

Ministère de l'Enseignement Supérieur  
et de la Recherche Scientifique  
Université Mouloud Mammeri  
Faculté de médecine  
TIZI OUZOU



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
جامعة مولود معمري  
كلية الطب  
تيزي وزو

Département de pharmacie

## MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

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

### Thème :

**Les infections à Entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération au CHU de TIZI-OUZOU unité NEDIR MOHAMED**

Réalisé par :

M<sup>lle</sup> TALI MAAMAR Manel

M<sup>lle</sup> MENIAI Lobna Anouar

M<sup>lle</sup> SAIB Aicha

M<sup>lle</sup> LAIFAOUI Rekaia

Encadré par :

Dr BOUBRIT Fella

Composition du jury :

Dr BOUBRIT Fella	MAHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Promotrice
Dr DJERBOUA Taoufik	MAHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Président de jury
Dr CHERIFI Lynda	MAHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Examinatrice
Dr CHENNAFI Yasmine	Assistante	EHS/DBK	UMMTO	Examinatrice

**Année universitaire : 2021/2022**

## Remerciements

Avant toute chose, nous remercions **Dieu**, le tout Puissant, pour nous avoir donnée la force et la patience.

Nous tenons à remercier particulièrement et chaleureusement avec notre grande gratitude notre promotrice Docteur **BOUBRIT Fella** pour tous les efforts inlassables, et toute la patience que vous avez déployée pour que ce travail soit élaboré.

À Docteur **CHERIFI Lynda** et Docteur **CHENNAFI Yasmine** nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant d'examiner notre travail. Nous remercions docteur **DJERBOUA Taoufik** d'avoir accepté de présider ce jury . C'est pour nous l'occasion de vous témoigner estime et respect.

Un spécial remerciement à M<sup>lle</sup> **AMROUNE Dyhia** vous nous avez aidé jusqu'au dernier moment. Nous tenons à vous exprimer nos sincères remerciements et notre respect le plus distingué.

Nos remerciements s'adressent également au personnel du laboratoire de microbiologie de CHU Tizi Ouzou. Nous sommes très heureux d'avoir appris auprès de vous.

A ceux et celles qui nous ont aidé d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin dans notre travail, nous les remercions du fond du cœur.



## *Dédicaces*

Avec un énorme plaisir et un cœur ouvert que je dédie ce travail à :

**Mes très chers parents**, la raison de ce que je deviens aujourd'hui, aucun mot aussi expressif qu'il soit, ne saurait exprimer mes remerciements à votre égard. Merci d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir transmis le goût du travail parfaitement exécuter et de m'avoir encouragé sans cesse sur cette voie qui aboutit ce jour. J'espère que vous êtes fiers de moi.

A mes chères **sœurs** et **frères** qui ont toujours été là pour moi, et toujours offert beaucoup de tendresse et d'affection et toujours épaulée pendant mon parcours étudiantin. Je vous exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour. Merci pour votre soutien, vos encouragements, vos conseils, et vos sacrifices à mon égard.

A tous ceux que j'aime.

A tous ceux qui me sont trop chers et que j'ai omis de citer.

A tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.



*Manel.*

## *Dédicace*

Je dédie ce travail à :

Mes cher parents **Slimane** et **Zahra** ; symboles de sacrifice, de tendresse d'amour je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

A mes chers frères et mes chères sœurs

A mon trinôme **Lobna** , **Manel** et **Maria**

A mes très chère amies: **Lobna** , **Manel** , **Maria** , **Asma** , **Loubna**, **Ahlem** et **Radia** .

A tous ma famille maternelle et paternelle.

A tous ce qui me sont chers.



*Aicha.*

## *Dédicaces*

Je dédie ce modeste travail :

A mes chères parents **Laïfaoui Boualem** et **Rahal Kheira**

Ce fut très difficile, mais vous ne ménagez aucun effort pour notre éducation. Vous avez toujours veillé à ce que je ne manque de rien pour mener à bien mes études. Si j'ai pu arriver jusque-là, c'est grâce à vos efforts et sacrifices, saches que l'honneur de ce travail vous revient, il ne suffit certes pas à apaiser les souffrances endurées, puisse-t-il cependant vous donner réconfort et fierté mais aussi le témoignage de ma très profonde reconnaissance. Merci pour tous mon père et ma mère ! Que le tout puissant vous garde aussi longtemps auprès de nous ! Amen !

A mes chères sœurs, **Raouia** et **Fatima Zahra**.

Source de joie, de bonheur et d'encouragement que Dieu le tout puissant exhausse tous vos vœux.

A mes très chers amis **Malek, Zineb, Wassim** et **Mohamed**

*A mes collègues de mémoire .*

Pour leur sérieux et leur assiduité dans la réalisation de ce travail.

A mes amis de la promotion

A notre promotrice **Dr BOUBRIT Fella**

Je vous aime.

*Rekaia (Maria).*



## *Dédicaces*

Je dédie ce travail :

À ma très chère mère Mme **MADANI MALIKA.**

Je ne trouve pas les mots pour traduire tout ce que je ressens envers une mère exceptionnelle dont j'ai la fierté d'être la fille. Tu t'es toujours donnée beaucoup de mal pour m'offrir le meilleur de toi même Ta noblesse et ta bonté sont sans limites.

À mon père **MENIAI LAKHDAR .**

Aucune dédicace ne saurait traduire la profondeur des sentiments d'affection, d'estime et de respect envers un être cher. J'ai vécu dans l'admiration de ta grande personne, Tu es pour moi le symbole de l'honnête, de la justice, mon amour envers un père merveilleux, et de la bonté.

À mon frère **MOHAMMED.**

Pour tout l'amour, le soutien et le bonheur que tu réveilles en moi, J'ai toujours apprécié l'affection que

tu portes à mon égard, Que ce travail soit le témoignage de mon amour et ma gratitude envers toi.



*Lobna.*

A decorative gold frame with ornate, swirling flourishes surrounding the text.

# *Table des matières*

# TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>x</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>PARTIE THÉORIQUE</b>	
<b>CHAPITRE I :GÉNÉRALITÉS SUR LES ENTÉROBACTÉRIES</b>	
1. Historique.....	2
2. Classification.....	2
3. Habitat.....	4
4. Caractères bactériologiques :.....	4
4.1 Caractères morphologiques .....	4
4.2 Caractères cultureux.....	4
4.3 Caractères biochimiques.....	6
4.4 Caractères antigéniques.....	7
5. Facteurs de virulence .....	7
6. Pouvoir pathogène des entérobactéries .....	8
6.1 Les entérobactéries pathogènes stricts.....	8
6.2 Les entérobactéries pathogènes opportunistes.....	9
7. Diagnostic bactériologique.....	9
7.1 Prélèvement.....	9
7.1.1 Les conditions de prélèvement .....	10
7.1.2 Acheminement au laboratoire fiche de renseignement .....	10

7.2 Examen cyto bactériologique des prélèvements .....	10
7.2.1 Examen macroscopique.....	10
7.2.2 Examen microscopique.....	11
7.2.3 Culture et isolement.....	12
7.2.4 Identification des entérobactéries .....	13
7.2.4.1 Identification biochimique.....	13
7.2.4.2 Identification antigénique (sérotypage).....	15
7.2.4.3 Méthodes moléculaires d'identification.....	15
7.2.4.4 Identification par spectrométrie de masse .....	16
7.2.5 Tests de sensibilité aux antibiotiques .....	16
7.3 Diagnostic indirect .....	18

## **CHAPITRE II : LA RÉSISTANCE DES ENTÉROBACTÉRIES AUX ANTIBIOTIQUES**

1. Généralité sur les antibiotiques .....	20
1.1 Définition .....	20
1.2 Classification .....	20
1.3 Mode d'action des antibiotiques .....	20
1.3.1 Action sur la paroi bactérienne.....	20
1.3.2 Action sur la membrane bactérienne .....	21
1.3.3 Action sur la synthèse protéique .....	21
1.3.4 Action sur les acides nucléiques.....	22

2. La résistance.....	22
2.1 Définitions .....	22
2.1.1 La résistance bactérienne .....	22
2.1.2 Bactérie multirésistante.....	23
2.2 Type de résistance.....	24
2.2.1 Résistance naturelle ou intrinsèque.....	24
2.2.2 Résistance acquise.....	24
2.3 Mécanismes génétique de la résistance :.....	24
2.3.1 Résistance chromosomique.....	24
2.3.2 Résistance extra-chromosomique.....	25
3. Résistance des entérobactéries aux antibiotiques.....	26
3.1 Résistance naturelle des entérobactéries aux antibiotiques .....	26
3.1.1 Résistance naturelle aux bêtalactamines.....	26
3.1.2 Résistance naturelle des entérobactéries aux autres molécules d'antibiotiques.....	28
3.2 Résistance acquise.....	29
3.2.1 Les mécanismes de résistance des entérobactéries aux bêta-lactamines.....	29
3.2.1.1 Résistance non enzymatique .....	29
3.2.1.2 Résistance enzymatique :.....	31
4. La résistance des entérobactéries aux autres classes d'antibiotiques .....	34
4.1 Les mécanismes de résistance des entérobactéries aux aminoglycosides .....	34
4.2 Mécanisme de résistance des entérobactéries aux Les quinolones .....	35

4.3 Mécanisme de résistance des entérobactéries au triméthoprim- Sulfaméthoxazole	36
4.4 Mécanisme de Résistance des entérobactéries au chloramphénicol	37

## **PARTIE PRATIQUE :**

### **MATÉRIELS ET MÉTHODES**

1. Matériels	38
2. Méthodologie	39
2.1 Analyses microbiologique	39
2.1.1 Isolement et Identification des entérobactéries	39
2.1.2 Test de sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme)	46
2.1.3 Tests complémentaires	46
2.1.3.1 Détection des BLSE	46
2.2 Etude statistique	49

### **RESULTATS**

1. Fréquence d'isolement de souches d'entérobactéries résistantes aux C3G	51
2. Répartition des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G isolées selon le sexe	53
3. Répartition des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G isolées selon le service	55
4. Répartition des souches entérobactéries résistantes aux C3G isolées selon le type de prélèvement	58
5. Répartition des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G isolées par espèces bactériennes	61
6. Évolution de la résistance des principales entérobactéries résistantes aux C3G aux autres classes d'antibiotiques isolées durant la période d'étude rétrospective	63

6.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	63
6.2	<i>Enterobacter Sp</i> .....	65
6.3	<i>Escherichia coli</i> .....	66
6.4	<i>Citrobacter Sp</i> .....	68
7.	Profil de résistance aux autres classes d' antibiotiques des principales entérobactéries résistantes aux C3G isolées durant l'étude prospective.....	69
7.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	69
7.2	<i>Escherichia coli</i> .....	71
8.	Taux d'entérobactéries productrices de $\beta$ -lactamases à spectre élargi.....	72
	<b>DISCUSSION</b> .....	76
	<b>CONCLUSION</b> .....	82
	<b>RECOMMANDATIONS</b> .....	83
	<b>ANNEXES</b> .....	84
	<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	
	<b>RÉSUMÉ</b>	

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique.  
AK : Amikacine.  
AMC : Amoxicilline-acide clavulanique.  
AMP : Ampicilline.  
AmpC: Céphalosporinases de haut niveau.  
AmpC : Ampicillinase.  
AMX : Amoxicilline.  
ARN : Acide Ribonucléique.  
ATM : Aztréonam.  
BLSE:  $\beta$ -lactamases à spectre élargi.  
C : Chloramphénicol.  
Carba: Carbapénémases.  
CAZ : Ceftazidime.  
CIP : Ciprofloxacine.  
Cit: Citrate.  
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.  
COL : Colistine.  
CPO : Cefpodoxime.  
CRO : Ceftriaxone.  
CT : Colistine.  
CTX : Céfotaxime.  
CXM : Céfuroxime.  
CZ : Céfazoline.  
C1G : Céphalosporine de première génération.  
C3G : Céphalosporine de 3<sup>ème</sup> générations.  
ETP : Ertapénème.  
F : Furanes.

FOS : Fosfomycine.

FOX : Céfoxitine.

Glu: Glucose.

GN : Gentamycine.

H<sub>2</sub>S: Thiosulfate.

Ind: Indol.

IMP : Imipénème.

Lac: Lactose.

MER : Méropénème.

Mob: Mobilité.

NA : Acide nalidixique.

NIT : Nitrofuranes.

ONPG: Ortho-Nitro-Phényl-Galactopyranoside.

PDA: Phenylalaninedeaminase.

PIP : Pipéracilline.

R : Résistant.

R\* : Résistance hétérogène observée dans plusieurs sous-groupes phylogénétiques.

S : Sensible.

SXT : Triméthoprim-Sulfaméthoxazole.

TET : Tétracycline.

TIC : Ticarcilline.

TIG : Tigécycline.

WHONET : World Health Organistaion Network.

