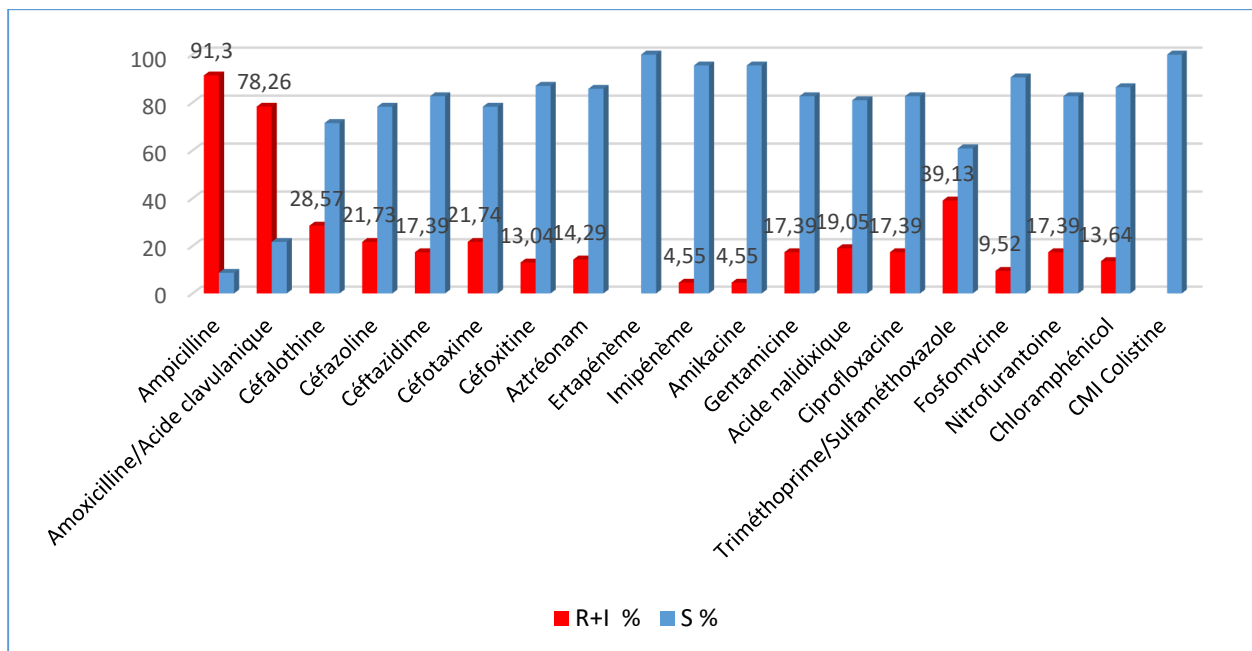


Figure 60 : Profil de sensibilité aux antibiotiques d'*E.coli* dans les prélèvements urinaires des patients externes (N=27).



- Nous remarquons que la résistance est plus élevée chez les patients hospitalisés par rapport aux patients externes notamment les céphalosporines, les carbapénèmes et les quinolones, le même cas est observé dans le rapport d'AARN de 2018. [113]
- Au milieu hospitalier, nos résultats sont globalement comparables avec ceux du rapport d'AARN 2018 à l'exception d'AMC, céfazoline et carbapénèmes qui sont plus élevés dans notre étude (AMC : 77,78%, CZ : 70,37%, IMP : 14,81% et ERT : 11,11% contre AMC : 52,23%, CZ : 7,12%, IMP : 0,54% et ERT : 0,69 %), et comparables aussi avec une étude menée au CHU Nedir en 2018, à l'exception de l' AMC, CEP et CX qui sont plus élevés dans notre étude. [113, 114]

Chez les patients externes, nos résultats sont globalement comparables avec ceux du rapport d'AARN 2018 et de l'étude de CHU Nedir, à l'exception d'AMP et d'AMC, qui sont plus élevés dans notre étude. [113, 114]

3.2 Profil de sensibilité aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients hospitalisés (N=24)

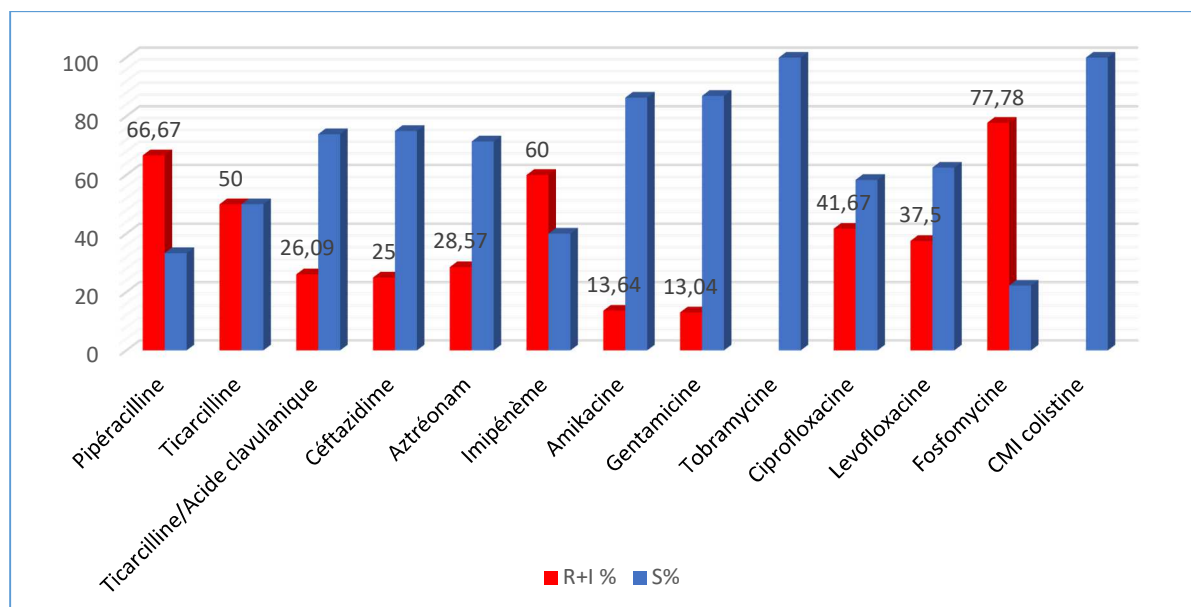


Figure 61 : Profil de sensibilité aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients hospitalisés (N=24)

Au milieu hospitalier, les résultats de notre étude sont globalement proches à celles de rapport national de 2018 et de l'étude de BOURAHLA et HADDACHE, à l'exception de



Chapitre II : Résultats et Discussion



tobramycine qui a un taux de résistance de 0%, alors que la pipiraciline, l'imipénème et les fluoroquinolones qui sont plus résistants dans notre étude. [113, 115]

3.3 Profil de sensibilité aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus*

➤ Chez les patients hospitalisés (N=7)

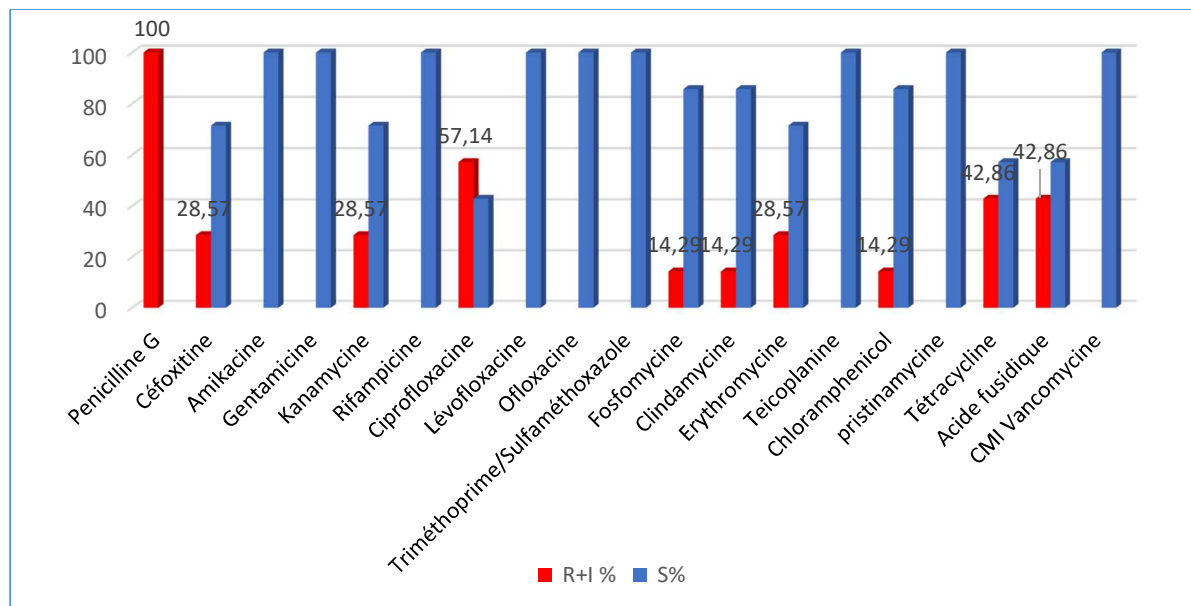


Figure 62 : Profil de sensibilité aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus* chez les patients hospitaliers (N=7)

➤ Chez les patients externes

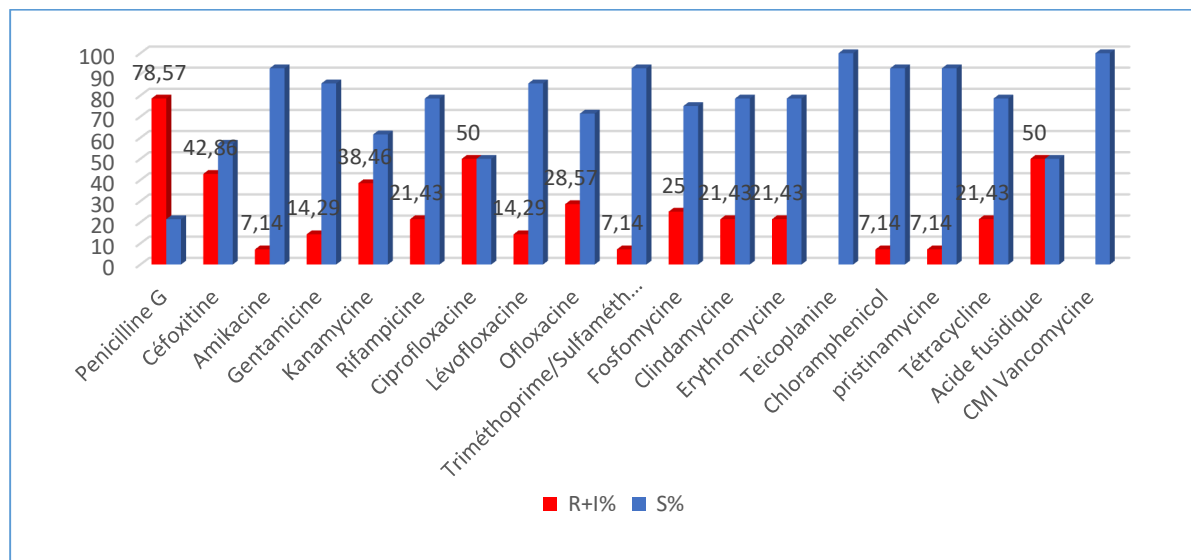


Figure 63 : Profil de sensibilité aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus* chez les patients externes (N=14)

Dans notre étude, SARM est plus élevé chez les patients externes qu'hospitaliers.



Au milieu hospitalier

- Nos résultats montrent que les antibiotiques suivants ne présentent aucune résistance : aminosides, rifampicine, cotrimoxazole, levofloxacin, ofloxacin et pristinamycine, ce qui ne concorde pas avec le rapport national de 2018 (aminoside \approx 30%, rifampicine : 8.24%, cotrimoxazole : 15,28%, levofloxacin : 18,92%, ofloxacin : 21% et pristinamycine : 6,23%) ni avec l'étude de KEBOUR et MELIANI. [113, 116]
- Nous remarquons un taux de résistance plus élevé de ciprofloxacine, par rapport au résultat national et à l'étude de KEBOUR et MELIANI.[113, 116]

Chez les patients externes

- Nos résultats sont comparables à ceux du rapport national de 2018 à l'exception de céfoxitine, rifampicine, ofloxacin, ciprofloxacine et clindamycine qui sont plus élevés dans notre étude.[113]

4 Résultats des tests complémentaires

Les résultats des tests complémentaires sont détaillés dans l'annexe 12.

➤ Chez *E.coli* :

Parmi 16 souches d'*E.coli* suspectées de production de BLSE et/ou carbapénémases :

- 6 souches sont suspectées de production de BLSE à qui nous avons lancé les tests de CDT, DDST et de rapprochement. Les résultats de ces tests ont montré que 4 souches sont des BLSE et céphalosporinases positives.
- 6 souches sont suspectées de production simultanée de BLSE et carbapénémases dont 4 sont BLSE et céphalosporinase positives et une est carbapénémase positive.

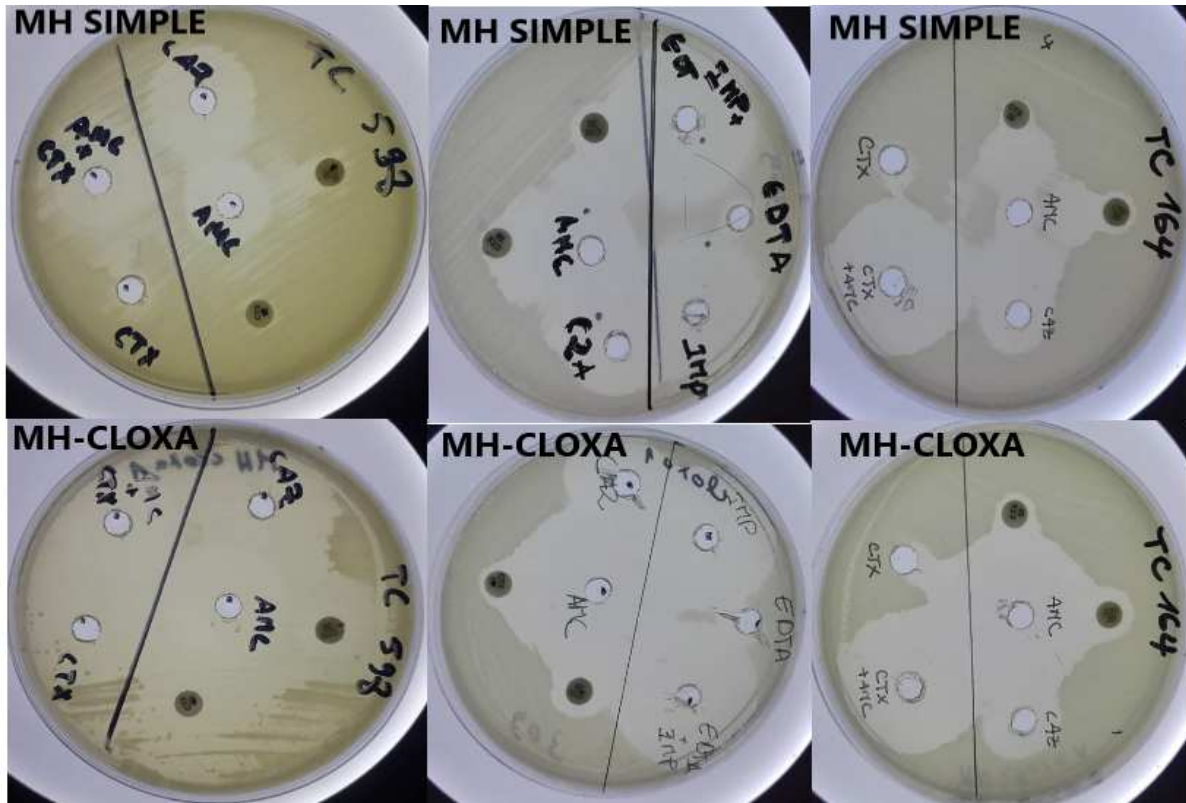


Figure 64 : Exemples des tests complémentaires d'*E.coli*

➤ **Chez *Klebsciella spp* :**

Parmi 7 souches susceptibles de production de BLSE, 4 tests sont lancés dont 3 sont revenus BLSE et céphalosporinases positifs.

➤ **Chez *Enterobacter cloacae***

Nous avons 3 souches de BLSE et céphalosporinase hyperproduite positives et une seule est céphalosporinase hyperproduite seulement.

➤ **Chez *Pseudomonas aeruginosa***

Parmi 5 souches suspectées de production BLSE et carbapénèmases :

- 3 souches sont BLSE et céphalosporinases positives.
- une céphalosporinse positive et présente la perte de porine.

Parmi 8 souches suspectées de production de carbapénèmases :

- 2 souches présentes la perte de porine et l'hyperproduction de céphalosporinase.
- 4 souches sont céphalosporinases.



➤ **Chez *Acinetobacter baumannii***

5 souches suspectées de production simultanée de BLSE et carbapénèmases et leurs résultats ont montré qu'il y a production de carbapénèmases et céphalosporinases.

➤ **Chez *Staphylococcus aureus***

Parmi les 18 souches de *S.aureus* à qui nous avons lancé le test de trèfle, 77% sont positifs. Donc il y a production de β -lactamases.

➤ **Chez *Enterococcus spp***

Parmi 14 souches à qui nous avons lancé le test de trèfle, une seule souche est positive.

Conclusion et recommandations



Conclusion et recommandations

Une paillasse d'antibiogramme a pour objectif principal final de rendre un résultat complet et fiable au clinicien pour qu'il puisse traiter correctement et efficacement son patient.

Pour ce faire, un travail sérieux et continu répondant aux normes de standardisation de l'antibiogramme de sociétés savantes doit être suivi.