XLD : Xylose-lysine-désoxycholate

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Classification des principales espèces d'entérobactéries isolées au laboratoire de bactériologie médicale.....	4
Tableau II : Principaux caractères biochimiques des Entérobactéries.....	6
Tableau III : Phénotypes de résistance naturelle des entérobactéries les plus fréquentes.....	29
Tableau IV : Comparaison des systèmes de nomenclature.....	32
Tableau V : Les Différentes types de $\beta$ -lactamases décrites chez E. coli dans les hôpitaux algériens.....	34
Tableau VI : Phénotypes de résistance des entérobactéries aux quinolones.....	36
Tableau VII : Fréquence d'isolement de souches d'entérobactéries résistantes aux C3G par année durant la période rétrospective.....	52
Tableau VIII : Répartition des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G isolées selon le sexe pendant l'étude rétrospective.....	54
Tableau IX : Répartition des souches des entérobactéries résistantes aux C3G isolées selon le sexe pendant l'étude prospective.....	55
Tableau X : Répartition des Entérobactéries résistantes aux C3G selon le service durant la période rétrospective.....	56
Tableau XI : Répartition globale des Entérobactéries résistantes aux C3G selon le service durant la période prospective.....	58
Tableau XII : Répartition des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G isolées selon le type de prélèvement pendant l'étude rétrospective.....	59
Tableau XIII : Répartition des souches des entérobactéries résistantes aux C3G isolées selon le type de prélèvement pendant l'étude prospective.....	60
Tableau XIV: Répartition des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G par l'espèce pendant l'étude rétrospective.....	62
Tableau XV : Répartition des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G par espèce pendant l'étude prospective.....	63
Tableau XVI : Evolution de la résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux antibiotiques.....	64

Tableau XVII : Evolution de la résistance de l' <i>Enterobacter sp</i> aux antibiotiques.....	66
Tableau XVIII : Evolution de la résistance de l' <i>Escherichia coli</i> aux antibiotiques.....	67
Tableau XIX : Evolution de la résistance du <i>Citrobacter sp</i> aux antibiotiques.....	69
Tableau XX : Profil de résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux antibiotiques.....	70
Tableau XXI : Profil de résistance d' <i>Escherichia coli</i> aux autres antibiotiques.....	72
Tableau XXII : Taux des souches d'entérobactéries productrices de BLSE+ isolées pendant la l'étude rétrospective.....	73
Tableau XXIII : Répartition des souches d'entérobactéries productrices de BLSE isolées pendant l'étude rétrospective.....	74
Tableau XXIV : Taux des souches d'entérobactéries productrices de BLSE isolées pendant l'étude prospective.....	75
Tableau XXV : Répartition des souches des entérobactéries productrices de BLSE+ isolées pendant l'étude prospective.....	75

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Aspect des colonies sur gélose nutritive des principales entérobactéries.....	41
Figure 2: Aspect des colonies sur milieu Hektoen des principales entérobactéries.....	41
Figure 3 : Observation microscopique avec coloration de Gram.....	42
Figure 4 : Résultat de test d'oxydase.....	43
Figure 5 : Fiche de résultat de la galerie API20E.....	44
Figure 6 : Galerie biochimique API20E <i>Escherichia coli</i> .....	44
Figure 7 : Galerie biochimique API20E de <i>Proteus mirabilis</i> .....	44
Figure 8 : Galerie biochimique API20E de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	45
Figure 9 : Automate d'identification et d'antibiogramme VITEK2.....	45
Figure 10 : Test de synergie positif pour une souche de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (aspect en bouchon de champagne).....	48
Figure 11 : Schéma de détection de BLSE par le test du double disque.....	49
Figure 12 : Représentation graphique d'évolution de la fréquence d'isolement de souches d'entérobactéries résistantes aux C3G durant l'étude rétrospective.....	51
Figure 13 : Représentation graphique d'évolution de la fréquence d'isolement de souches d'entérobactéries résistantes aux C3G durant l'étude prospective.....	52
Figure 14 : Représentation des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G isolées selon le sexe pendant l'étude rétrospective.....	53
Figure 15 : Répartition des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G isolées selon le sexe pendant l'étude prospective.....	54
Figure 16 : Représentation graphique des entérobactéries résistantes aux C3G selon le service durant la période rétrospective.....	56
Figure 17 : Représentation graphique des entérobactéries résistantes aux C3G selon le service durant la période d'étude prospective.....	57
Figure 18: Représentation graphique de souches d'entérobactéries résistantes aux C3G isolées selon le type de prélèvement pendant l'étude rétrospective.....	59
Figure 19 : Représentation graphique des souches des entérobactéries résistantes aux C3G isolées selon le type de prélèvement pendant l'étude prospective.....	60
Figure 20 : Représentation graphique des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G par espèce pendant l'étude rétrospective.....	61

Figure 21 : Représentation graphique de souches d'entérobactéries résistantes aux C3G par espèce pendant l'étude prospective.....	62
Figure 22 : Représentation graphique de l'évolution de la résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux antibiotiques.....	64
Figure 23 : Représentation graphique de l'évolution de la résistance du genre <i>Enterobacter</i> aux antibiotiques.....	65
Figure 24 : Représentation graphique de l'évolution de la résistance d' <i>Escherichia coli</i> aux antibiotiques.....	67
Figure 25 : Représentation graphique de l'évolution de la résistance du <i>citrobacter sp</i> aux antibiotiques.....	68
Figure 26 : Représentation graphique du Profil de résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux antibiotiques.....	70
Figure 27 : Représentation graphique du Profil de résistance d' <i>Escherichia coli</i> aux autres antibiotiques.....	71
Figure 28 : Représentation graphique du pourcentage des souches d'entérobactéries productrices de BLSE+ isolées pendant l'étude rétrospective.....	73
Figure 29 : Représentation graphique du pourcentage des souches d'entérobactéries productrices de BLSE isolées pendant l'étude prospective.....	75

A decorative gold frame with ornate, swirling flourishes at the corners and midpoints, enclosing the text.

# *Introduction*

Les entérobactéries forment une vaste famille de bacilles à Gram négatif regroupées en plusieurs genres et espèces. Tous ces germes ont en commun leur localisation préférentielle au niveau du système digestif, d'où leur appellation (entérobactéries)[1].

Ces bactéries occupent une place importante en pathologie humaine et constituent plus de 80% des germes isolés au laboratoire de biologie médicale. Ils sont responsables de nombreuses infections[2] traduisent des difficultés de prise en charge liées principalement à leur résistance aux différentes familles d'antibiotiques les plus fréquemment utilisées en thérapeutique telles que les bêtalactamines[3]. Ces derniers ; demeurent les antibiotiques les plus utilisés dans la pratique clinique courante, cette large utilisation est principalement liée à leur faible toxicité, à leur pouvoir bactéricide et à la diversité des molécules[4].

L'usage intensif et souvent abusif de ces antibiotiques et la capacité des bactéries à échanger du matériel génétique dans des conditions de pressions d'antibiotiques ont été rapidement suivi par l'apparition de souches multi résistantes notamment des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G.

La propagation de ces souches multirésistantes en Algérie et à l'échelle mondiale[5]. associée au faible nombre de nouveaux antibiotiques, fait courir la menace de cas de plus en plus fréquents d'impasses thérapeutiques.

Afin de lutter contre la multiplication de ces situations, et l'apparition d'une épidémie mondiale, il est nécessaire de préserver le plus longtemps possible l'efficacité des antibiotiques déjà disponibles. Dans ces conditions, la connaissance de la fréquence des infections nosocomiales et communautaires dues aux entérobactéries résistantes aux C3G, ainsi que la détermination de leurs profils de résistance aux antibiotiques, représentent un atout majeur pour mettre en jeu des méthodes de prévention d'efficacité prouvée.

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude effectuée au laboratoire de Microbiologie du CHU de Tizi Ouzou, qui a pour objectif de déterminer la fréquence d'isolement des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G ainsi que leur profil de sensibilité aux autres familles d'antibiotiques et d'étudier l'évolution de leur résistance.



*Partie Théorique*



*Chapitre I :*

*Généralités sur*

*les entérobactéries*

## 1. Historique

La naissance de la famille des *Enterobacteriaceae* a lieu en 1937 lorsqu'Otto RAHN proposa le genre *Enterobacter* pour regrouper les microorganismes présentant des propriétés biochimiques et morphologiques communes et parmi lesquelles on trouvait déjà des noms tels qu'*Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia* ou *Shigella*.

Deux années après cette description qui concernait 112 espèces, ce nombre fut ramené à 67.

Avec les travaux de Don Brenner et de Patrick Grimont[6], cette famille a connu un essor et beaucoup de nouveaux genres et espèces furent découvertes.

En 1972, Edwards et Ewing rapportaient 11 genres et 26 espèces dans la famille des *Enterobacteriaceae*.

En 1985, Farmer et al décrivaient 22 genres comprenant 69 espèces et 29 groupes entériques.

En 1997, 31 genres et 139 espèces étaient caractérisés[7].

## 2. Classification

Les entérobactéries appartiennent à une vaste famille qui regroupe plusieurs genres, espèces et sérotypes. Sur le plan taxonomique, cette famille comporte actuellement plus de 31 genres et plus de 139 espèces[7].

Récemment, l'application de nouvelles techniques telles que l'hybridation de l'ADN a entraîné de nombreux changements dans la classification des entérobactéries, de nombreux nouveaux genres et espèces ont été découvert, certains inhabituels et rares, et de nombreuses espèces ont également été reclassées dans d'autres genres[8].

Les entérobactéries appartiennent au

Domaine : *Bacteria*,

Embranchement : *Proteobacteria*,

Classe : *Gammaproteobacteria*,

Ordre : *Enterobacterales*,

Famille : *Enterobacteriaceae*,

Les espèces les plus communément isolées en bactériologie clinique appartiennent aux genres *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia* [9].

Tribu	Genre	Espèce
Escherichiae	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>
	<i>Salmonella</i>	<i>Typhi</i> <i>paratyphi A et C</i> <i>enteritidis</i>
	<i>Shigella</i>	<i>dysenterie</i> <i>sonnei</i> <i>flexneri</i> <i>boydii</i>
	<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i> <i>koseri</i>
Klebsiellae	<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i> <i>pneumoniae</i> <i>ozaenae</i> <i>rhinoscleromatis</i>
	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i> <i>aoerogenes</i>
	<i>Serratia</i>	<i>Marcesens</i>
Proteae	<i>Proteus</i>	<i>Vulgaris</i> <i>mirabilis</i> <i>penneri</i> <i>rettgerii</i>
	<i>Providencia</i>	<i>Rettgeri</i> <i>stuartii</i> <i>alcalificiens</i>
	<i>Morganella</i>	<i>Morganii</i>
Yersiniae	<i>Yersinia</i>	<i>Enterolitica</i> <i>pestis</i> <i>pseudotuberculosis</i> <i>yersinia</i>

Tableau I : Classification des principales espèces d'entérobactéries isolées au laboratoire de bactériologie médicale[9].

### 3. Habitat

Les entérobactéries sont des bactéries ubiquitaires avec un habitat très large, Ce sont des hôtes normaux ou pathologiques du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux à sang chaud relativement peu rencontrés dans d'autres sites du corps. Cette localisation digestive n'est pas exclusive. Les entérobactéries sont également retrouvées dans l'environnement (sol, eau...) et sur les végétaux[10].

### 4. Caractères bactériologiques

#### 4.1 Caractères morphologiques

Les entérobactéries ont une morphologie habituellement typique de type bacilles ou coccobacilles à Gram négatif de 2 à 4 $\mu$  de long sur 0,4 à 0,6 $\mu$  de large. Généralement polymorphes, de nombreuses espèces sont mobiles grâce à une ciliature péritriche, d'autres sont immobiles (*Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia pestis*). La présence d'une capsule visible au microscope est habituelle chez les *Klebsiella*[11]. La plupart des espèces pathogènes pour l'homme possèdent des fimbriae ou pili qui sont des facteurs d'adhésion[12].

#### 4.2 Caractères cultureux

Les Entérobactéries se développent rapidement in vitro sur des milieux ordinaires. La température optimale de croissance est 37 °C en aérobiose et en anaérobiose. Certains genres sont thermodépendants et ne poussent pas à 37°C tels que: *Yersinia enterocolitica*, la culture est possible entre 20 et 40 °C pendant 24 h. Leurs exigences nutritionnelles sont, en général, réduites et la plupart se multiplient en milieu synthétique avec une source de carbone simple comme le glucose. Ce sont des germes mésophiles et neutrophiles (pH optimum voisin de 5,5 - 8)[13,14].

Les Entérobactéries se développent bien sur les milieux de base, Les milieux se présentent sous forme liquide ou sous forme solide. Par addition dans les milieux liquides d'un agent

solidifiant (l'agar-agar), le milieu liquide de base est représenté par le bouillon nutritif ordinaire qui se compose de trois composants principaux, les peptones, les extraits de viande et les extraits de levure[15].

Les milieux d'isolement sont des milieux solides qui permettent d'effectuer les tests d'identification ou d'étudier la sensibilité aux antibiotiques. Pour les bactéries non exigeantes comme les Entérobactéries on utilise les géloses de base qui sont constituées par les géloses nutritives ordinaires, les géloses tryptone soja (ou trypticase soja). Parmi Les milieux sélectifs utilisé pour l'isolement des entérobactéries pathogènes sont : le milieu de MacConkey (a recherche d'E. coli O157:H7), La gélose Hektoen, la gélose SS, La gélose XLD (xylose, lysine, désoxycholate) et La gélose au désoxycholate citrate (pour l'isolement des Salmonella et des Shigella)[15].

Sur gélose, on peut obtenir différente formes :

- Les formes S (smooth) : sont l'aspect habituel. Les colonies sont lisses, bombées, brillantes et humides, elles sont à 2 à 4 mm de diamètre ;
- Les formes R (rough) : s'observent surtout avec les souches ayant subi plusieurs repiquages. Les colonies sont rugueuses, sèches, à contours irréguliers et de teinte mate. En bouillon, les formes R donnent un aspect grumeleux ;
- Les colonies naines : s'observent avec des souches déficientes dans certaines de leurs chaînes métaboliques. Elles ne sont pas exceptionnelles chez E. coli isolé d'infections urinaires[13] ;
- Formes M (muqueuses): Les colonies sont plus grosses (le diamètre peut dépasser 10 mm); elles ont une tendance à la confluence. Certaines bactéries on toujours cet aspect tel que: les *Klebsiella*. On peut les rencontrer aussi avec d'autres espèces, comme Salmonella paratyphi B[6].

Sur un milieu liquide comme un bouillon nutritif la croissance apparaisse comme un trouble homogène[16].

### 4.3 Caractères biochimiques

L'identification des *Enterobacteriaceae* repose sur l'étude des caractères essentiellement "biochimiques" et utilisent des tests qui étudient le métabolisme protéique (présence d'uréase, production d'indole, dégradation du tryptophane) ou la fermentation des sucres (glucose, lactose, saccharose etc..), la capacité d'utiliser le citrate, la présence d'enzymes (décarboxylases, désaminases), la production d'hydrogène sulfuré ou la formation de gaz[17].