La mise en place de notre paillasse d'antibiogramme au laboratoire de Belloua est venue dans ce sens apporter son plus, et a réussi à :

- Résoudre le problème de pénurie de certains disques d'antibiotiques en les remplaçant par les solutions préparées d'antibiotiques.
- Améliorer la qualité des résultats en introduisant le contrôle qualité.
- introduire les CMI et les tests complémentaires pour des résultats plus précis.
- Faciliter la manipulation en introduisant de nouveaux appareillages.
- Economiser les dépenses en recyclant certains outils et matériels.
- Donner une idée sur l'état de résistance à l'hôpital Belloua pendant la période d'étude.

Cependant, la survenue de la Covid-19 a empêché l'acheminement de l'étude jusqu'au bout en :

-réduisant la durée de l'étude qui a son tour réduisait l'effectif recensé de bactéries limitant ainsi l'étude de profils de sensibilités de certains germes.

-entravant la réalisation d'autres objectifs dont la formation du personnel de laboratoire, le changement de la fiche de résultats en se basant sur le stewardship et l'amélioration de la relation clinicien-microbiologiste.

Ces limites engendrées par la covid-19 se sont rajoutées aux autres limites aussi handicapantes à savoir le manque de matériels et le manque de communication avec les prescripteurs.



Au terme de cet humble travail, nous nous permettons d'émettre quelques recommandations pratiques :

- ❖ Il est primordial de se référer aux recommandations de standardisation algérienne de l'antibiogramme.
- ❖ Il faut bien organiser le travail de façon à le faciliter et ne pas être pris par le temps :
 - Commencer toujours par les tests qui prendront plus de temps et faire autre chose entre temps.
 - S'assurer toujours que la quantité des milieux est suffisante pour le travail du lendemain, sinon les préparer la veille.
 - Ranger les antibiotiques de chaque germe ou groupe de germes dans un panel a part pour faciliter leur utilisation.
 - Il est conseillé de faire un cahier de paillasse pour y enregistrer tous les résultats.
- ❖ Il faut conserver les souches qui n'auront pas de tests complémentaires le jour même dans le milieu de conservation à base de lait pour pouvoir les réisoler au temps voulu et avoir des cultures fraîches.
- ❖ Il est conseillé de préparer tout le matériel dont vous avez besoin avant de commencer le travail pour ne pas être perturbé surtout pour les CMI en microplaques qui demandent beaucoup de concentration.
- ❖ La détermination de la CMI en milieu liquide est la méthode de référence, cependant, pour de grandes séries, la détermination en milieu gélosé (pour les germes diffusables sur gélose) est plus pratique et moins laborieuse.
- ❖ Il faut veiller à la vérification régulière des dates de péremption des disques d'antibiotiques et de leur disponibilité pour pouvoir faire leur commande à temps.
- ❖ Il est préférable de mettre les milieux de cultures qui seront conservés au réfrigérateur dans des sachets hermétiquement fermés pour éviter le dessèchement, l'oxydation des géloses au sang frais et les contaminations.
- ❖ Il est préjudicieux de favoriser le recyclage et l'économie de matériels en utilisant le dos de pipettes pasteur déjà utilisées pour la réalisation des trous des solutions d'antibiotiques ,en lavant, stérilisant et réutilisant les embouts, les flacons et les tubes.



Conclusion et recommandations



- ❖ Il est conseillé de favoriser l'ensemencement rotatif en cas de charge de travail pour gagner plus de temps.
- ❖ Il est préférable d'utiliser une source de lumière (lampe) pour faciliter la lecture des tests de diffusion de disques notamment pour les MH au sang.
- ❖ Il faut bien mélanger les solutions d'antibiotiques avant de les utiliser et veiller à ne pas les contaminer.

En perspective, la perpétuité de ce travail est conditionnée par la volonté du personnel du laboratoire à adopter l'idée de centralisation de la paillasse d'antibiogramme et pousser encore loin ses objectifs et perspectives, car toujours, "là où il y a une volonté, existe un chemin".

Annexe

Annexe 1 : Classification des bêta-lactamases.

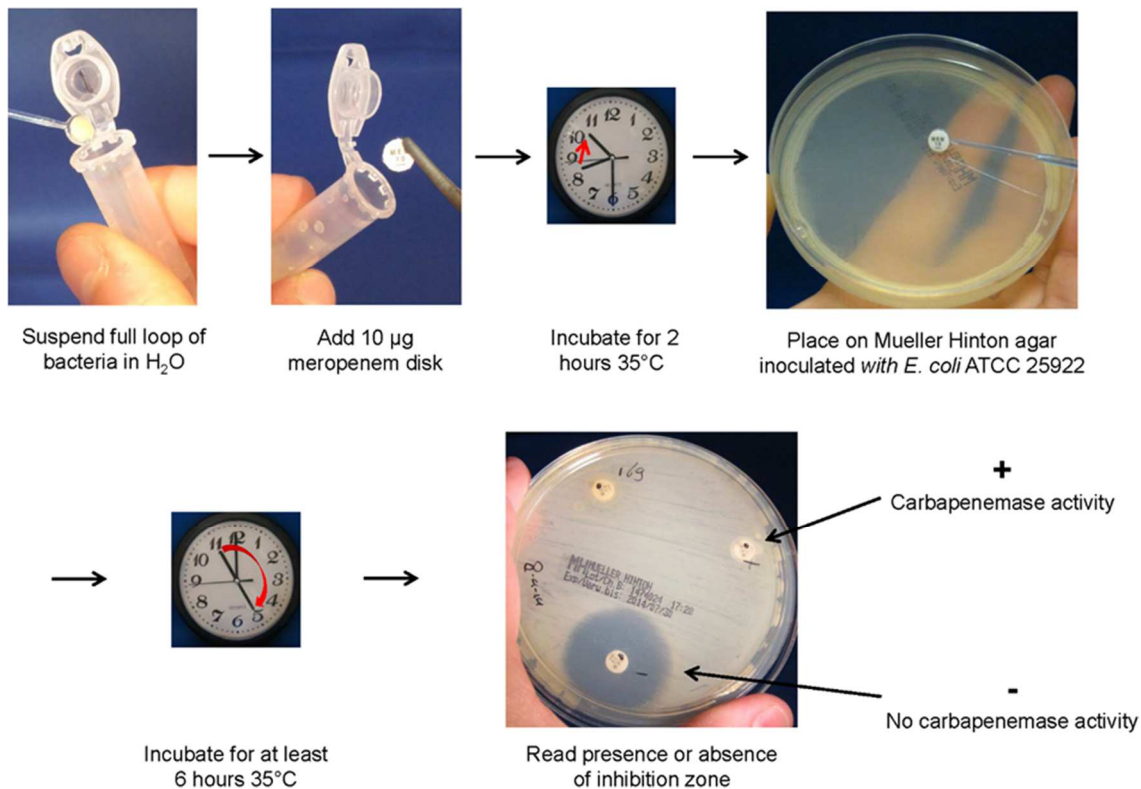
Type	Bush	Ambler	Giske	Inhibiteur	Exemple
Céphalosporinase de type AmpC	1	C	ESBL _{M-C}	Cloxacilline	AmpC des entérobactéries du groupe 3 et leurs dérivés plasmidiques
Pénicillinase des bactéries Gram positifs	2a	A	–	Clavulanate	Pénicillinase de <i>Staphylococcus aureus</i>
Pénicillinase à spectre étroit	2b	A	–	Clavulanate	TEM-1, SHV-1
Bêta-lactamases à spectre élargi	2be	A	ESBL _A	Clavulanate	TEM-3, SHV-2, CTX-M, PER, VEB, GES (170Gly)
Pénicillinases résistantes aux inhibiteurs	2br	A	–	–	TEM-30
Complex mutant TEM	2ber	A	ESBL _A	–	TEM-50
Carbénicillinases	2c	A	–	Clavulanate	PSE-1
Oxacillinases	2d	D	–	–	OXA-1
Céfuroximasés	2e	A	–	Clavulanate	Céphalosporinase de <i>Proteus vulgaris</i>
Carbapénémases	2f	A	ESBL _{CARBA-A}	Clavulanate	KPC, GES (170Ser et 170Asn)
Métallo-bêta-lactamases	3	B	ESBL _{CARBA-B}	EDTA	VIM, IMP
Autres bêta-lactamases non classées	4	–	–	–	Pénicillinase de <i>Burkholderia cepacia</i>

Annexe 2 : Classification des systèmes de transporteurs et leurs fonctions.

N°	Transporteur	Position	Types d'ATB à extruder	Résistance	Autres fonctions
01	SMR	Membrane interne	Céphalosporines, aminoglycosides, érythromycine, ampicilline, tétracyclines, amikacine, vancomycine, etc	Bactéries gram positif et gram négatif.	Extruder, bromure d'éthidium, proflavine, safranine, etc.
02	MFS	Membrane interne	Tétracycline, quinolones, chloramphénicol, fluoroquinolones, méthicilline, etc.	Bactéries gram positif et gram négatif.	Ion métallique comme le cuivre, l'argent, etc
03	MATE	Membrane interne	Norfloxacine, ciprofloxacine, chloramphénicol, kanamycine, ampicilline, fluoroquinolones, aminoglycosides, etc.	Bactéries gram positif et gram négatif.	/
04	ABC	Tripartite (intégrée dans les protéines)	Bacitracine, colistine, norfloxacine,	Bactéries, plantes et animaux.	Toxines et autres antimicrobiens.

		internes, externes et de fusion)	tétracycline, aminoglycosides, macrolides, etc.		
05	RND	Tripartite (intégrée dans les protéines internes, externes et de fusion)	β -lactames, céphalosporines, fluoroquinolones, macrolides, chloramphénicol, tétracyclines, novobiocine, acide fusidique, oxazolidinones et rifampicine, etc.	Bactéries gram négatif uniquement.	Détergents tels que Triton X-100, dodécyl sulfate de sodium, sels biliaries et désinfectants, violet cristal, bromure d'éthidium...
06	PACE	Membrane interne	Chlorhexidine et acriflavine	Bactéries gram négatif uniquement	/

Annexe 3 : Technique suivie dans la méthode d'inhibition de carbapénème « MIC »



Annexe 4 : Autres méthodes de détection de bêta-lactamases

1-Test de Masuda double disque

Dans ce test, *E. coli* ATCC 25922 a été tamponné sur la boîte et un disque de pénicilline (10 U) a été placé au centre. Des disques de papier filtre contenant la souche à tester ont été placés à 10 mm du disque central. La distorsion de l'inhibition autour du disque placé au centre par les disques contenant la souche à tester indique une production de β -lactamase positive.

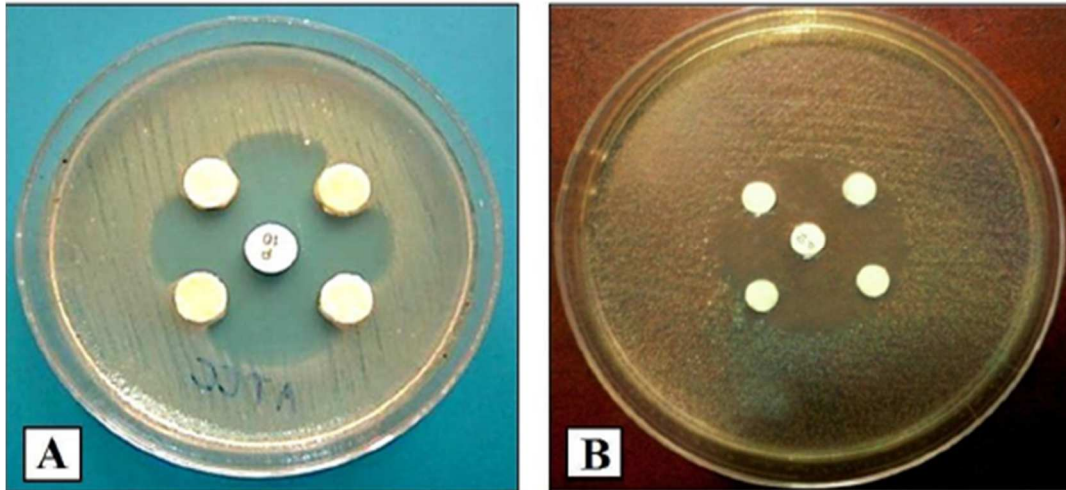


Figure 1 : test de Masuda. A) résultat positif pour la production de β -lactamase donnant lieu à une distorsion de l'inhibition autour du disque central [pénicilline (P 10U)]; (B) L'absence d'une zone d'inhibition irrégulière a été considérée comme un résultat positif.

2-Méthode iodométrique

L'hydrolyse de la pénicilline produit de l'acide pénicilloïque, qui réduit l'iode, décolorant le complexe amidon-iode. Cette réaction peut être exploitée pour détecter l'activité β -lactamase dans des tubes ou sur des bandes de papier. Ces tests sont particulièrement sensibles pour la pénicillinase staphylococcique, mais sont moins sensibles que la nitrocéfine pour la plupart des β -lactamases des bactéries Gram-négatives.

Annexe 5 : Signes indicateurs pour la détermination des CMI de vancomycine chez staphylocoques :

	Suspicion de résistance à au moins un des glycopeptides
Diffusion en milieu gélosé	-Diamètre d'inhibition < 17 mm autour du disque de l'un des deux glycopeptides. -Diamètre d'inhibition autour du disque de téicoplanine inférieur d'au moins 3 mm à celui de la vancomycine. -Quelques colonies présentes dans la zone d'inhibition de l'un des deux glycopeptides.
Automates	-Catégorisation « R » à au moins l'un des glycopeptides.
Tests particuliers	-Ensemencement d'une gélose Mueller-Hinton additionnée de 5 mg/L de téicoplanine, par dépôt de 10 µl d'une suspension 2 McFarland. -Ensemencement d'une gélose coeur-cerveau contenant 6 mg/L de vancomycine, par dépôt de 10 µl d'une suspension 0,5 McFarland.
	Suspicion d'hétéro-VISA (uniquement si la souche est catégorisée « S » à la vancomycine)
	-CMI de la vancomycine égale à 2 mg/L -Souche résistante à la méticilline, aux quinolones, à la rifampicine et à la gentamicine.

Annexe 6 : Méthode de dépistage et de confirmation de sensibilité diminuée aux glycopeptide chez *staphylococcus* spp

1-Détermination de CMI

La détermination de CMI se fait par méthode de microdilution en milieu liquide ou E-test. Il convient de noter que les résultats obtenus avec les méthodes de bande à gradient peuvent être 0,5 à 1 fois plus élevés que les résultats obtenus par microdilution en liquide.

La concentration critique selon EUCAST pour la résistance à la vancomycine chez *S. aureus* est la CMI > 2 mg / L. Les isolats avec des CMI confirmées > 2 mg / L (selon la microdilution en milieu liquide) doivent être référés à un laboratoire de référence. hVISA ne sera pas détecté par la détermination de MIC.

2-Test de dépistage à vancomycine

Sur une gélose BHI additionné de 6µg/ml vancomycine, 10 µl d'une suspension de turbidité égale à 0,5 Mac Farland est ensemencée ou à l'aide d'un écouvillon trempé dans la suspension et étalé sur une surface de 10-15 mm ou en stries.

L'interprétation se fait soigneusement sous la lumière transmise après incubation de 24h ; la présence de plus d'une colonie ou d'un léger film de croissance est considérée comme positif.

Ce test ne détecte pas de manière fiable toutes les souches de *S. aureus* intermédiaires à la vancomycine. Certaines souches pour lesquelles les CMI de la vancomycine sont de 4 µg / mL ne pousseront pas.

3-Test de dépistage à teicoplanine

Dix microlitres d'une suspension bactérienne de turbidité équivalente à 2 McFarland sont délivrés en spot sur la surface de la gélose MH contenant 5mg/l de teicoplanine. Apres

incubation de 24h à 48h à 35° C, la croissance des colonies indique une sensibilité diminuée aux glycopeptides.

4-Macro E-test

Des bandelettes E-test de vancomycine et teicoplanine sont déposées sur gélose BHI préalablement ensemencé par 200µl d'une suspension bactérienne de la souche à tester. Cette suspension a une turbidité équivalente à 2 McFarland.

Après une incubation de 48h, le test est positif si la CMI est supérieure ou égale à 8µg/ml pour la vancomycine et la teicoplanine ou la CMI de la teicoplanine seule est supérieure ou égale à 12µg/ml

Comme les deux critères incluent la teicoplanine, le test de la vancomycine pourrait dépendre du résultat du test de la teicoplanine. L'algorithme serait alors:

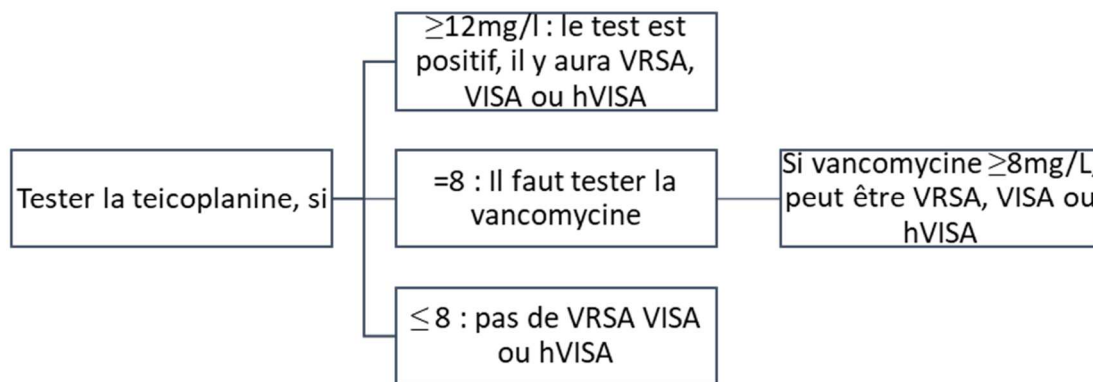


Figure 1 : Algorithme de detection des staphylococcus aureus de sensibilité diminuée aux glycopeptides.