La famille des Entérobactéries est apte à fermenter le glucose (respiration aérobie le plus souvent et fermentation en anaérobiose), capable de réduire les nitrates en nitrites car elle dispose d'un complexe enzymatique appelé la nitrate réductase (ex : *Klebsiella sp* contrairement à d'autres ex : *Yersinia sp*, *Shigella sp*). Les Entérobactéries ont une catalase positive mais dépourvues d'oxydase[17].

	Glu	Lac	ONPG	Ind	VP	Cit	Mob	Urée	PDA	H2S
<i>Escherichia</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>Citrobacter</i>	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+/-
<i>Enterobacter</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>Klebsiella</i>	+	+	+	+/-	+	+	-	+	-	-
<i>Serratia</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>Salmonella</i>	+	-	-	-	-	+/-	+	-	-	+
<i>Shigella</i>	+	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus</i>	+	-	-	+/-	-	+/-	+	+	+	+/-
<i>Providencia</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
<i>Yersinia</i>	+	-	+	+/-	+	-	+	+	-	-

Tableau II : Principaux caractères biochimiques des Entérobactéries[18].

#### 4.4 Caractères antigéniques

Les Entérobactéries, comme tous les bacilles à Gram négatif portent certains antigènes sur leur paroi :

- **Antigènes O** : ce sont des endotoxines des bactéries à Gram négatif. Ils sont composés de lipo-polysaccharides (LPS) qui sont thermostables, résiste à l'alcool ou l'acide et très toxiques ;

- **Antigènes K** : ces antigènes capsulaires sont de nature polysaccharidique qui entoure la paroi de certaines entérobactéries. Parmi les antigènes K, se trouvent les antigènes L, A, B des *E. coli*, des *Shigelles* et l'antigène Vi de certaines *Salmonella* ou *Citrobacter*. Ces antigènes peuvent rendre la souche qui les possède inagglutinable par les antisérums O. Ils sont détruits par une ébullition de deux heures. Les antigènes d'adhérence ou adhésines, de nature protéique, en relation avec la présence de pili communs encore appelées fimbriae sont classés parmi les antigènes K (K88, K99) ;

- **Antigènes H** : ce sont des antigènes flagellaires qui ne sont pas toxiques. Ils ne sont donc présents que chez les souches mobiles. Constitués d'une protéine (flagelline), ils sont thermolabiles et inactivés par l'alcool. Les réactions d'agglutination se produisent rapidement, et sont constituées d'agglutinats floconneux, facilement dissociables par agitation ;

- **Antigène Kunin**(Ou antigène Enterobacterial Common Antigen) : cet antigène commun aux *Enterobacteriaceae* n'est pratiquement retrouvé que dans cette famille et a un intérêt taxonomique. Sa présence chez les *Yersinia* a permis d'inclure ce genre dans la famille des entérobactéries[19].

#### 5. Facteurs de virulence

Les souches pathogènes diffèrent des souches commensales par l'expression des facteurs de virulence dont les gènes sont le plus souvent situés sur des plasmides. On distingue :

-Antigènes d'adhésion ou adhésines : représentés par les fimbriae qui permettent à la bactérie d'adhérer aux cellules (urinaires, entérocytes) ;

-Toxines : Il existe de nombreux types des toxines, certaines sont voisines de celles des Shigelles (Shiga-liketoxin) appelées SLT, ce sont de puissantes cytotoxines qui disséminent par voie sanguine et inhibent la synthèse protéique par hydrolyse de l'ARN ribosomal (produites par EHEC), d'autres sont voisines de celles du vibron cholérique ;

-La capsule : empêche les Entérobactérie d'être phagocytées par le système immunitaire exemple :( la fraction 1 ou antigène 1 de *Yersinia pestis*) ;

-Le lipopolysaccharide (LPS) : un lipoglycane ancré dans le feuillet externe de presque tous les bacilles à gram négatif, il présente une forte activité pro inflammatoire et joue un rôle majeur dans la virulence des BGN. Il joue aussi un rôle important dans la survenue des nécroses et des hémorragies tissulaire, exemple : *Yersinia pestis* ;

-Enzymes inactivant les antibiotiques : qui confèrent un mécanisme de résistance aux bactéries. Les plus connues sont les beta-lactamases (pénicillinases, céphalosporinases et les enzymes inactivant les aminosides[20].

## 6. Le pouvoir pathogène des entérobactéries

Les espèces d'entérobactéries pathogènes possèdent une grande variabilité dans leur comportement et leur agressivité chez l'hôte. On distingue alors deux groupes d'entérobactéries pathogènes : les pathogènes strictes et les pathogènes opportunistes[20].

### 6.1 Les entérobactéries pathogènes strictes

Leurs présence dans l'organisme est anormale quel que soit leur nombre et entraînent souvent une infection dont la gravité dépend de leur point d'entrée. Introduite par un aliment contaminé, elles provoqueront des troubles intestinaux en adhérant sur la muqueuse intestinale puis en traversant la barrière entérocytaire. Les symptômes se caractérisent souvent par des diarrhées importantes suivit d'une déshydratation (grave chez le nourissant).

Certaines espèces provoquent des pathologies spécifiques :

- L'espèce *Salmonella typhi* responsable de la fièvre typhoïde.
- L'espèce *Shigella dysenteriae* responsable de la dysenterie bacillaire.
- L'espèce *Yersinia pestis* responsable de la peste.
- L'espèce *Escherichia coli* entéropathogènes responsable de gastro-entérite infantile.

Ces germes entéropathogènes sont agressifs par eux-mêmes, leur identification est donc capitale [20].

## 6.2 Les entérobactéries pathogènes opportunistes

Les entérobactéries opportunistes ne disposent pas d'un pouvoir pathogène suffisant pour déclencher une pathologie chez un hôte sain. Elles sont en revanche susceptibles de déclencher une infection chez un sujet immunodéprimé comme des septicémies surtout en milieu hospitalier (par exemple *Serratia*, *Klebsiella* ...etc.) ce qui les a mis sur les mêmes pieds que d'autres germes d'hôpitaux tel que le *Staphylococcus* et le *Pyocyanique*. Elles peuvent être présentes dans l'intestin et faire partie intégrante de sa flore commensale, c'est ainsi l'espèce *Escherichia coli* est responsable d'infection urinaire (en particulier chez la femme) lors de, par exemple, constipations chroniques.

L'espèce *Klebsiella pneumoniae* est parfois responsable d'infections respiratoires [20].

## 7. Diagnostic bactériologique des infections à entérobactéries

### 7.1 Prélèvement

Le prélèvement dépend du site de l'infection : selles, urines, liquide céphalorachidien, pus ...

C'est une étape très importante dans la démarche du diagnostic : la qualité de prélèvement conditionne le bon résultat[15].

### 7.1.1 Les conditions de prélèvement

- Les prélèvements doivent être réalisés de préférence avant toute antibiothérapie et dès le début du processus infectieux ;
- Les prélèvements sont réalisés avec du matériel stérile à usage unique ;
- Ils sont faits par un personnel qualifié ;
- Le préleveur doit étiqueter les récipients contenant l'échantillon biologique au moment du prélèvement, de façon à éviter toute erreur sur l'identité du malade[21].

### 7.1.2 Acheminement au laboratoire et fiche de renseignement

Les échantillons doivent être acheminés au laboratoire dans un sac hermétique, dans un délai maximal de 2 heures à température ambiante. Si ce délai est dépassé, il est recommandé d'utiliser un milieu de transport, accompagnés d'une feuille de renseignements cliniques, sur laquelle sont mentionnées les Informations essentielles pour la prise en charge et l'interprétation de l'examen, à savoir :

- Identité du malade ;
- Identification du type d'infection et de sa localisation ;
- Modalités de prélèvement ;
- Contexte clinique global (âge, état immunitaire, diabète, corticothérapie, etc.) ;
- Traitement antibiotique éventuel[15].

## 7.2 Examen cyto bactériologique du prélèvement

### 7.2.1 Examen macroscopique

L'examen macroscopique de prélèvement constitue un critère d'orientation et permet dans certains cas de s'assurer de la conformité du prélèvement. Cet examen permet de mettre en

évidence tous changement visuels au niveau de caractères physiologiques de chaque prélèvement tels que aspect, la couleur, la consistance[22].

### 7.2.2 Examen microscopique

L'examen microscopique est une étape clé dans la démarche diagnostique des infections bactériennes .il se déroule en deux phases :

#### • Etat frais

L'examen direct à l'état frais consiste à observer le prélèvement entre lame et lamelle à objectif 40, sans fixation préalable par la chaleur ou l'alcool. Il permet de :

-Visualiser certain caractères bactériennes : la forme et mobilités des bactéries, Les entérobactéries sont immobiles ou mobiles par une ciliature péritriche ;

-Evaluer l'abondance des germes ;

-Faire une étude cytologique de prélèvement (énumération cellulaire) et aussi de visualiser autres constituants comme par exemple : les hématies, leucocytes, les cellules épithéliales, les débris[15].

#### • Examen microscopique après coloration

Les techniques les plus communément utilisées au laboratoire de bactériologie médicale font appel à des colorations. Sur un frottis fin confectionné à partir du prélèvement ou du culot de cyto centrifugation, sont réalisées les colorations suivantes (technique voir annexe I).

- **Coloration de Gram** : elle permet de classer les bactéries en deux catégories (Gram+ ou Gram-) selon leur affinité tinctoriale, et permet aussi de visualiser la morphologie et mode de regroupement des bactéries. Les entérobactéries se présentent sous formes de bacilles ou coccobacilles à Gram négatif.

- **coloration au bleu de méthylène** : La coloration au bleu de méthylène (BM) est une coloration très simple qui permet d'observer les bactéries, les champignons, mais aussi les cellules qui sont en général mieux conservées qu'avec la coloration de gram. Elle permet de renseigner sur :

- La forme des bactéries ;
- La taille ;
- Le mode de regroupement[23].

### 7.2.3 Culture et isolement

Les entérobactéries se développent facilement sur la plupart des milieux gélosés utilisés en routine au laboratoire de bactériologie médicale, notamment les milieux suivants: le MacConkey, le pourpre de bromocrésol« BCP ».

Les entérobactéries les plus fréquemment isolées ont un aspect caractéristique sur gélose au sang ou gélose de MacConkey utile pour l'identification présomptive. Certains milieux sélectifs comme le milieu Salmonelle-Shigelle (SS) sont habituellement proposés pour la culture des pathogènes entériques du tractus gastro-intestinal.

La majorité des entérobactéries se développent en 18 à 24 heures dans des conditions de cultures habituelles (incubation à 37°C en aéro-anaérobiose). Seule *Yersinia pestis* fait exception car elle se développe mieux entre 25 et 30°C qu'à une température de 37°C.

Sur des milieux de culture gélosés, les entérobactéries forment des colonies généralement de grande taille (1,5 à 3 mm), rondes, lisses et bombées. Les colonies de *Klebsiella* et d'*Enterobacter* peuvent apparaître muqueuses du fait de la présence d'une capsule polysaccharidique.

Des espèces très mobiles comme *Proteus mirabilis* et *Proteus vulgaris* peuvent être capables d'envahir la gélose au sang ou chocolat en formant un film fin à la surface de la gélose. Les milieux déficients en électrolytes comme le milieu CLED empêchent ce phénomène[24].

Plusieurs milieux sont utilisés pour la culture des entérobactéries (voir annexe II).

## 7.2.4 Identification des entérobactéries

### 7.2.4.1 Identification biochimique

#### A. Tests d'orientation

- **Recherche de catalase**

Une réaction positive se traduit par la formation des bulles d'air grâce à la libération de l'oxygène[15].

Technique : voir annexe III.

Toutes les entérobactéries possèdent une catalase sauf l'espèce *Shigella dysenteriae* [15].

- **Recherche de l'oxydase**

Ce test est essentiel pour orienter l'identification des entérobactéries. Il permet la détection de l'enzyme cytochrome oxydase en utilisant le N diméthylparaphénylène diamine (PDA) comme réactif. Les bactéries possédant cette enzyme sont capables d'oxyder la forme réduite et incolore du PDA en sa forme oxydée rose violacée.

Le réactif peut être soit en solution soit imprégné sur des disques (disques oxydases) [15].

- **Recherche de nitrate réductase**

Les bactéries qui possèdent l'enzyme nitrate réductase sont capables de réduire les nitrates  $\text{NO}_3^-$ , soit jusqu'au stade nitrite  $\text{NO}_2^-$ , soit jusqu'au stade diazote gazeux  $\text{N}_2$ . (Technique voir annexe III) [15].

Les entérobactéries transforment les nitrates en nitrites.

## **B. Galerie d'identification biochimique**

### **✓ Les galeries API**

Les tests biochimiques effectués en tubes sont actuellement remplacés par des tests miniaturisés en galerie.

La galerie destinée à l'identification des entérobactéries est la galerie API 20<sup>E</sup> de bio Mérieux, c'est un système standardisé, prêts à l'emploi, elle se présente sous forme d'une série de petits tubes « 20 micro-tubes », chaque tubule correspond à un test biochimique spécifique et contient un substrat défini (permet de réaliser 23 tests biochimiques qui mettent en évidence les métabolismes bactériens). Elles sont utilisées en diagnostic in vitro pour la classification, la détermination et l'identification bactérienne des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif. (Technique voir annexe V) [25].

## **C. Méthodes automatisées d'identification**

Actuellement, les tests biochimiques d'identification sont réalisés sur des automates qui permettent aussi la réalisation des antibiogrammes pour la plupart des germes courants.

Parmi ces systèmes automatisés :

- Les systèmes Vitek technology

Le système VITEK 2 compact est destiné à l'identification des bactéries et levures, ainsi qu'à la réalisation d'antibiogrammes pour les bactéries significatives au plan clinique.

Le système comprend l'instrument VITEK 2 compact, un ordinateur et une imprimante. Le logiciel fourni par le système VITEK 2 compact inclut des programmes d'analyses, de gestion de données et un système de contrôle de qualité afin de valider le kit test du VITEK 2 compact. (Mode opératoire voir annexe V).