Ce test était plus sensible (96%) et spécifique (97%) que l'Etest standard (82% et 93%, respectivement) pour la détection de GISA / hGISA.

Les lectures ne sont pas des CMI. De plus, le test ne fait pas la différence entre hVISA, VISA et VRSA.

5-Test PAP/AUC

Tout isolat de dépistage positif pour une sensibilité réduite et non identifié comme VRSA ou VISA par la détermination de la CMI peut être un hVISA et peut être étudié par analyse de population profil-aire sous la courbe (PAP-AUC).

Des colonies d'une culture d'une nuit sont diluées dans une solution saline et étalées sur la gélose BHI contenant 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8 mg/l de la vancomycine. Après incubation de 24 h à 37°C, les colonies ont été comptées. Log₁₀ CFU/ml ont été tracés par rapport à la

concentration de la vancomycine. Le graphique obtenu a été utilisé pour calculer l'air sous la courbe.

Un rapport entre l'AUC de la souche à tester et la souche Mu3 (souche de référence hVISA) qui interprété comme suit :

- Une ration $\leq 0,9$ indique VSSA
- Une ration entre 0,9 et 1,3 indique hISA
- Une ration $\geq 1,3$ indique VISA

Cette méthode prend du temps et ne peut donc pas être utilisée dans la plupart des laboratoires de routine.

Annexe 7 : Valeurs limites des diamètres des zones d'inhibition pour les souches de référence utilisées pour le contrôle de qualité.

Antibiotiques testes	Charge des disques	<i>E. coli</i> ATCC 25S22	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aeruginosa</i> ArCC27853
Aminocyclitol	30pg	19-26	20-26	18-26
Amoxicilline + Ac clavulanique	20/10ijg	18-24	28-36	—
Ampicilline	10pg	18-22	27-35	—
Azithromycine	15pg	—	21-28	—
Ac nalidixique	30pg	22-28	—	—
Aztreonam	30pg	28-36	—	23-29
Cefazoline	30pg	21-27	29-35	—
Cefalotine	30pg	15-21	29-37	—
Cefoxitine	30pg	23-29	23-29	—
Cefotaxime	30pg	28-35	25-31	18-22
Ceftriaxone	30pg	29-35	22-28	17-23
Ceftazidime	30pg	—	—	22-29
Ciprofloxacine	5pg	30-40	22-30	25-33
Colistine	10ijg	11-17	—	11-17
Chloramphenicol	30pg	21-27	19-26	—
Clindamycine	2µg	—	24-30	—
Doxycycline	30pg	18-24	23-29	Non determine
Ertapeneme	10ijg	29-26	24-31	13-21
Erythromycine	15pg	—	22-30	—
Fosfomycine	200ijg	22-30	25-33	Non determine
Furanes	300pg	20-25	18-22	—

Annexe 8 : Liste d'antibiotiques à tester pour chaque bactérie :

Bactéries non exigeants					Bactéries exigeants	
Milieu : gélose MH / Condition d'incubation : 35±2°C en aérobiose pendant 16 à 24 h					Milieu : gélose MH-F Condition d'incubation 35±2°C en présence de 4 à 6% CO ₂ en aérobiose pendant 16 à 24 h	
Entérobactéries	Pseudomonas spp	Acinetobacter spp	Staphylococcus spp	Enterococcus spp	Streptococcus spp. Groupe viridans	Streptococcus β- hémolytique
Ampicilline (10µg)	Ticarcilline (75µg)	Ticarcilline (75µg)	Pénicilline (10UT)	Ampicilline (10µg)	Pénicilline (CMI)	Pénicilline (10UT)
Amoxicilline + acide clavulanique (20/10µg)	Ticarcilline + acide clavulanique (75/10µg)	Ticarcilline + acide clavulanique (75/10µg)	Oxacilline (CMI)	Streptomycine (300µg)	Ampicilline (CMI)	Ampicilline (10µg)
Aztréonam (30µg)	Pipéracilline (100µg)	Pipéracilline (100µg)	Céfoxitine (30µg)	Gentamicine (120µg)	Céfotaxime (30µg)	Erythromycine (15µg)
Céfalotine (30µg)	Céftazidime (30µg)	Céftazidime (30µg)	Amikacine (30µg)	Erythromycine (15µg)	Pristinamycine (15µg)	Clindamycine (5µg)
Céfazoline (30µg)	Aztréonam (30µg)	Imipénème (10µg)	Gentamicine (10µg)	Furanes (300µg)	Tétracycline (30µg)	Pristinamycine (15µg)
Céfoxitine (30µg)	Imipénème (10µg)	Amikacine (30µg)	Kanamycine (30µg)	Tétracycline (30µg)	Gentamicine (CMI)	Tétracycline (30µg)
Céfotaxime (30µg)	Amikacine (30µg)	Gentamicine (10µg)	Erythromycine (15µg)	Vancomycine (30µg)	Vancomycine (30µg)	Ofloxacine (5µg)
Céftazidime (30µg)	Gentamicine (10µg)	Tobramycine (10µg)	Clindamycine (5µg)	Teicoplanine (30µg)	Rifampicine (30µg)	Lévofloxacine (5µg)
Imipénème (10µg)	Tobramycine (10µg)	Cotromoxazole (1,25/23,75µg)	Pristinamycine (15µg)	Ciprofloxacine (5µg)	Chloramphénicol (30µg)	Chloramphénicol (30µg)
Ertapénème (10µg)	Lévofloxacine (5µg)	Ciprofloxacine (5µg)	Ofloxacine (5µg)	Lévofloxacine (5µg)	Erythromycine (15µg)	Vancomycine (30µg)
Amikacine (30µg)	Ciprofloxacine (5µg)	Lévofloxacine (5µg)	Ciprofloxacine (5µg)	Rifampicine (5µg)	Ofloxacine (5µg)	Gentamicine (500µg)
Gentamicine (10µg)	Fosfomycine	Doxycycline (30µg)	Lévofloxacine (5µg)	Fosfomycine (200µg)	Lévofloxacine (5µg)	Rifampicine (30µg)
Acide nalidixique (10µg)	Colistine (10µg) (CMI)	Colistine (CMI)	Vancomycine (30µg) (CMI)	quinupristine-dalfopristine (15µg)	Clindamycine (5µg)	
Ciprofloxacine (5µg)			Teicoplanine (30µg)	Chloramphénicol (30µg)		
Colistine (CMI)			Fosfomycine (IV)			
Chloramphénicol (30µg)			Rifampicine (5µg)			
Cotromoxazole (1,25/23,75µg)			Cotromoxazole (1,25/23,75µg)			
Furanes (300µg)			Tétracycline (30µg)			
Fosfomycine (200µg)			Acide fusidique (10µg)			

Annexe 9 : Détermination de CMI par dilution en milieu liquide

N° tube ou cupule	Volume de la solution d'antibiotique à rajouter de la solution à 1024µg/ml	Concentration intermédiaire (µg /ml)	Volume MH supplémenté en sang ou non	Inoculum	Concentration finale/ tube ou cupule (vol final: 1ml/tube ou 100µl /cupule)
1	0,25ml (ou 25 µl /cupule)	512	0,70 ml (ou 70µl)	50µl /tube (ou 5µl /cupule)	128 µg/ml
2	0,25ml (ou 25 µl /cupule)	256	0,70 ml (ou 70µl)	50µl /tube (ou 5µl /cupule)	64 µg/ml
3	0,25ml (ou 25 µl /cupule)	128	0,70 ml (ou 70µl)	50µl /tube (ou 5µl /cupule)	32 µg/ml
4	0,25ml (ou 25 µl /cupule)	64	0,70 ml (ou 70µl)	50µl /tube (ou 5µl /cupule)	16 µg/ml
5	0,25ml (ou 25 µl /cupule)	32	0,70 ml (ou 70µl)	50µl /tube (ou 5µl /cupule)	8 µg/ml
6	0,25ml (ou 25 µl /cupule)	16	0,70 ml (ou 70µl)	50µl /tube (ou 5µl /cupule)	4 µg/ml
7	0,25ml (ou 25 µl /cupule)	8	0,70 ml (ou 70µl)	50µl /tube (ou 5µl /cupule)	2 µg/ml
8	0,25ml (ou 25 µl /cupule)	4	0,70 ml (ou 70µl)	50µl /tube (ou 5µl /cupule)	1 µg/ml
9	0,25ml (ou 25µl /cupule) de la solution à 4µg/ml	2	0,70 ml (ou 70µl)	50µl /tube(ou 5µl /cupule)	0,5 µg/ml
10	0,25ml (ou 25µl /cupule) de la solution à 2µg/ml	1	0,70 ml (ou 70µl)	50µl /tube (ou 5µl /cupule)	0,25 µg/ml
11	0,25ml (ou 25 µl /cupule)	0,5	0,70 ml (ou 70µl)	50µl /tube (ou 5µl /cupule)	0,125 µg/ml
12	0,25ml (ou 25 µl /cupule)	0,25	0,70 ml (ou 70µl)	50µl /tube (ou 5µl /cupule)	0,063 µg/ml
13	0,25ml (ou 25 µl /cupule)	0,125	0,70 ml (ou 70µl)	50µl /tube (ou 5µl /cupule)	0,032 µg/ml
14	0,25ml (ou 25 µl /cupule)	0,063	0,70 ml (ou 70µl)	50µl /tube (ou 5µl /cupule)	0,016 µg/ml
Témoin	0,25ml (ou 25 µl /cupule) d'eau physiologique		0,70 ml (ou 70µl)	50µl /tube (ou 5µl /cupule)	

Annexe 10 : Mode opératoire de test de Tréfle

-Ensemencer une souche de *S. aureus* ATCC 25923 sur une gélose MH pour *Moraxella catarrhalis* ou MH au sang cuit pour *N.gonorrhoeae* et *Haemophilus* spp.