Ce système utilise des cartes plastiques renfermant des microcupules, chaque cupule contenant un substrat spécifique déshydraté . une quarantaine de substrats sont testés . La lecture est colorimétrique [15].

#### 7.2.4.2 Identification antigénique(Sérotypage)

Le Sérotypage permet l'identification des sérotypes bactériens en utilisant la méthode d'agglutination basée sur l'utilisation des antisérums polyvalents et monovalents dirigés contre les antigènes bactériens (l'antigène O, H et Vi).Une réaction positive se traduit par la formation d'un complexe antigène-anticorps visible à l'œil nu (agglutination).

Le sérotypage est appliqué aux espèces qui expriment différents sérotypes comme *E. coli*, les espèces de *Salmonella*, *Shigella* et de *Yersinia* [26].

#### 7.2.4.3 Méthodes moléculaires d'identification

Diverses méthodes d'identification rapide ont été développées telles que les réactions de polymérisation en chaîne (PCR).

La PCR est généralement considérée comme une bonne méthode de détection bactérienne car elle est simple, rapide, sensible et spécifique. Elle a été utilisée avec succès pour l'identification de plusieurs espèces des Enterobacteriaceae telles que *E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.mirabilis*.... Elle a également été utilisée pour détecter les gènes de virulence de *Yersinia enterocolitica* et *Y.pseudotuberculosis*.

Toutefois, ces méthodes restent accessibles seulement aux laboratoires de référence car elles sont difficiles à mettre en œuvre pour l'identification bactérienne de routine dans un laboratoire clinique [8].

Principe Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) : voir annexe V.

#### 7.2.4.4 Identification par Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse fondée sur la technologie MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Désorption Ionisation-time-of-flight) est apparue comme une nouvelle technique pour l'identification des espèces bactériennes par comparaison des profils de pics protéiques obtenus avec ceux inclus dans une banque de profils.

Elle présente l'intérêt majeur d'être très rapide et sensible. Cette méthode a été utilisée pour faciliter la détection et l'identification des espèces de *Salmonella* et du complexe *Enterobacter cloacae*. Elle a également la capacité de distinguer avec précision les deux organismes cliniquement importants et génétiquement très similaires *Y.pestis* et *Y.pseudotuberculosis*.

L'une des limites de cette méthode est l'incapacité à distinguer de manière fiable les isolats d'*E. Coli* pathogènes et non pathogènes. De plus, la différenciation des souches d'*E.coli* pathogènes des espèces de *Shigella* est difficile en raison de l'étroite parenté génétique entre les organismes [8].

#### 7.2.5 Tests de sensibilité aux antibiotiques

##### A) L'antibiogramme : diffusion en milieu gélosé

L'antibiogramme ou méthodes de diffusion en milieu gélosé permet de mesurer la sensibilité d'une souche bactérienne pure à un ou plusieurs antibiotiques, c'est une technique rapide basée sur l'observation de la croissance bactérienne en présence d'un gradient de concentration des antibiotiques obtenu après diffusion à partir du disque.

Le principe de base de cette méthode consiste à déposer différents disques de papier buvard imprégnés d'une concentration donnée d'antibiotique à la surface d'une gélose spécifique qui a été préalablement ensemencée d'une suspension bactérienne standardisée. Chaque antibiotique testé diffuse dans la gélose et peut inhiber la croissance de la souche en créant un cercle plus ou moins grand autour du disque selon son niveau de sensibilité. Après 24 h

d'incubation à 35 °C, le diamètre de la zone d'inhibition de croissance autour de chaque disque d'antibiotique est mesuré et interprété.

Il permet de classer la souche dans la catégorie sensible, intermédiaire ou résistante à l'antibiotique testé [27].

- Sensible : La CMI est inférieure à la concentration critique minimale pouvant être atteinte in vivo par le traitement antibiotique. La souche peut être éliminée en utilisant la dose habituellement recommandée ;

- Intermédiaire : La CMI est comprise entre les deux concentrations critiques. La souche pourrait être atteinte en augmentant la dose habituelle recommandée ;

- Résistante : La CMI est supérieure à la concentration critique maximale pouvant être atteinte in vivo sans dépasser le seuil toxique. La souche ne pourra probablement pas être éliminée peu importe le traitement administré [27].

- Technique : voir annexe VII.

## **B) Méthodes de détermination des CMI**

- **Méthode de dilution en milieu liquide**

Cette méthode permet de mesurer précisément la CMI. Pour ce faire, un volume constant de bouillon nutritif est réparti dans une dizaine de tubes. Un inoculum d'une suspension bactérienne standardisée et des dilutions doubles d'un antibiotique sont ensuite ajoutés dans chacun des tubes. Après 24 h d'incubation à 35 °C, le premier tube dans lequel il n'y a plus de croissance bactérienne visible dans le milieu de culture indique la valeur de la CMI en pg/mL.

La méthode de dilution en milieu liquide peut aussi être réalisée dans des microplaques à 96 puits. Elle est connue sous le nom de « technique de micro dilutions».

Ses principaux avantages sont pour permettre de tester la sensibilité bactérienne à plusieurs antibiotiques simultanément, de réaliser des économies de réactifs et d'espace et la commodité d'avoir des microplaques préparées disponibles commercialement [28].

- **Méthode de dilution en milieu gélose**

La méthode de dilution en milieu gélose permet également de mesurer la CMI. La technique consiste à préparer une série de géloses contenant une concentration croissante d'un antibiotique donné. Plusieurs souches bactériennes peuvent être ensemencées sur ces géloses sous la forme de stries parallèles. Après 24 h d'incubation à 35 °C, la valeur de la CMI est déterminée. Elle correspond à la première concentration d'antibiotique qui inhibe la croissance bactérienne sur la gélose. La CMI pour chaque souche étudiée est ensuite comparée aux concentrations critiques et permet d'être classée dans une catégorie de résistance.

- **Système E-test®**

Le principe des bandelettes E-test® se base sur les méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide. La technique est à la fois facile et rapide à réaliser. Elle requière l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient de concentrations d'antibiotique permettant de déterminer la CMI de la souche à étudier. Pour ce faire, chaque bandelette d'antibiotique à tester est appliquée directement sur un tapis bactérien. Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse dont les points d'intersection avec la bandelette indiquent la valeur de la CMI[28] .

### **7.3 Diagnostic indirect**

Le diagnostic indirect (sérodiagnostic) repose sur la détection de la production des anticorps par l'organisme. Deux examens sérologiques à deux semaines d'intervalles sont demandés pour mettre en évidence une séroconversion.

Divers techniques sont utilisées pour déceler la présence des anticorps :

- Technique immunoenzymatique ELISA ;
- Réaction d'agglutination : par exemple le sérodiagnostic de Widal –Felix ;
- Technique d'immunofluorescence[22] .

Différents méthodes sont évoquées pour la réalisation du diagnostic indirect des infections causées par les entérobactéries. La méthode la plus utilisée est celle de l'agglutination en tube qui constitue le sérodiagnostic de WIDAL et FELIX[29] :

cette méthode permet le diagnostic de la fièvre typhoïde et paratyphoïdique, il s'agit de rechercher dans le sérum des malades les agglutinines correspondant aux antigènes somatiques O et aux antigènes flagellaires H de *salmonella typhi* et *salmonella paratyphi* A.B.C[30].



*Chapitre I I :*

*La résistance des entérobactéries  
aux antibiotiques*

## 1. Généralités sur les antibiotiques

### 1.1 Définition

On appelle « antibiotique » toute substance naturelle d'origine biologique élaborée par un organisme vivant, substance chimique produite par synthèse ou substance semi synthétique obtenue par modification chimique d'une molécule de base naturelle ayant les propriétés suivantes :

- Activité antibactérienne ;
- Activité en milieu organique ;
- Une bonne absorption et bonne diffusion dans l'organisme [31].

### 1.2 Classification

Les antibiotiques peuvent être classés selon leurs :

- Origine : naturelle, semi-synthétique ou synthétique.
- Spectre d'activité : les antibiotiques sont actifs sur les bactéries à Gram positif ou à Gram négatif (spectre étroit) ou sur les deux à la fois (spectre large).
- Structure chimique: très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle  $\beta$  lactame) sur laquelle il y a hémi- synthèse.
- Mode d'action : la plus courante[32].

### 1.3 Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques agissent sur les bactéries de diverses manières.

#### 1.3.1 Action sur la paroi bactérienne

Le peptidoglycane, constituant principal de la paroi bactérienne représente une cible pour certains antibiotiques qui bloquent sa voie de biosynthèse et donc la formation de la paroi

bactérienne, cette dernière est un composant essentiel qui joue un rôle dans le maintien de la forme des bactéries et la protection de celle-ci contre la pression osmotique.

Exemples : Les bêta-lactamines ont pour cible les enzymes intervenant dans la dernière étape (la transpeptidation) de la synthèse du peptidoglycane qui compose la paroi bactérienne. Ces enzymes sont appelées PLP (protéines liant la pénicilline) ou PBP (penicillinbindingproteins). En se fixant sur les PLP par analogie structurale avec le substrat de ces enzymes, les bêtalactamines bloquent la transpeptidation et inhibent ainsi la réticulation du peptidoglycane. Ce dernier n'est alors plus apte à résister aux pressions osmotiques qui entraînent la lyse bactérienne. La mort cellulaire est accélérée par la bactérie elle-même qui produit des autolysines capables de détruire la paroi déjà existante[33].

Autre molécules : Glycopeptide, fosfomycine[34].

### 1.3.2 Action sur la Membrane bactérienne

La colistine et la polymyxine B ont une activité antimicrobienne principalement dirigée contre la membrane cellulaire bactérienne.

Les polypeptides cationiques de la colistine et de la polymyxine B interagissent avec un lipopolysaccharide anionique (LPS) dans la membrane externe des molécules Gram-négatives ce qui entraîne le déplacement du calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et du magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) qui stabilisent la membrane du LPS, provoquant ainsi un dérèglement de la membrane cellulaire et donc une augmentation de la perméabilité de cette dernière, la fuite du contenu des cellules, et finalement la mort cellulaire [35].

### 1.3.3 Action sur la synthèse protéique

Certains antibiotiques agissent sur la synthèse protéique plus particulièrement sur le ribosome qui est un complexe composé de protéines et d'ARN, permettant la fabrication de protéines par décodage de l'ARN messager. Il est composé de deux sous-unités : la petite appelée 30S (ARNr 16S + 21 protéines) et la grosse sous-unité 50S (ARNr 23S et 5S + 34 protéines).

Exemple : les aminosides se fixent sur le ribosome spécifiquement au site A de l'ARN ribosomal 16S qui compose le ribosome bactérien 30S et provoquent la fixation d'un ARN transfert incorrect sur l'ARN messager ce qui induit la synthèse de protéines erronées [36].

Le linézolide est un antibiotique synthétique qui empêche la synthèse de protéines bactériennes en se liant à l'ARNr des sous-unités ribosomiques 30S et 50S. Il inhibe la formation du complexe d'initiation, ce qui peut réduire la longueur des chaînes peptidiques développées et diminuer la vitesse de traduction [37].

### 1.3.4 Action sur les acides nucléiques

Certains antibiotiques ont une action directe ou indirecte sur l'ADN bactérien et empêchent le phénomène de synthèse de nouvelles molécules d'ADN ou sa réplication et la transcription.

Exemple : Les quinolones pénètrent dans le cytoplasme par la voie des porines et par diffusion passive. Leurs cibles intra cytoplasmiques sont les topo-isomérases de type II : ADN-gyrase et topoisomérase IV, 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 [38].

## 2. La résistance

### 2.1 Définitions

#### 2.1.1 Résistance bactérienne

Elle résulte de l'aptitude de certaines bactéries à supporter l'attaque des antibiotiques, de sorte que les traitements classiques deviennent inefficaces et que les infections persistent et accroissent le risque de propagation[39].

Il existe un grand nombre de définitions pour l'expression « résistance bactérienne aux antibiotiques », qui sont basées sur différents critères (génétiques, biochimiques, microbiologiques et cliniques) et qui ne se chevauchent pas forcément. Les définitions les plus

fréquemment employées se fondent sur les critères microbiologiques (résistance in vitro) et sur les critères cliniques (résistance in vivo)[40].

### **A. Définition microbiologique**

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 et développée en laboratoire à partir d'individus prélevés dans la nature, d'une même espèce ou d'un même genre, cultivées dans les mêmes conditions[40].

### **B. Définition clinique**

Selon la définition clinique, une souche est qualifiée 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, ainsi que l'état du système immunitaire de l'individu traité. Et nombreuses sont les situations où le composé ne pourra pénétrer ou agir au niveau du site infectieux[40].

#### **2.1.2 Bactérie multirésistante**

Les Bactéries multirésistantes aux antibiotiques (BMR) sont des bactéries qui conjuguent plusieurs mécanismes de résistance à aux moins trois familles majeures d'antibiotiques, ce qui limite les possibilités thérapeutiques en cas d'infection [41].

Des termes définis sont utilisés pour décrire l'étendue de la résistance :

-La résistance étendue aux médicaments est une résistance à au moins un agent dans toutes les catégories d'antibiotiques sauf deux ou moins ;

-La pan-résistance ou toto-résistance (BPR ou BTR) est une résistance à tous les agents de toutes les catégories d'antibiotiques [42].

## **2.2 types de résistance**

### **2.2.1 Résistance naturelle ou intrinsèque**

Elle se définit comme une caractéristique fonctionnelle ou structurelle conférant une certaine tolérance, voir une insensibilité totale, à tous les membres d'un groupe de bactéries (une espèce, un genre ou parfois un groupe plus grand), vis-à-vis d'une molécule particulière ou vis-à-vis d'une classe antimicrobiens[40].

La résistance bactérienne naturelle est permanente, d'origine chromosomique et transmise à la descendance (transmission verticale) lors de la division cellulaire. Elle constitue un critère d'identification stable d'une espèce et délimite le spectre d'action des antibiotiques [43].

### **2.2.2 Résistance acquise**

La résistance acquise ne concerne qu'une partie des souches d'une espèce bactérienne. Les bactéries peuvent développer de la résistance à un antibiotique préalablement sensible, ce qui implique des changements génétiques. Cette résistance est souvent instable. Ces changements peuvent être de deux types: soit une mutation spontanée ,soit l'acquisition de gènes par un autre micro-organisme[43].

## **2.3 Mécanismes génétique de la résistance**

Deux mécanismes peuvent expliquer ce phénomène :

### **2.3.1 Résistance chromosomique**

Les résistances bactériennes par mutation chromosomique entraine une modification à l'échelle moléculaire qui touche: soit une diminution de la perméabilité de la paroi ou de la

membrane cellulaire perturbant ainsi le transport de l'antibiotique, soit une modification des cibles intracellulaires qui deviennent insensibles à l'action de l'antibiotique et soit à la modification de la synthèse d'enzymes naturelles, qui sont alors produites à forte concentration [44].

La résistance chromosomique est :

- Spontanée : préexiste même avant l'utilisation de l'antibiotique ;
- Rare : puisqu'il intervient en moyenne tous les 10<sup>5</sup> à 10<sup>10</sup> divisions de la bactérie ;
- Aléatoire : car l'antibiotique n'est pas une molécule mutagène donc n'induit pas de mutation chez la bactérie mais il révèle et sélectionne bactéries mutantes ;
- Spécifique : affecte un antibiotique ou une famille d'antibiotiques qui ont le même mécanisme d'action ;
- Indépendance : La probabilité de deux mutations simultanées est égale au produit du taux de mutation et elle est donc très faible. Cette indépendance des mutations constitue un des meilleurs arguments pour justifier l'association des antibiotiques ;
- Stable : transmissible verticalement[42,45].

### 2.3.2 Résistance extra-chromosomique

Ce type de résistance est caractérisé par sa :

- Fréquence : 80% des résistances acquises ;
- Transmission horizontale ;

Il s'agit ici de la résistance par un gain d'ADN extra-chromosomique le plus souvent un plasmide, Ces fragments d'ADN peuvent être transmis d'une bactérie donneuse à Une autre bactérie dite receveuse, cette transmission peut se faire entre deux espèces différentes de bactéries.

A travers ce mécanisme, on se trouve face à une facilité d'acquisition de résistance et même de multirésistance contrairement à celle acquise par mutation.

Ce mode d'acquisition de résistance peut se faire selon trois mécanismes différents :

- La transduction : le transfert des gènes via les bactériophages ;

- La transformation : l'incorporation par une bactérie des fragments d'ADN libérés par d'autres bactéries ;

-La conjugaison : transfert de plasmide d'une bactérie à une autre qui peut être d'espèce différente[42].

### 3. Résistance des entérobactéries aux antibiotiques

#### 3.1 Résistance naturelle des entérobactéries aux antibiotiques

##### 3.1.1 Résistance naturelle aux bêtalactamines

six groupes d'entérobactéries sont définis sur la base du phénotype de résistance naturelle aux  $\beta$ -lactamines :

##### Le groupe 0 et 1

Le groupe 0 inclut les entérobactéries ne possédant aucun gène codant pour une  $\beta$ -lactamase et donc naturellement sensibles à toutes les  $\beta$ -lactamines testées : le genre *Salmonella* et l'espèce *Proteus mirabilis*.

Le groupe 1 (céphalosporinase constitutive de très bas niveau) inclut *E. coli* et le genre *Shigella* qui possèdent un gène AmpC codant pour une céphalosporinase de la classe C d'Ambler donc résistante aux inhibiteurs. Elle est exprimée de manière constitutive à très bas niveau. Selon le niveau d'expression, le phénotype de résistance naturel varie entre une sensibilité à toutes les  $\beta$ -lactamines testées et une sensibilité intermédiaire aux céphalosporines de première génération et/ou aux aminopénicillines avec et sans inhibiteurs.

##### Le groupe 2

Le groupe 2 (pénicillinase de bas niveau) inclut les espèces possédant une pénicillinase chromosomique constitutive exprimée à bas niveau (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Citrobacter koseri*, *Raoultella planticola*, *R. ornithinolytica*, *R. terrigena*, *Escherichia hermannii*, *C. gillenii*). Le phénotype de résistance est caractérisé par une résistance aux aminopénicillines et aux

carboxypénicillines. Elles apparaissent généralement sensibles in vitro aux uréidopénicillines, qu'il convient de corriger en intermédiaires, conformément aux règles de lecture interprétative.

### ✚ Le groupe 3

Le groupe 3 (céphalosporinase inductible) comprend les espèces d'entérobactéries productrices de céphalosporinase AmpC. Les principales bactéries de ce groupe retrouvées en clinique humaine sont *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *E. asburiae*, *Serratia marcescens*, *C. freundii*, *C. braakii*, *C. youngae*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *P. stuartii*, *Hafnia alvei* et *Pantoea agglomerans*. Le phénotype de résistance est marqué par une résistance aux aminopénicillines seules ou associées aux inhibiteurs et une résistance aux céphalosporines de première génération. Selon les espèces, il peut s'ajouter une résistance ou une sensibilité intermédiaire à la Céfoxitine et au céfuroxime.

### ✚ Le groupe 4

Le groupe 4 (céphalosporinase inductible plus enzyme sensible aux inhibiteurs) inclut les espèces *Yersinia enterocolitica* et *Serratia fonticola*. Ces deux espèces sont caractérisées par la production de deux enzymes : une céphalosporinase inductible de classe C donc résistante aux inhibiteurs et une enzyme sensible aux inhibiteurs. Cette dernière est chez *Y. enterocolitica* une pénicillinase chromosomique de bas niveau et chez *S. fonticola* une  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE) chromosomique et inductible, qui hydrolyse les pénicillines et des céphalosporines. Les phénotypes de résistance induits par ces deux couples d'enzymes sont assez proches ; ils associent une résistance aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines et aux céphalosporines de première génération. La résistance aux uréidopénicillines n'est généralement pas observée in vitro et une correction en intermédiaire s'avère nécessaire. *S. fonticola* est également souvent résistante au céfuroxime. Enfin la résistance aux associations aminopénicillines-inhibiteurs est généralement présente chez *Y. enterocolitica*, et plus rarement chez *S. fonticola*, à cause d'une faible expression de la céphalosporinase.

### ✚ Les groupes 5 et 6

Le groupe 5 (céfuroximase inductible) rassemble les espèces produisant une enzyme chromosomique, sensible aux inhibiteurs, inductible et ayant un spectre d'activité hydrolytique proche de celui des BLSE. Ce groupe comprend *P. vulgaris* et *P. penneri*. Ils présentent naturellement une résistance aux aminopénicillines, aux céphalosporines de première génération et au céfuroxime, ainsi qu'une sensibilité aux associations d'aminopénicillines et d'inhibiteurs.

Le groupe 6 (BLSE de bas niveau/BLSE inductible) comprend d'une part des espèces environnementales (la plupart des espèces de *Kluyvera* comme *K. ascorbata*, *K. cryocrescens*, *K. georgiana*, *Rahnella aquatilis* et *Erwinia perscinia*), rares en clinique humaine, qui produisent des BLSE de manière constitutive à bas niveau, et d'autre part des espèces de *Citrobacter* (*C. amalonaticus*, *C. farmeri* et *C. sedlakii*) qui produisent une BLSE inductible. Ces espèces sont résistantes aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines, aux céphalosporines de première génération et au céfuroxime. Elles sont sensibles aux associations de pénicillines-inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases. Elles restent habituellement sensibles aux uréidopénicillines et aux céphalosporines de troisième génération. Cependant, pour les uréidopénicillines, l'activité enzymatique suggère, comme pour les espèces du groupe 2, une correction de sensible en intermédiaire. Les espèces de *Citrobacter* de ce groupe se différencient des espèces environnementales par la présence d'un système d'induction comme les entérobactéries des groupes 3, 4 et 5. Ainsi des images d'induction/antagonisme peuvent être observées comme évoqué précédemment [46,47,5,18].

#### 3.1.2 Résistance naturelle des entérobactéries aux autres molécules d'antibiotiques

Certaines espèces d'entérobactéries présentent une résistance naturelle à certaines molécules d'antibiotiques, c'est l'exemple de :

*Proteus sp*, *Providencia sp*, *Morganella sp*: qui présentent une résistance naturelle aux Tétracyclines, nitrofurantoines, tigycycline et colistine.

*Serratia marscecens*: présente une résistance naturelle à la colistine[48].

Espèces	AMP	AMC	TIC/ PIP	CIG	FOX	CXM	GEN	TOB	TET	TIG	COL	NIT
<i>C.freundii</i> , <i>C.braakii</i> , <i>C.murlinae</i> , <i>C.werkmanii</i> , <i>C.youngae</i>	R	R		R	R							
<i>C.amalonaticus</i> , <i>C.sedlakii</i> , <i>C.farmeri</i> , <i>C.rodentium</i>	R		R	R		R						
<i>E.aerogenes</i>	R	R		R	R							
<i>E.cloacae complex</i>	R	R		R	R						R*	
<i>E.hermannii</i>	R		R									
<i>H.alvei</i> , <i>H.paraalvei</i>	R	R		R							R	
<i>Klebsiella spp</i> , <i>Raoultella spp</i> , <i>C.koseri</i>	R		R									
<i>M.morganii</i>	R	R		R					R	R	R	R
<i>P.mirabilis</i>									R	R	R	R
<i>P.vulgaris</i> , <i>P.penneri</i>	R			R		R			R	R	R	R
<i>P.rettgeri</i>	R	R		R		R			R	R	R	R
<i>P.stuartii</i>	R	R		R		R	R	R	R	R	R	R
<i>S.marcescens</i>	R	R		R	R	R		R	R		R	R
<i>Y.Enterocolitica</i>	R	R	R	R	R							

Tableau III : Phénotypes de résistance naturelle des entérobactéries les plus fréquentes [48].

### 3.2 Résistance acquise

#### 3.2.1 Les mécanismes de résistance des entérobactéries aux bêta-lactamines

##### 3.2.1.1 Résistance non enzymatique

Les mécanismes de cette résistance ont le plus souvent un support chromosomique et leur émergence en clinique humaine fait suite à la sélection de mutants résistants par une ou plusieurs antibiothérapies préalables.

**a) Modification de la cible protéines de liaison à la pénicilline (PLP) :** Ce mécanisme n'est pas prédominant chez les entérobactéries. La résistance peut avoir lieu par des mutations dans les gènes chromosomiques codant pour les PLPs ou par l'acquisition de gènes étrangers codant pour des nouveaux PLPs ayant une affinité différente aux  $\beta$ -lactamines. Les souches de *Proteus mirabilis* résistantes à l'imipénème et au mécilinam ont été observées suite à une perte d'affinité de la PLP2 et à une diminution de la quantité de PLP1[49].

**b) Diminution de la perméabilité :** La membrane externe des entérobactéries est formée de LPS, dont la structure est hydrophile, cette organisation explique une résistance naturelle aux antibiotiques hydrophobes et de masse moléculaire élevée (pénicilline G, macrolides, acide fusidique). La pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe s'effectue à travers les porines. Ces systèmes de transport passif qui constituent une grande famille de protéines de la membrane externe (Omp36, LamB...) sont décrits chez *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*[50].

**c) Système d'efflux :** Le système d'efflux actif est efficace grâce aux protéines transmembranaires ancrées dans la membrane plasmique mais également dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif tel que les entérobactéries. Des mutations dans les régions régulatrices des opérons des systèmes d'efflux multi-drogues peuvent conduire à une surexpression des systèmes d'efflux constitutifs, associée ou non à une perte des porines, et conférer une multirésistance aux antibiotiques. L'implication des systèmes d'efflux dans la résistance aux  $\beta$ -lactamines a été clairement identifiée dans plusieurs études en particulier chez *K. pneumoniae*. Cependant ce type de mécanisme touchant préférentiellement la Céfoxitine et les céphalosporines de deuxième génération (C2G) semble difficile à distinguer du point de vue phénotypique des résistances par modification des porines[51].

### 3.2.1.2 Résistance enzymatique

Le mécanisme enzymatique (par production de betalactamases) est plus fréquent chez les entérobactéries que les mécanismes non enzymatiques (imperméabilité, efflux, modification d'affinité de PLP).

#### 3.2.1.2.1 Production de Béta lactamase

##### ✓ Définition de bêta lactamase

Groupe hétérogène d'enzymes qui hydrolysent le cycle bêta lactame représentent le mécanisme majoritaire de la résistance naturelle et acquise des entérobactéries à ce type d'antibiotiques. Ces enzymes sont de localisation périplasmique mais compte tenu de leur diversité, entraînent des pertes d'activité antibactérienne très variables selon l'enzyme impliquée. Il n'est plus exceptionnel de constater que certaines souches cliniques peuvent synthétiser plusieurs betalactamases transférables[52].

##### ✓ Classification de bêta lactamases

Il existe deux grands schémas de classification pour catégoriser les enzymes  $\beta$ -lactamase (les systèmes d'Amblar et de Bush-Jacoby).

Les classes A à D d'Amblar utilisent l'homologie des séquences d'acides aminés pour catégoriser les  $\beta$ -lactamases [52].