-Appliquer un disque de pénicilline G au centre de la boîte dans le cas d'un *Staphylococcus* spp. ou *Neisseria gonorrhoeae* ou un disque d'ampicilline dans le cas d'*Haemophilus* spp., *Enterococcus* spp. ou *Moraxella catarrhalis*.

-Ensemencer en stries radiales (du centre de la boîte à la périphérie) la souche à tester, une souche témoin négatif (*S. aureus* ATCC 25923), une souche témoin positif (*S. aureus* ATCC 43300).

-Incuber la boîte 18h à 35°C en atmosphère normale ou 24h en atmosphère enrichie en CO₂ pour *Haemophilus* spp, et *N. gonorrhoeae*.

❖ Lecture et interprétation ;

La production de β- lactamase (pénicillinase) par la souche à étudier et la souche témoin positif induit la culture de la souche témoin négatif (sensible à la pénicilline) jusqu'au contact du disque d'ampicilline ou de pénicilline

Annexe 11 : Technique de test de Hodge modifié

-Souche révélatrice: *E.coli* ATCC 25922

Préparer une suspension bactérienne d'*E.coli* ATCC 25922 à 0.5 MF dans 5 ml d'eau physiologique

-Diluer cet inoculum au 1/10^{ème} (0.5 ml de la suspension à 0.5 MF +4.5 ml d'eau physiologique)

-Ensemencer une gélose MH par écouvillonnage, laisser sécher 3 à 5 mn.

-Déposer au centre un disque d'ertapénème 10 µg (ou de méropénème)

-A partir du disque, faire une inoculation en trait avec la souche à tester et avec deux souches de référence (*K.pneumoniae* ATCC BAA 1705 : carbapénèmase positive) et *K.pneumoniae* ATCC BAA-1706 : carbapénèmase négative

-Incuber à 35°C ±2°C pendant 16 à 24 heures.

Interprétation :

-Après 16 à 24 H d'incubation, les souches productrices de carbapénèmase de type B vont pousser jusqu'au contact du disque d'ertapénème ou méropénème

-Un test de Hodge modifié est positif quand *Escherichia coli* ATCC 25922 au contact d'une souche productrice de carbapénèmase de type B, va pénétrer et croître dans le diamètre d'inhibition endonnant un aspect d'invagination de la culture.

-Un test de Hodge modifié est négatif quand il n'y a aucune modification du diamètre d'inhibition d'*Eschehchia coli* ATCC 25922 au contact des souches à étudier.

Annexe 12 : Résultats détails des tests complémentaires

N°	identification	CTX	CAZ	IMP	BLSE			Carbapenemases			CASE
					DDST	Rapprochement	CDT	DDST	THM	EDTA	
/											
122	<i>Enterobacter cloacae</i>	06	06	25	-	-	-	-/	/	/	+
164	<i>E.coli</i>	06	06	22	+	+	+	-	-	-	+
180	<i>k.pneumoniae</i>	11	06	26	+	+	+	/	/	/	+
220	<i>E.cloacae</i>	06	06	27	+	+	+	/	/	/	+
297	<i>E.coli</i>	06	06	23	+	+	+	/	/	-	+
309	<i>E.coli</i>	06	06	26	+	+	+	/	/	-	+
487	<i>E.coli</i>	18	06	34	+	+	+	/	/	/	+
499	<i>K.pneumoniae</i>	06	06	28	+	+	+	/	/	/	+
598	<i>E.coli</i>	08	19	23	+	+	+	/	/	//	+
676	<i>E.cloacae</i>	06	06	26	+	+	+	/	/	/	+
738	<i>E.coli</i>	11	06	22	+	+	+	-	-	-	+
747	<i>E.coli</i>	06	06	20	+	+	+	-	-	-	+
830	<i>E.cloacae</i>	13	21	23	+	+	+	/	/	/	+
835	<i>E.coli</i>	22	32	22	-	-	-	-	-		+
839	<i>E.coli</i>	26	30	24	-	-	-	/	/	/	+
909	<i>E.coli</i>	06	15	20	+	+	+	-	-	-	+
1769	<i>Citrobacter koseri</i>	06	25	26	+	+	+	/	/	/	+
1859	<i>Serratia liquefaciens</i>	06	17	23	+	+	+	/	/	/	+
1864	<i>Serratia odorifera</i>	06	19	20	+	+	+	-	-	-	+
3a	<i>E.coli</i>	06	06	24 (ERT=21)	-	-	-	-	+	-	+
1875	<i>Klebsiella spp</i>			25	+	+	+	/	/	/	+

Acinetobacter baumannii

N°	CAZ	IMP	BLSE			Carbapenemases		
			DDST	Rapprochement	CDT	DDST	THM	EDTA
/								
158	13	07	-	-	-	-	+	+
463	14	06	-	-	-	-	+	+
903	07	06	-	-	-	-	+	+
1777	08	06	-	-	-	-	+	+
1893	06	06	-	-	-	-	+	+

Pseudomonas aeruginosa

NUM	CAZ	IMP	BLSE			carbapénèmase			cephalosporina ses
			DDST	rapprochement	CDT	DDST	THM	EDTA	Test à cloxacilline
351	29 (AT=22)	22	+	+	+	-	-	+	+
633	12	6	-	-	-	-	-	Case/porine	+
1864	15	20	-	-	-	-	-	-	+
831	32 (AT=12)	14	-	-	+	+	-	-	+
180	31	21	/	/	/	-	-	+	+
421	32 (AT=06)	17	+	+	+	-	-	-	+
565	31	8	/	/	/	-	-	+	+
1880	28	12	/	/	/	-	-	+	+
836	26	18	/	/	/	-	-	-	+
776	28	22	/	/	/	-	-	-	-
713	23	6	-	-	-	-	-	Case/porine	+
810	27	06	-	-	-	-	-	Case/porine	+

Références bibliographiques

Les références bibliographiques

1. *L'antibiorésistance : pourquoi est-ce si grave ?* 2019; Available from: <https://solidarites-sante.gouv.fr/prevention-en-sante/les-antibiotiques-des-medicaments-essentiels-a-preserver/des-antibiotiques-a-l-antibioresistance/article/l-antibioresistance-pourquoi-est-ce-si-grave>.
2. Trémoières, F., *Quand le miracle antibiotique vire au cauchemar*. médecine/sciences, 2010. **26**(11): p. 925-929.
3. Bentley, R. and J.W. Bennett, *What is an antibiotic? Revisited*. Adv Appl Microbiol, 2003. **52**: p. 303-31.
4. Muylaert, A. and J. Mainil. *Résistance bactériennes aux antibiotiques, les mécanismes et leur "contagiosité"*. in *Annales de Médecine vétérinaire*. 2013. Université de Liège.
5. Case, C.L. and B.R. Funke, *Introduction à la microbiologie*. 2003: Saint-Laurent, Québec: Éditions du Renouveau pédagogique.
6. Yala, D., et al., *Classification et mode d'action des antibiotiques*. Médecine du Maghreb, 2001. **91**(1): p. 5-12.
7. Van Bambeke, F. and S. Pharm, *Pharmacologie et Pharmacothérapie anti-infectieuse*. 2009-2010.
8. Cowan, M.K., *Microbiology: a systems approach*. 2018: McGraw-Hill.
9. Limat, S., et al., *Pharmacie clinique et thérapeutique*. 2018: Elsevier Health Sciences.
10. *NOMENCLATURE NATIONALE DES PRODUITS PHARMACEUTIQUES A USAGE DE LA MEDECINE HUMAINE*. 31 Décembre 2019; Available from: <http://www.sante.gov.dz/pharmacie/407-la-nomenclature.html>.
11. Mainardi, J., *Mécanismes d'action et de résistance aux antibiotiques/Session interactive autour de l'antibiogramme*.
12. Verdier-Lorne, M.-C., *Pharmacologie des anti-infectieux*. 2018: Elsevier Health Sciences.
13. Munita, J.M. and C.A. Arias, *Mechanisms of antibiotic resistance*. Virulence mechanisms of bacterial pathogens, 2016: p. 481-511.
14. Cox, G., et al., *Ribosome clearance by FusB-type proteins mediates resistance to the antibiotic fusidic acid*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(6): p. 2102-2107.
15. ECN.PILLY, *Prescription et surveillance des anti-infectieux chez l'adulte et l'enfant N°173*. 2020.
16. Jehl, F. and C. Koebel, *Antibiotiques-bactéries: une relation (pharmaco) dynamique*. Revue Francophone des Laboratoires, 2011. **2011**(434): p. 45-56.
17. Roberts, J.A., *ANTIMICROBIAL PRESCRIBING : Optimization through Drug Dosing and MIC*. 2018.
18. Chaussade, H., et al., *Antibiotic treatments in urology*. Progres en urologie: journal de l'Association française d'urologie et de la Société française d'urologie, 2013. **23**(15): p. 1327.
19. Denis, F., et al., *Bactériologie médicale: techniques usuelles*. 2016: Elsevier Masson.
20. Garraffo, R. and T. Lavrut, *Signification clinique des corrélations pharmacocinétique/pharmacodynamie des antibiotiques chez les patients de réanimation*. Réanimation, 2005. **14**(4): p. 264-275.
21. Yilmaz, Ç. and G. Özcengiz, *Antibiotics: pharmacokinetics, toxicity, resistance and multidrug efflux pumps*. Biochemical pharmacology, 2017. **133**: p. 43-62.
22. Sy, S.K., L. Zhuang, and H. Derendorf, *Pharmacokinetics and pharmacodynamics in antibiotic dose optimization*. Expert opinion on drug metabolism & toxicology, 2016. **12**(1): p. 93-114.
23. Emilie Cardot Martin, O.D., Philippe Lesprit. *La résistance aux antibiotiques*. 06.12.19; Available from: <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/microbiologie/bacteriologie/la-resistance-aux-antibiotiques>.
24. Weiss, K., *La résistance bactérienne la nouvelle guerre froide*. Le médecin du Québec, 2002. **37**(3): p. 41-49.