Les groupes 1 à 4 du système bush-Jacoby sont basés sur les profils d'hydrolyse du substrat (pénicilline, céphalosporine, céphalosporine à spectre étendu, carbapénème) et le profil inhibiteur (inhibition par les inhibiteurs de la  $\beta$ -lactamase clavulanate et tazobactam)

Bush-Jacoby	Ambler	Définition des substrats	Inhibé par l'EDTA	Inhibé par l'acide clavulanique ou le tazobactam	Représentants
1	Classe C	Céphalosporinases Céphamycinases	(-)	Non	P99 FOX-4
2	Classe A	Pénicillines	(-)	Oui	PC1
2a				Oui	TEM-1, SHV-1
2b				Oui	TEM-10, SHV-2
2be				Oui	TEM-30
2br				Non	TEM-50
2ber				Non	RTG-4
2ce				Oui	OXA-1
2d	Classe D	Pénicillines	(-)	Variable	
2de		Céphalosporines			OXA-11
2df		Carbapénèmes			OXA-23
2e				Oui	Lcpe
2f		Carbapénèmes		Variable	CPK-2
3	Classe B	Carbapénèmes	(+)	Non	
3a	B1				NDM-1, VIM-2, IMP-1
3b	B2				CphA
3a	B3				L1

D'après les données de Bush et Jacoby (2010).

EDTA, éthylènediaminetétraacétate.

Tableau IV : Comparaison des systèmes de nomenclature[52].

### ✓ Types de bêta-lactamases

#### 🚩 β-lactamases à spectre étendu (BLSE)

Les BLSE sont des enzymes produites par les entérobactéries qui hydrolysent l'ensemble des pénicillines et des céphalosporines à l'exception de la témocilline, du moxalactam et des céphamycines (céfotixine). Les carbapénèmes ne sont pas hydrolysés par les BLSE. Les BLSE sont inhibées partiellement par les inhibiteurs de beta-lactamases (acide clavulanique, tazobactam, sulbactam).

Les gènes des BLSE sont portés par des plasmides conjugatifs, ils sont donc transférables d'une souche à une autre mais aussi d'une espèce à une autre. Les premières BLSE dérivait des bêtalactamases de type TEM ou SHV-1 (pénicillinases) par mutation ponctuelle et ont été décrites initialement chez *Klebsiella pneumoniae*. Elles sont maintenant produites par de nombreuses entérobactéries comme *Klebsiella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus* et *E. coli*.

Plus récemment de nouvelles BLSE, non dérivées des pénicillinases, ont émergé : les enzymes de type CTX-M qui confèrent un plus haut niveau de résistance au Céfotaxime[53].

### Les céphalosporinases

Ce sont des céphalosporinases de type AmpC. Les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases, tels que l'acide clavulanique ou le tazobactam, sont généralement inefficaces contre eux. Leur spectre d'hydrolyse comprend les aminopénicillines, C1G, et C2G, y compris les céphamycines. Les AmpC hydrolysent dans une moindre mesure les carboxypénicillines, les uréidopénicillines et les C3G. Les enzymes hyperproduites pourraient inactiver efficacement ces substrats et elles ne confèrent généralement pas de résistance aux carbapénèmes et aux C4G. Ces dernières peuvent toutefois être inactivées par des enzymes rares qui dérivent d'AmpC par mutations [53].

### Les carbapénèmases

Ces enzymes sont une source importante d'inquiétude car elles sont actives non seulement contre les céphalosporines et céphamycines, mais aussi contre les carbapénèmes [54]. Elles appartiennent à deux familles moléculaires qui se distinguent par leur mécanisme d'hydrolyse et leur site actif : les carbapénèmases à sérine et les carbapénèmases à zinc[55]. Les carbapénèmases ont une activité hydrolytique contre les carbapénèmes, appartiennent à trois des quatre groupes d'Amblar (A, B et D). Les bactéries qui produisent ces enzymes sont fréquemment résistantes à d'autres classes d'antibiotiques, elles présentent un risque pour la santé en raison du risque d'échec thérapeutique .

Ex : Les carbapénèmases de type NDM, IMP, VIM[55].

### pénicillinases acquises :

Ces Pénicillinases peuvent être inhibée par IBL selon le niveau d'expression :

- Pénicillinase Bas niveau : confère une résistance à : AMX, TIC, PIP, C1G mais sensible aux Inhibiteurs de Béta lactamases (IBL).

- Pénicillinase Haut niveau : non restauré par IBL

Ex: TEM, SH

Type de prélèvement	lieu	Enzymes d'écrites				références
		AmpC	BLSE	Carba	Autres	
Clinique	Béjaia		CTX-M-15			Touati <i>et al.</i> , 2006
Clinique	Alger		CTX-M-type		TEM	Messaï <i>et al.</i> , 2006
Clinique	Alger		CTX-M-15/3			Ramdani-Bouguessa <i>et al.</i> , 2006
Environnement hospitalier	Béjaia		CTX-M-15			Touati <i>et al.</i> , 2007
Clinique	Alger	CMY-2, DHA-1	CTX-M-15			Iabadene <i>et al.</i> , 2009
Clinique	Alger	CMY-4		VIM-19	TEM-1	Robin <i>et al.</i> , 2010
Clinique	Alger		CTX-M-15			Touati <i>et al.</i> , 2012
Clinique	Tlemcen		CTX-M-15			Baba Ahmed <i>et al.</i> , 2012
Clinique	Béjaia		CTX-M-15/3			Gharout-Sait <i>et al.</i> , 2012
Clinique	Tlemcen		CTX-M-15/3		TEM-1, OXA-1	Baba Ahmed-Kazi Tani <i>et al.</i> , 2013
Effluents hospitaliers	Alger		CTX-M-15		TEM-1	Anssour <i>et al.</i> , 2014
Clinique	Annaba		CTX-M-15	NDM-5		Sassi <i>et al.</i> , 2014
Clinique	Constantine		CTX-M-15 ; TEM-3/24	OXA-48		Agabou <i>et al.</i> , 2014
Clinique	Béjaia		CTX-M-15		TEM-1	Yanat <i>et al.</i> , 2014
Clinique	Béjaia	CMY-4	CTX-M-15		TEM-1	Gharout-Sait <i>et al.</i> , 2015
Clinique	Alger		CTX-M-15 TEM-4 ; SHV-2a		TEM-1/ 31/15	Yahiaoui <i>et al.</i> , 2015
Clinique	Oran		CTX-M-15			Yanat <i>et al.</i> , 2016
Clinique	Béjaia		CTX-M-15		TEM-1	Yanat <i>et al.</i> , 2017
Effluents hospitaliers	Alger		CTX-M-15			Anssour <i>et al.</i> , 2016
Clinique	Ouargla			OXA-48		Yagoubat <i>et al.</i> , 2016
Clinique	Alger		CTX-M-5/14/3			Medboua-Benbalagh <i>et al.</i> , 2017
Clinique	Annaba			OXA-48		Bourafa <i>et al.</i> , 2018
Clinique	Tlemcen	CMY-2, MOX	CTX-M-15/14 1/2; SHV-12			Zenati <i>et al.</i> , 2019

Tableau V : Les Différentes types de  $\beta$ -lactamases décrites chez *E. coli* dans les hôpitaux algériens[52].

#### 4. Résistance des entérobactéries aux autres classes d'antibiotiques

##### 4.1 Mécanismes de Résistance des entérobactéries aux aminosides

Trois mécanismes de résistance ont été identifiés :

- ✓ Modification de la cible ribosomale, ou la méthylation de l'ARNr 16S au sein de la sous-unité 30S des espèces comme *E. coli* et *Klebsiella* altère la fixation des aminosides, ce qui bloque leurs activités antimicrobiennes. Dix gènes de méthylation ont été décrits arm

A, rmt A, rmt B, rmt C, rmt D, rmt E, rmt F, rmt G, rmt H et npm A[56]. avec prédominance du genre arm A et rmt B [57]. Le gène Arm A a été détecté pour la première fois en 2003 en France chez une souche de *K. pneumoniae* montrant un haut niveau de résistance à tous les aminosides cliniquement très actifs[58].

- ✓ La modification du transport, les bactéries peuvent exprimer des systèmes d'efflux qui résultent d'une accumulation réduite des aminosides à l'intérieur de la cellule[59].
- ✓ L'inactivation enzymatique des aminosides. C'est le dernier mécanisme qui est le plus fréquent et qui implique trois types d'enzymes : les aminoglycosidesphosphotransférase (APH), les adényltransférase (ANT ou AAD) et les acétyltransférases (AAC), dont les gènes sont localisés sur des plasmides, des transposons ou contenus dans des intégrons [60,61,49].

#### 4.2 Mécanisme de Résistance des entérobactéries aux quinolones

La résistance chromosomique aux quinolones chez les entérobactéries résulte essentiellement d'accumulation de mutations dans l'ADN gyrase (GyrA, GyrB), puis dans la topoisomérase IV (ParC). Les mutations apparaissent quasi-exclusivement dans de courtes régions conservées, appelées quinolone résistance de terminingregion (QRDR)[40]. De plus, la résistance chromosomique aux quinolones peut être associée à la diminution de la perméabilité membranaire et/ou à la surexpression des systèmes d'efflux.

Récemment, trois mécanismes de résistance plasmidique aux quinolones et plus rarement aux fluoroquinolones ont été décrits[50]. Le premier déterminant Plasmid Mediated Quinolones Resistance (PMQR), correspondant à la protéine QnrA1. Quatre autres déterminants Qnr-like (qnrB, qnrS, qnrC et qnrD) ainsi que différents variantes des protéines QnrA, QnrB et QnrS ont été identifiés chez les entérobactéries. Ces protéines sont capables de se fixer sur les topoisomérases II et IV en compétition avec l'ADN. La réduction du nombre des complexes binaires topoisomérases-ADN diminue la fixation ultérieure des fluoroquinolones sur les topoisomérases [62]. Les souches porteuses du gène qnr appartiennent le plus souvent aux espèces *E. coli*, *K. pneumoniae* et *E. cloacae* qui sont toutes multirésistantes en particulier résistantes aux céphalosporines de 3ème génération par production de BLSE[63].

Le deuxième déterminant PMQR plasmidique est le gène *qepA* qui code pour une pompe d'efflux actif (QepA1 et QepA2)[40].

Marqueurs	NaLS	NaLR	PefR	CipR
Acides nalidixique	S	R	R	R
Péfloxacine	S	S	R	R
Ciprofloxacine	S	S	S	R

Tableau VI : Phénotypes de résistance des entérobactéries aux quinolones.

#### 4.3 Mécanisme de Résistance des entérobactéries au Triméthoprim-Sulfaméthoxazole

Le mécanisme de résistance le plus commun et le plus important à ces agents bactériostatiques est une enzyme cible altérée, généralement à médiation plasmidique[64]. Deux types distincts de dihydroptéroate synthétase altérée ont été caractérisés dans les bactéries Gram-négatives, I et II, codées respectivement par *sul I* et *sul II*. Ils ont une liaison réduite aux inhibiteurs, mais remarquablement - conservent une liaison normale au substrat d'acide p-aminobenzoïque[65].

Le mécanisme le plus courant de résistance au triméthoprim est une enzyme cible modifiée, généralement à médiation plasmidique. Les formes mutantes de la DHFR chromosomique normale sont beaucoup moins fréquentes dans les isolats cliniques. Sept principaux types de DHFRs (I à VII) codés par des plasmides et résistants au triméthoprim ont été trouvés dans des bactéries à Gram négatif. Ils partagent une homologie variable entre eux et avec l'enzyme chromosomique normale, suggérant une évolution à la fois divergente et convergente[66].

#### 4.4 Mécanisme de Résistance des entérobactéries au chloramphénicol

Le principal mécanisme de résistance clinique au chloramphénicol est son inactivation par acétylation[67]. Trois groupes génétiquement distincts de chloramphénicol acétyltransférases ont été trouvés jusqu'à présent, certains inductibles et d'autres constitutifs, mais partageant tous une homologie de séquence [68].

A decorative gold frame with ornate, swirling flourishes surrounding the text.

*Partie pratique*

A decorative gold frame with ornate, swirling flourishes surrounding the text.

*Matériels et  
méthodes*

## Matériels et méthodes

### 🚦 Cadre de l'étude

Le présent travail est une étude statistique descriptive mono-centrique, réalisée au laboratoire de microbiologie du CHU NEDIR MOHAMED de TIZI OUZOU.

Il inclut une partie rétrospective qui s'est étalée sur une période de trois ans 2019,2020 et 2021 et une autre étude prospective allant du 8 février au 8 avril 2022.

### 🚦 Souches bactériennes étudiées

- **Critères d'inclusion**

Ont été incluses dans notre étude toutes les souches d'entérobactéries résistantes à la céphalosporine de troisième génération qui ont été isolées à partir des différents produits pathologiques provenant de patients hospitalisés et externes, reçus au laboratoire de microbiologie du CHU NEDIR de TIZI OUZOU durant la période d'étude.

- **Critères d'exclusion**

Ont été exclus dans notre étude :

- Les souches d'entérobactéries sensibles aux C3G.
- Toutes les espèces bactériennes n'appartenant pas à la famille des Entérobactéries.

## 1. Matériels

- Bec bunsen ;
- Etuve ;
- La jarre ;
- Pipettes pasteur ;
- Anse de platine ;

- Réactifs pour coloration de Gram ;
- Eau physiologique ;
- Lames et lamelles ;
- Huile à immersion ;
- Pied à coulisse ;
- Tube à hémolyse ;
- Tube à essai ;
- Galerie d'identification API 20<sup>E</sup> ;
- Ecouvillons stériles ;
- Boîtes de pétri ;
- Milieux de culture ;
- Disques d'antibiotiques ;
- Matériels de l'automate Vitek 2 :
  - Cartes d'identification : carte GN ;
  - Cartes pour tests de sensibilité aux antibiotiques : cartes AST-365 et AST-233.

## 2. Méthodologie

### 2.1 Analyses microbiologiques

#### 2.1.1 Isolement et identification des Entérobactéries

Les différents produits pathologiques reçus au laboratoire ont fait l'objet d'un examen cytobactériologique comportant les étapes suivantes :

##### ❖ Examen macroscopique

L'aspect, la couleur, la consistance et autres éléments visibles sont notés pour chaque type de prélèvement biologique.

##### ❖ Examen microscopique

C'est l'ensemble des observations microscopiques faites à l'état frais et à l'état coloré (bleu de méthylène, Coloration de Gram...)

### ✚ Mise en culture et isolement des entérobactéries

Divers milieux sont utilisés pour l'isolement des entérobactéries, ces derniers doivent satisfaire les besoins nutritifs et énergétiques des entérobactéries à cultiver.