25. Carle, S., *La résistance aux antibiotiques: un enjeu de santé publique important!* Pharmactuel, 2009. **42**.
26. LOZNIIEWSKI A., R.C., Nancy, *RESISTANCE BACTERIENNE AUX ANTIBIOTIQUES* 2010.
27. Moroh, J.-L.A., *Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de Morinda morindoïdes*. 2013, Université de Bretagne occidentale-Brest.
28. Magiorakos, A.-P., et al., *Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance*. *Clinical microbiology and infection*, 2012. **18**(3): p. 268-281.
29. *UN MANQUE DE NOUVEAUX ANTIBIOTIQUES*. Available from: <https://amr.biomerieux.com/en/challenges/a-lack-of-antibiotics/>.
30. Bonev, B.B. and N.M. Brown, *Bacterial resistance to antibiotics: from molecules to man*. 2020: Wiley Online Library.
31. Capelo-Martínez, J.-L. and G. Igrejas, *Antibiotic Drug Resistance*. 2019: Wiley Online Library.
32. Apurba Sankar Sastry, S.B.K., *Review of Microbiology and Immunology*. 6 ed. 2018: Jaypee Brothers Medical Publishers.
33. Kathleen, T. and B. Chess, *Foundations in microbiology*. 2018.
34. Gupte, S., *The Short Textbook of Medical Microbiology (including parasitology)*. 2010: Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd.
35. Sastry, A.S. and S. Bhat, *Essentials of medical microbiology*. 2016: Jaypee Brothers, Medical Publishers Pvt. Limited.
36. Rozwandowicz, M., et al., *Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2018. **73**(5): p. 1121-1137.
37. Sköld, O., *Antibiotics and antibiotic resistance*. 2011: Wiley Online Library.
38. Murray, P.R., K.S. Rosenthal, and M.A. Pfaller, *Medical microbiology*. 2016: Elsevier Health Sciences.
39. Elliott, T., et al., *Lecture Notes: Medical Microbiology and Infection*. 2012: John Wiley & Sons.
40. Peterson, E. and P. Kaur, *Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens*. *Frontiers in microbiology*, 2018. **9**: p. 2928.
41. Lavigne, J.-P., et al., *Résistance enzymatique d'Escherichia coli aux bêtalactamines et prévalence en clinique*. *Pathologie Biologie*, 2002. **50**(6): p. 388-393.
42. Giske, C.G., et al., *Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2009. **63**(1): p. 1-4.
43. Gualerzi, C.O., et al., *Antibiotics: targets, mechanisms and resistance*. 2013: John Wiley & Sons.
44. Walsh, C., *Antibiotics: actions, origins, resistance*. 2003: American Society for Microbiology (ASM).
45. Wax, R.G., et al., *Bacterial resistance to antimicrobials*. 2008: CRC press.
46. Wright, G.D., *Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification*. *Advanced drug delivery reviews*, 2005. **57**(10): p. 1451-1470.
47. Kenneth J. Ryan, et al., *Sherris medical microbiology*. 2018: McGraw-Hill Education.
48. Tremblay, Y.D., S. Hathroubi, and M. Jacques, *Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique*. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 2014. **78**(2): p. 110-116.
49. Kon, K. and M. Raj, *Antibiotic Resistance: Mechanisms and new antimicrobial approaches*. 2016: Academic press.
50. Davin-Regli, A., M. Masi, and J.-M. Pagès, *Le rôle des porines dans la résistance aux antibiotiques*. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2020. **2020**(519): p. 28-37.
51. Douglas L. Mayers, et al., *Antimicrobial Drug Resistance: Mechanisms of Drug Resistance*. Vol. 1. 2017: Springer International Publishing.
52. Blair, J.M., et al., *Molecular mechanisms of antibiotic resistance*. *Nature reviews microbiology*, 2015. **13**(1): p. 42-51.

53. Sagar, S., et al., *Antibiotic Resistant Bacteria: A Challenge to Modern Medicine*. 2019: Springer.
54. Cui, L., et al., *Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2006. **50**(2): p. 428-438.
55. Hiramatsu, K., *Vancomycin resistance in staphylococci*. *Drugs Resistance Updates*, 1998. **1**: p. 135-150.
56. CNRTL. *Standardisation : définition de standardisation*. Available from: <https://www.cnrtl.fr/definition/standardisation#:~:text=%C3%A0%20standardiser%20A%5D%20Action%20de,ce%20mot%20A>.
57. Institute, C.C.a.L.S., *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 30th ed. *CLSI supplement M100*. 2020.
58. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST*. Available from: <https://www.eucast.org/>.
59. *standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale (Médecine humaine et vétérinaire)*. 7 ed. 2016.
60. Jehl, F., A. Chabaud, and A. Grillon, *L'antibiogramme: diamètres ou CMI?* *Journal des Anti-infectieux*, 2015. **17**(4): p. 125-139.
61. EUCAST/CASFM, *Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie*. 2020.
62. JORGENSEN, J.H. and M.A. PFALLER, *Manual of Clinical Microbiology (11th edn)*. Trends in microbiology. Vol. 2. 2015: ASM Press.
63. Joly-Guillou, M.-L., *Intérêt du E-test dans le suivi de l'antibiothérapie*. *Réanimation*, 2006. **15**(3): p. 237-240.
64. Mouton, Y., E. Bingen, and Y. Deboscker, *Antibiotiques, antiviraux, anti-infectieux*. 2000: John Libbey Eurotext.
65. *Minimum Bactericidal Concentration (MBC) Test*. Available from: <http://microchemlab.com/test/minimum-bactericidal-concentration-mbc-test>.
66. Archambaud, M., *Méthode d'évaluation de l'activité des antibiotiques*. *Brûlures*, 2000. **1**.
67. Marcel, J., *L'antibiogramme et son impact médical*. *Antibiotiques*, 2005. **7**(1): p. 53-58.
68. EUCAST, *Guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance*, ed. E.C.o.A.S. Testing. 2017.
69. Pereckaite, L., V. Tatarunas, and A. Giedraitiene, *Current antimicrobial susceptibility testing for beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in clinical settings*. *Journal of microbiological methods*, 2018. **152**: p. 154-164.
70. DORTET, L., G. Cuzon, and P.P. Nordmann, *Note technique: Détection des souches d'entérobactéries productrices d'une carbapénèmase*. 2014, Janvier.
71. Robin, F., L. Gibold, and R. Bonnet, *Résistances naturelles et acquises aux β -lactamines chez les entérobactéries: comment les identifier en pratique quotidienne?* *Revue Francophone des laboratoires*, 2012. **2012**(445): p. 47-58.
72. Hrabák, J., E. Chudáčková, and C. Papagiannitsis, *Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae: a challenge for diagnostic microbiological laboratories*. *Clinical Microbiology and Infection*, 2014. **20**(9): p. 839-853.
73. Asthana, S., P. Mathur, and V. Tak, *Detection of carbapenemase production in Gram-negative bacteria*. *Journal of laboratory physicians*, 2014. **6**(2): p. 69.
74. van der Zwaluw, K., et al., *The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods*. *PloS one*, 2015. **10**(3): p. e0123690.
75. Aguirre-Quiñonero, A. and L. Martínez-Martínez, *Non-molecular detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2017. **23**(1): p. 1-11.
76. Willems, E., et al., *Towards a phenotypic screening strategy for emerging-lactamases in Gram-negative bacilli*. 2012.