Les milieux utilisés selon le produit pathologique:

- Urine : on utilise le Gélose nutritive et Milieux chromogènes ;
- Hémoculture : Gélose au sang cuit et milieu Hektoen ;
- Pus et liquide de ponction : Gélose au sang cuit, gélose au sang frais, milieu Hektoen, Gélose nutritive.

L'incubation se fait à 35 C pendant 18 à 24h (sous 5% en CO<sub>2</sub> pour les géloses au sang).

### ✚ Identification des entérobactéries

Elle est basée sur :

#### 1-Aspect macroscopique des colonies

- ✓ Sur milieu gélose nutritif

-*E.coli* apparaît en colonies de 1-3 mm de diamètre généralement bombés, brillantes, opaques, blanchâtres et bien rondes à surface lisse plus un point ombilique central ;

-*K.pneumoniae* apparaît en colonie de 3-4mm de diamètre bombés, grasses, larges, luisantes, très muqueuses et ayant tendance à la confluence ;

-*P.mirabilis* apparaît sous forme d'un envahissement de la gélose en voile montrant des vagues successives, avec une odeur désagréable.

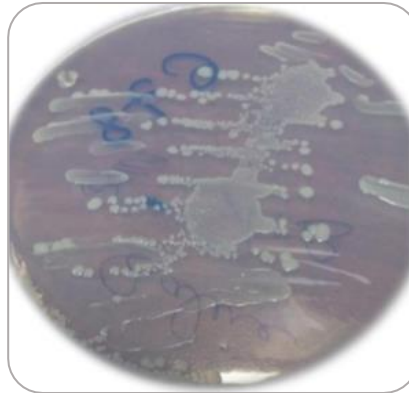
*1-E.coli**2-K.pneumoniae**3-P.mirabilis*

Figure 1: Aspect des colonies sur gélose nutritive de principales entérobactéries.

✓ Sur milieu Hektoen

L'aspect des colonies sur ce milieu est en relation de la capacité des entérobactéries à fermenter le lactose mis dans ce milieu.

Certaines souches d'entérobactéries sont lactose positif, font virer la couleur du milieu de vert au jaune orangé (exemple : *E.coli* et *K.pneumoniae*) et d'autres sont lactose négatif (absence de virage de couleur (exemple : *P.mirabilis*).

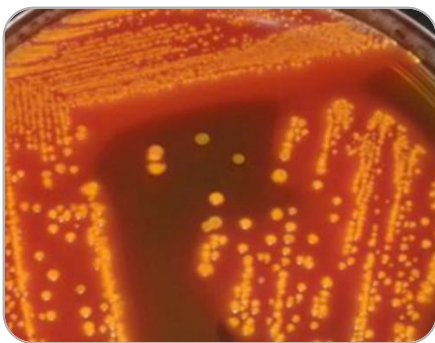
*1-E.coli**2-K.pneumoniae**3.P.mirabilis*

Figure 2 : Aspect des colonies sur milieu Hektoen des principales entérobactéries.

## 2-Examen microscopique

- L'état frais

Une préparation entre lame et lamelle a été réalisée à partir de colonies obtenues, l'observation a été faite au microscope optique à l'objectif X40 indique que certaines souches sont des bacilles mobiles (*E.coli* et *E.cloacae*) et d'autres sont des bacilles immobiles (*K.pneumoniae*).

- Examen après coloration

A partir des colonies observées, un frottis a été réalisé et coloré par la méthode de coloration de GRAM.

L'observation a été faite au microscope à objectif x100 à immersion. Cette observation nous a révélé que les entérobactéries sont à Gram négatif (colorés en rose) et ont une forme en bacilles ou coccobacilles, elles peuvent être isolés ou en paire.

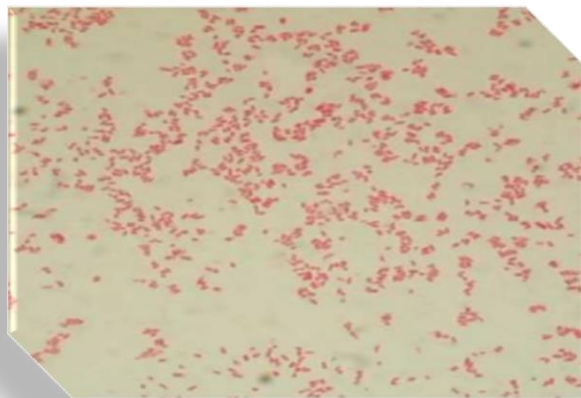


Figure 3 : Observation microscopique avec coloration de Gram.

## 3-les tests d'orientation

- ✓ Recherche de l'oxydase

Les entérobactéries sont toute oxydase négative (absence total de coloration violette).



Figure 4 : Résultat de test d'oxydase.

#### 4. Identification biochimique par la Galerie API 20 E

Technique : Voir annexe IV.

L'incubation : Se fait à 37°C pendant 18-24 heures.

Lecture de la Galerie

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture ;
- Si 3 test ou plus (test GLU+ ou -) sont positifs, noter sur la fiche de résultat de toutes les réactions spontanés puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs ;
- Si le nombre de test positifs avant ajout des réactifs (y compris le test GLU) est inférieur à 3 réincuber la galerie 24h (+ou - 2h) de plus sans rajouter les réactifs.

Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs

Identification :

- Avec le tableau d'identification, comparer les réactions notées sur la fiche de résultats avec celle du tableau(voir annexe).
- Avec le catalogue :

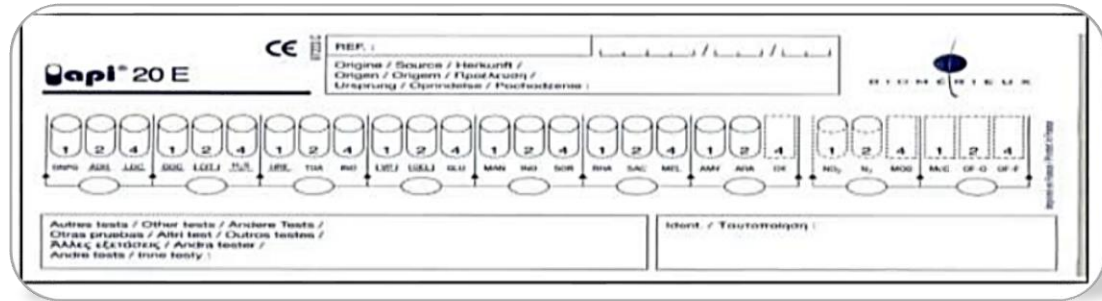


Figure 5 : Fiche de résultat de la galerie API20E.

### ✚ Escherichia coli

ONPG(+); LDC, ODC(+); CIT(-); H<sub>2</sub>S(-); URE(-); TDA(-); IND(+); VP(-) GLU(+)

Figure 6 : Galerie biochimique API20E d' *Escherichia coli*.

### ✚ Proteus mirabilis

ONPG(-); LDC(-); ODC(+); CIT(+); H<sub>2</sub>S(-); URE(+); TDA(+); IND(-); VP (-) GLU(+)

Figure 7 : Galerie biochimique API20E de *Proteus mirabilis*.

**✚ Klebsiella pneumoniae**

ONPG(+); LDC(+); ODC(+); CIT(+); H<sub>2</sub>S(-); URE(+); TDA(-); IND(-); VP(+); GLU(+)



Figure 8 : Galerie biochimique API20E de *Klebsiella pneumoniae*.

**5. Identification automatisé (VITEK 2)**

Dans le cadre de notre travail, nous avons utilisé la carte d'identification GN (Gram négatif) pour l'identification des entérobactéries.



Figure 9 : Automate d'identification et d'antibiogramme VITEK2.

### 2.1.2. Test de sensibilité aux antibiotiques

#### **Antibiogramme standard**

La résistance des souches aux antibiotiques est testée par la méthode de diffusion en milieu gélosé «Miller Hinton (MH)» ; c'est une technique rapide basée sur l'observation de la croissance bactérienne en présence d'un gradient de concentration de l'antibiotique obtenu après sa diffusion à partir du disque. La croissance bactérienne s'arrête lorsque les bactéries sont en contact avec la concentration minimale d'inhibition autour du disque d'antibiotique.

Technique: (voir annexe VII).

Les antibiotiques à tester pour les Entérobactéries :

Ampicilline (AMP), Amoxicilline (AMX), Amoxicilline–acide clavulanique (AMC), Aztréonam(ATM), Céfoxitine( FOX) , Céfazoline (CZ), Céfotaxime (CTX), Céftriaxone (CRO), Imipénème (IMP) ,Ertapénème (ETP),méropénème (MER), Amikacine (AK), Gentamicine (GN), Acide nalidixique (NA), Ciprofloxacine (CIP), Colistine (CT), Triméthoprime-Sulfaméthoxazole (SXT), Fosfomycine (FOS) et Chloramphénicol (C) ,furanes.

#### **Tests de sensibilité aux antibiotiques automatisés**

Effectués sur automate Vitek, en utilisant les cartes AST-365 et AST-233.

### 2.1.3 Tests complémentaires

Ils sont réalisés pour la mise en évidence des mécanismes de résistance.

#### 2.1.3.1 Détection des Béta lactamase à spectre étendu (BLSE)

Les BLSE sont recherchées devant un diamètre d'inhibition inférieur ou égal aux valeurs suivantes :

- Céfotaxime 30 $\mu$ g (CTX à 27mm) .
- Ceftazidime 30 $\mu$ g (CAZ à 22mm) .
- Ceftriaxone 30 $\mu$ g(CRO à 25mm) .
- Aztréonam 30 $\mu$ g (ATM à 27mm).
- Cefpodoxime 10 $\mu$ g(CPO à 17 mm).

✓ **Test de synergie**

• **Principe**

Il consiste à rechercher une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de  $\beta$ -lactamase (acide clavulanique, sulbactam et tazobactam) et un disque de C3G (Céfotaxime, Ceftazidine et céfepime), cette image est dite en « bouchon de champagne ».

• **Technique**

Un inoculum est préparé à partir d'une culture jeune de 18 à 24 h. La gélose Muller-Hinton estensemencée par la méthode d'écouvillonnage.

En déposant Un disque d'amoxicilline + acide clavulanique (AMC 20/10  $\mu$ g ) à 30 mm centre à centre d'un disque de CTX (30 $\mu$ g) ou CRO (30 $\mu$ g) ou CPO(10 $\mu$ g) ou CAZ(30 $\mu$ g) ou ATM (30 $\mu$ g) .

Incuber 16-18 H à 35 C°.

• **Lecture**

La production des d'enzyme peut se traduire par l'apparition d'une image de synergie en « Bouchon de champagne » entre le disque AMC et CTX, AMC et CAZ, AMC et ATM, AMC et CRO,AMC et CPO [69].



Figure 10 : Test de synergie positif pour une souche de *K.pneumoniae* (aspect en bouchon de champagne).

✓ **Test de double disque:**

• **Principe**

Ce test devra être fait systématiquement devant l'absence de synergie avec diminution des diamètres des C3G.

• **Technique**

Ce test se fait dans des conditions standard de l'antibiogramme

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

-Laisser diffuser les antibiotiques pendant une heure, à la température ambiante (sur la paillasse), la boîte sera déposer couvercle vers le haut.

- Après 1H d'incubation, ôter le disque d'AMC et le remplacer par un disque de CTX ou CRO (ou CAZ).

- Incuber la boîte 16-18 H à 35 C°.

Remarque : il est possible d'utiliser des disques combinés (CTX + acide clavulanique et CAZ + acide clavulanique).

- **Lecture**

Le test du double disque est positif quand le diamètre d'inhibition autour de C3G, appliqué après diffusion du disque AMC est supérieur ou égal à 5mm par rapport au diamètre d'inhibition autour du disque de C3G.

Exemple : diamètre de CTX=16 mm ; diamètre de CTX +AMC =21mm donc souche BLSE(+). L'interprétation(R, I ou S) se fait selon les diamètres mesurés et non sur la présence de BLSE [69].



Figure 11 : Schéma de détection de BLSE par le test du double disque.

## 2.2 Etude statistique

Le recueil des données a été fait à partir du logiciel WHONET 8.6.0 et des différents registres de laboratoire. Par la suite, leurs analyses a été effectuées par le logiciel Excel 2019.

**+ WHONET**

WHONET est un logiciel gratuit développé par l'OMS pour la surveillance des maladies infectieuses et de la résistance bactérienne aux antibiotiques au niveau du laboratoire.

Pour chaque résultat enregistré, on mentionne des informations concernant le patient, le service de provenance, le type de prélèvement, le microorganisme en cause ainsi que les valeurs obtenues dans l'antibiogramme.

**+ Registres du laboratoire**

Ils permettent l'enregistrement quotidien des informations suivantes :

- Numéro d'identification ;
- Identité du patient ;
- Type de prélèvement ;
- Service ;
- Observation macroscopique et microscopique ;
- Antibiogramme ;
- Résultats.

A decorative gold frame with ornate, swirling flourishes at the corners and midpoints of the sides, enclosing the text.

*Résultats*

## 1. Fréquence d'isolement de souches d'entérobactéries résistantes aux C3G

### ✚ Étude rétrospective

Année	Nombre	Nombre total	Pourcentage
2019	513	1647	31,15 %
2020	305	1136	26,85 %
2021	256	868	29,50 %
Total	1074	3651	29 %

Tableau VII : Fréquence d'isolement de souches d'entérobactéries résistantes aux C3G par année durant la période rétrospective.