77. Mee'aad, K., A.N. Hussein, and A.M. Al-Mohana, *Detection of β -lactamases producing Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. AL-Qadisiyah Journal of pure Science, 2018. **23**(2): p. 229-239.
78. Alipour, F., M. Ahmadi, and S. Javadi, *Evaluation of different methods to detect methicillin resistance in Staphylococcus aureus (MRSA)*. Journal of infection and public health, 2014. **7**(3): p. 186-191.
79. Leclercq, R. and V. Cattoir, *Bactéries à Gram positif et glycopeptides*. Revue Francophone des Laboratoires, 2012. **2012**(445): p. 41-46.
80. AIT MILOUD, K., *L'infection urinaire: expérience du laboratoire de microbiologie de l'hôpital des spécialités de Rabat*. 2011.
81. Quentin-Noury, C., *Automatisation de l'antibiogramme au laboratoire de bactériologie*. Revue francophone des laboratoires, 2016. **2016**(482): p. 49-59.
82. *ANTIBIOTIQUES IV : ETUDES IN VITRO, L'ANTIBIOGRAMME* Available from: <http://www.microbes-edu.org/etudiant/antibio4.html>.
83. Anjum, M.F., E. Zankari, and H. Hasman, *Molecular methods for detection of antimicrobial resistance*. Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals, 2018: p. 33-50.
84. Poitras, E. and A. Houde, *La PCR en temps réel: principes et applications*. Reviews in biology and biotechnology, 2002. **2**(2): p. 2-11.
85. Encyclopaedia-Britannica. *Polymerase chain reaction*. Available from: <https://www.britannica.com/science/polymerase-chain-reaction>.
86. Greub, K.J.G., *PCR en microbiologie: de l'amplification de l'ADN à l'interprétation du résultat*. Rev Med Suisse, 2007. **3**: p. 32181.
87. Pobolelova, Y.I., et al., *Multiplex PCR for joint amplification of carbapenemase genes of molecular classes A, B, and D*. Biochemistry (Moscow), 2014. **79**(6): p. 566-570.
88. Hilario, E., *Overview of hybridization and detection techniques*, in *Protocols for nucleic acid analysis by nonradioactive probes*. 2007, Springer. p. 27-38.
89. Volpi, E.V. and J.M. Bridger, *FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique*. Biotechniques, 2008. **45**(4): p. 385-409.
90. Rubtsova, M.Y., et al., *Oligonucleotide microarrays with horseradish peroxidase-based detection for the identification of extended-spectrum β -lactamases*. Biosensors and Bioelectronics, 2010. **26**(4): p. 1252-1260.
91. Freney, J., et al., *Précis de bactériologie clinique*. 2007: Éd. Eska.
92. Bally, F. and N. Troillet, *PCR multiplex et diagnostic infectieux: chaque médaille a un revers*. 2018.
93. Nordmann, P. and L. Poirel, *The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide*. Clinical Microbiology and Infection, 2014. **20**(9): p. 821-830.
94. Dortet, L., et al., *Evaluation of the RAPIDEC® CARBA NP, the Rapid CARB Screen® and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2015. **70**(11): p. 3014-3022.
95. Österblad, M., A.J. Hakanen, and J. Jalava, *Evaluation of the Carba NP test for carbapenemase detection*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2014. **58**(12): p. 7553-7556.
96. Dortet, L., L. Poirel, and P. Nordmann, *Épidémiologie, détection et identification des entérobactéries productrices de carbapénèmases*. Feuilletts de Biologie, 2013. **312**.
97. Elhani, D. *Les bêta-lactamases à spectre étendu: le défi s'accentue*. in *Annales de biologie clinique*. 2012.
98. Tankeshwar, A. *Nitrocefim test: Principle, procedure, uses and limitations*. 2015; Available from: <https://microbeonline.com/nitrocefim-test-principle-procedure-uses-limitations/>.

99. Livermore, D., M. Warner, and S. Mushtaq, *Evaluation of the chromogenic Cica- β -Test for detecting extended-spectrum, AmpC and metallo- β -lactamases*. Journal of antimicrobial chemotherapy, 2007. **60**(6): p. 1375-1379.
100. Pires, J., A. Novais, and L. Peixe, *Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures*. Journal of clinical microbiology, 2013. **51**(12): p. 4281-4283.
101. Felten, A., et al., *Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test*. Journal of clinical microbiology, 2002. **40**(8): p. 2766-2771.
102. Rasheed, M. and Z. Ahmed, *Phenotypic methods of greater accuracy to detect the mecA gene product for the recognition of MRSA in resource constraint settings*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2010. **3**(9): p. 741-744.
103. Wareham, D.W., et al., *Evaluation of an immunochromatographic lateral flow assay (OXA-48 K-SeT) for rapid detection of OXA-48-like carbapenemases in Enterobacteriaceae*. Journal of clinical microbiology, 2016. **54**(2): p. 471-473.
104. Meunier, D., et al., *Evaluation of the K-SeT RESIST immunochromatographic assay for the rapid detection of KPC and OXA-48-like carbapenemases*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2016. **71**(8): p. 2357-2359.
105. Dortet, L., et al., *Prospective evaluation of the OXA-48 K-SeT assay, an immunochromatographic test for the rapid detection of OXA-48-type carbapenemases*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2016. **71**(7): p. 1834-1840.
106. Isabelle. *Détecter l'antibiorésistance plus vite et plus simplement*. 14/11/2017; Available from: <https://www.techno-science.net/actualite/detecter-antibioresistance-plus-vite-plus-simplement-N16803.html>
107. Vestal, M.L., *Evolution of quantitative MALDI-TOF mass spectrometry for clinical applications*. Clinical chemistry, 2016. **62**(1): p. 20-23.
108. Ota, Y., et al., *Detection of extended-spectrum β -lactamases producing Enterobacteriaceae using a matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry based MBT STAR-BL software module with β -lactamase inhibition assay depends on the bacterial strains*. Journal of Microbiological Methods, 2019. **167**: p. 105734.
109. Singhal, N., et al., *MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis*. Frontiers in microbiology, 2015. **6**: p. 791.
110. Ledebuer, N.A. and R.L. Hodinka, *Molecular detection of resistance determinants*. Journal of Clinical Microbiology, 2011. **49**(9 Supplement): p. S20-S24.
111. Cai, J.C., et al., *Detection of OmpK36 porin loss in Klebsiella spp. by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry*. Journal of clinical microbiology, 2012. **50**(6): p. 2179-2182.
112. Griffin, P.M., et al., *Rapid identification of VRE with MALDI-TOF MS*. Pathology, 2013. **45**: p. S57.
113. Rahal, K., et al., *Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques, in 19th Evaluation Report, Project of the World Health Organization, People's Democratic Republic of Algeria*. 2018.
114. CHOUH, F., A. CHATER, and R. SIAD, *Profil de résistance aux antibiotiques des bacilles Gram négatif isolés à partir des urines au laboratoire de microbiologie au CHU Nedir Mohammed de Tizi-Ouzou durant l'année 2018*. 2019.
115. Bourahla, N. and W. Haddache, *Etude de la résistance du Pseudomonas aeruginosa aux antibiotiques au CHU Nedir Mohammed de Tizi Ouzou pendant l'année 2015*. 2016.
116. KEBOUR, D. and Y. MELIANI, *Tests de sensibilité aux antibiotiques chez les cocci Gram positifs et tests complémentaires*. 2018.

Résumé

Il s'agit d'un thème pratique qui consiste à mettre en place une paillasse d'antibiogramme selon les recommandations du CLSI, Eucast et standardisation algérienne, pour améliorer les résultats.

Parmi les 907 prélèvements acheminés au laboratoire, 200 ont constitué l'objet d'une étude prospective en leur faisant leurs tests de diffusion de disques, leurs CMI et tests complémentaires.

Les résultats montrent que la résistance à Belloua est comparable pour certains antibiotiques et différente pour d'autres par rapport aux résultats du rapport national d'AARN de 2018 et d'autres études régionales. Ces résultats peuvent être exploités dans d'autres études de résistance plus approfondies.

Mots clés : antibiogramme, antibiotique, CMI, tests complémentaires.

Abstract

This is a practical theme which consists in setting up an antibiogram bench according to the recommendations of the CLSI, Eucast and Algerian standardisation, to improve the results.

Among the 907 samples sent to the laboratory, 200 were the object of a prospective study by doing their disc diffusion tests, MICs and complementary tests.

The results show that resistance to Belloua is comparable for some antibiotics and different for others compared to the results of the national AARN report of 2018 and other regional studies, which can be used in other more in-depth resistance studies.

Key words: antibiogram, antibiotic, MIC, complementary tests