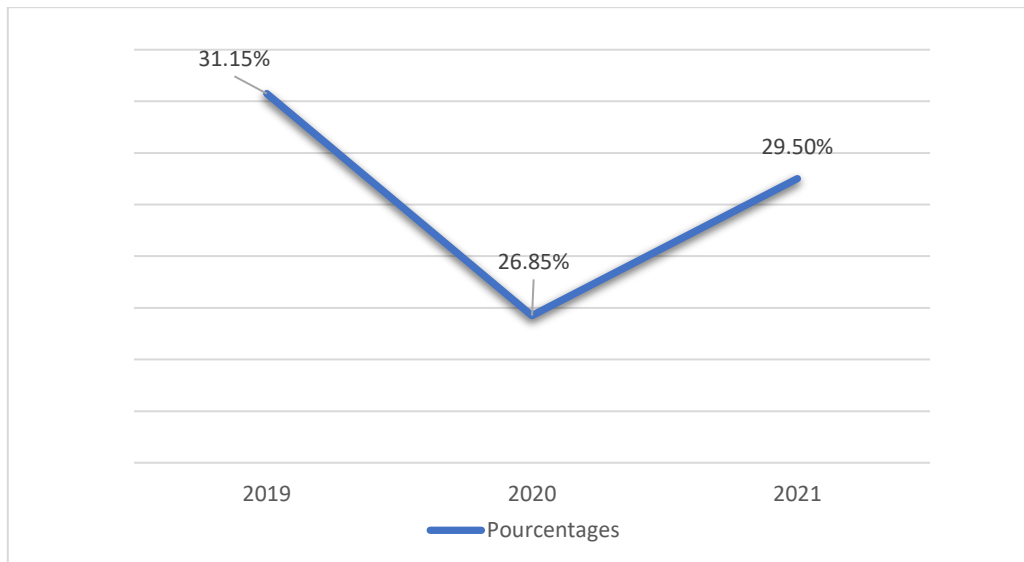


Figure 12 : Représentation graphique d'évolution de la fréquence d'isolement de souches d'entérobactéries résistantes aux C3G durant l'étude rétrospective.

### ✚ Étude prospective

Durant la période d'étude prospective, 261 souches d'entérobactéries ont été isolées, parmi lesquelles 86 souches étaient résistantes aux C3G avec un taux de 33%.

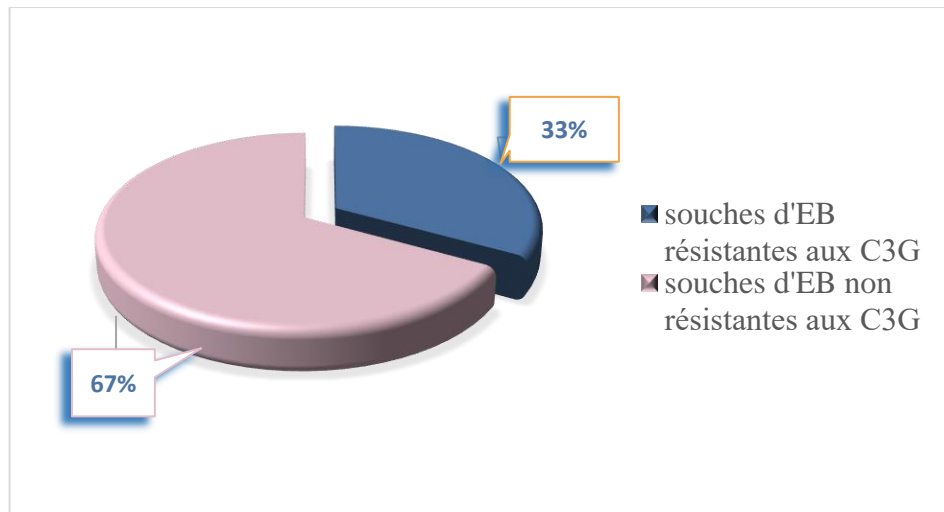


Figure 13 : Représentation graphique d'évolution de la fréquence d'isolement de souches d'entérobactéries résistantes aux C3G durant l'étude prospective.

#### ➤ Interprétation

Durant la période de l'étude rétrospective, la fréquence d'isolement de souches d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération a connu une diminution en passant de 31.15% (513) en 2019 à 26.85% (305) en 2020 puis une augmentation à 29.5% (256) en 2021.

Durant l'étude prospective, les souches d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération ont constitué un tiers de l'ensemble des entérobactéries isolées.

Pour les deux études, les résultats étaient très proches et ne dépassaient pas le tiers de l'ensemble des souches isolées durant chaque période.

## 2. Répartition des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G isolées selon le sexe

### ✚ Étude rétrospective

Sexe	Année 2019	Année 2020	Année 2021	Nombre moyen	Moyenne
Masculin	264	173	152	589	54.84 %
Féminin	243	125	98	466	43.39 %
Non renseigné	6	7	6	19	1.77 %
Total	513	305	256	1074	100 %

Tableau VIII : Répartition des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G isolées selon le sexe pendant l'étude rétrospective.

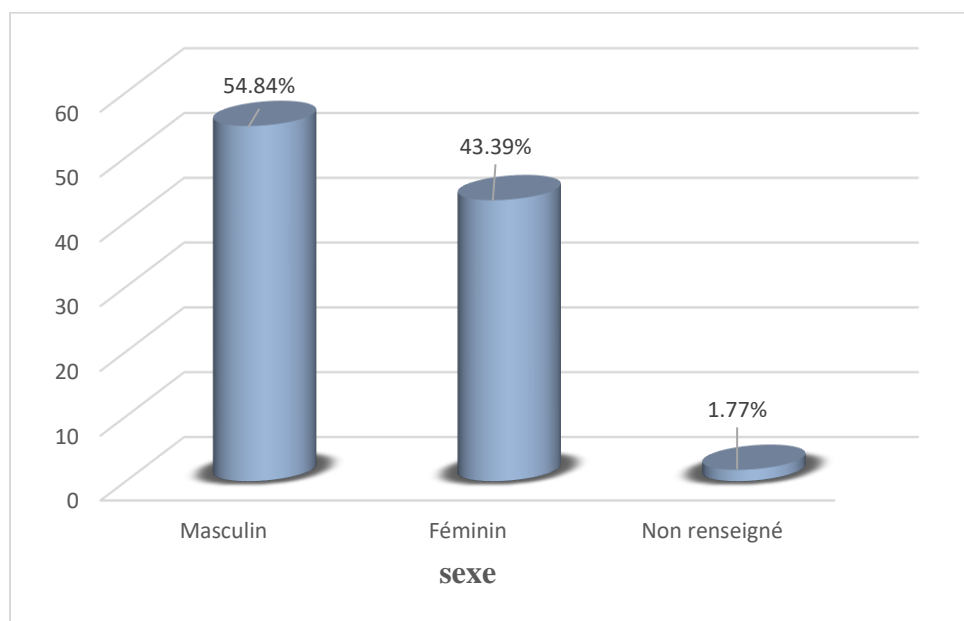


Figure 14 : Représentation des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G isolées selon le sexe pendant l'étude rétrospective.

### ✚ Étude prospective

Sexe	Nombre	Pourcentage
Féminin	45	53,48 %
Masculin	40	47,06 %
Total	85	100 %

Tableau IX : Répartition des souches des entérobactéries résistantes aux C3G isolées selon le sexe pendant l'étude prospective.

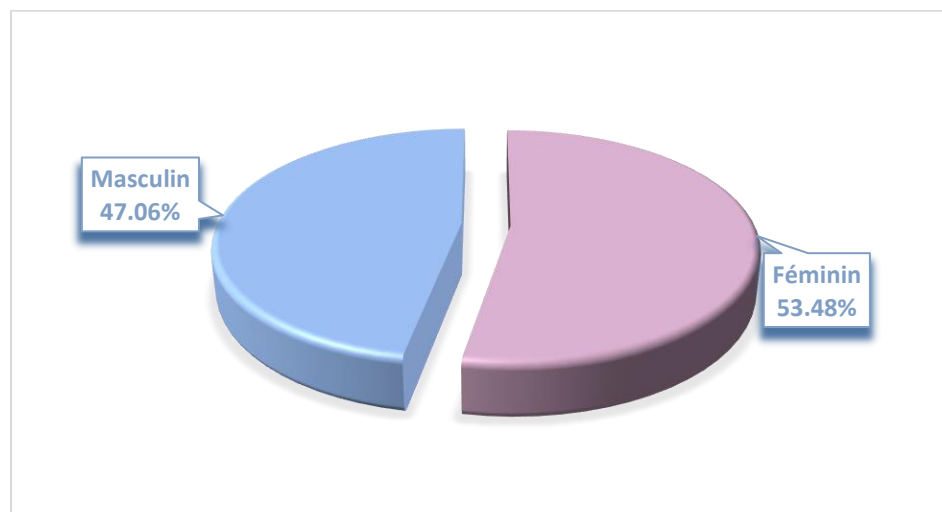


Figure 15 : Répartition des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G isolées selon le sexe pendant l'étude prospective.

### ➤ Interprétation

Pendant l'étude rétrospective, nous avons isolé 1074 souches d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération dont 54.84% (N=589) de ces souches étaient isolées chez des patients de sexe masculin et 43.39% (n=466) étaient isolées de prélèvements provenant de patients de sexe féminin soit un sexe ratio de 1.2 homme pour chaque femme.

Pendant l'étude prospective nous avons isolé 86 souches d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération dont 53.48%(n=46) de ces souches étaient isolées chez

des patients de sexe féminin et 47.06% (n=40) était isolé chez des patients de sexe masculin soit un sexe ratio de 1.1 femme pour chaque homme.

### 3. Répartition des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G isolées selon le service

#### ✚ Étude rétrospective

Service	Nombre	Pourcentage
Externes	139	12.94%
Urgence de chirurgie	136	12.66%
Urgence de pédiatrie	134	12.48%
Urgence de médecine	89	8.29%
Néonatalogie	84	7.82%
Infectieux	70	6.52%
Hématologie	61	5.68%
Néphrologie	51	4.75%
Urologie	38	3.54%
Traumatologie	33	3.07%
Pédiatrie 1	24	2.23%
Chirurgie infantile	24	2.23%
Réanimation médicale	23	2.14%
pédiatrie hématologie	21	1.96%
Médecine interne	11	1.02%
Pédiatrie 2	10	0.93%
Cardiologie	9	0.84%
Chirurgie générale	9	0.84%
Réanimation chirurgicale	7	0.65%
Gastro-entérologie	6	0.56%
EHS Draa Ben Khedda	1	0.09%
EHS Sbihi Tassadit	1	0.09%
Neurologie	1	0.09%
Autres	92	8.56%
Total	1074	100%

Tableau X : Répartition des Entérobactéries résistantes aux C3G selon le service durant la période rétrospective.

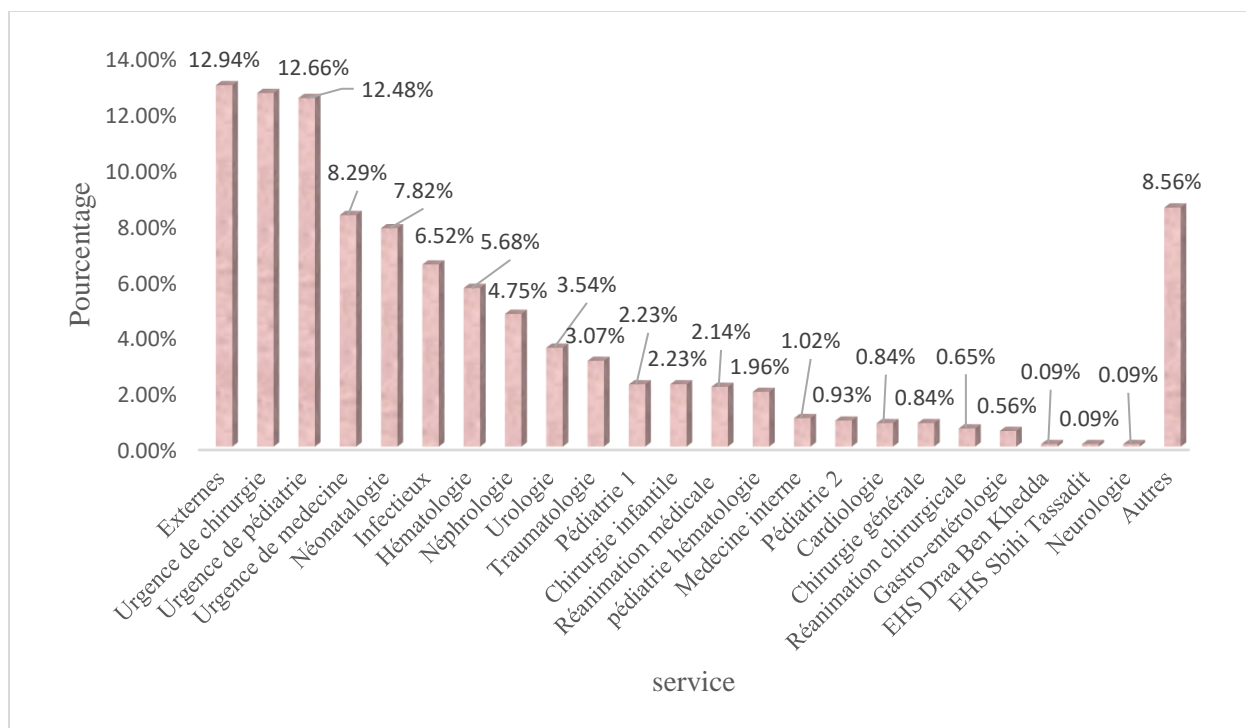


Figure 16 : Représentation graphique des entérobactéries résistantes aux C3G selon le service durant la période rétrospective.

#### ✚ Étude prospective

Service	Nombre	Pourcentage
Externes	16	18.60%
Urgence de médecine	13	15.12%
Infectieux	11	12.79%
Néonatalogie	11	12.79%
Urgence de pédiatrie	10	11.63%
Urgence de chirurgie	7	8.14%
Réanimation médecine	4	4.65%
Chirurgie médicale	3	3.49%
Hématologie	3	3.49%
Cardiologie	3	3.49%

Traumatologie	2	2.32%
Médecine interne	2	2.32%
EHS Sbihi Tassadit	1	1.16%
Total	86	100%

Tableau XI : Répartition globale des Entérobactéries résistantes aux C3G selon le service durant la période prospective.

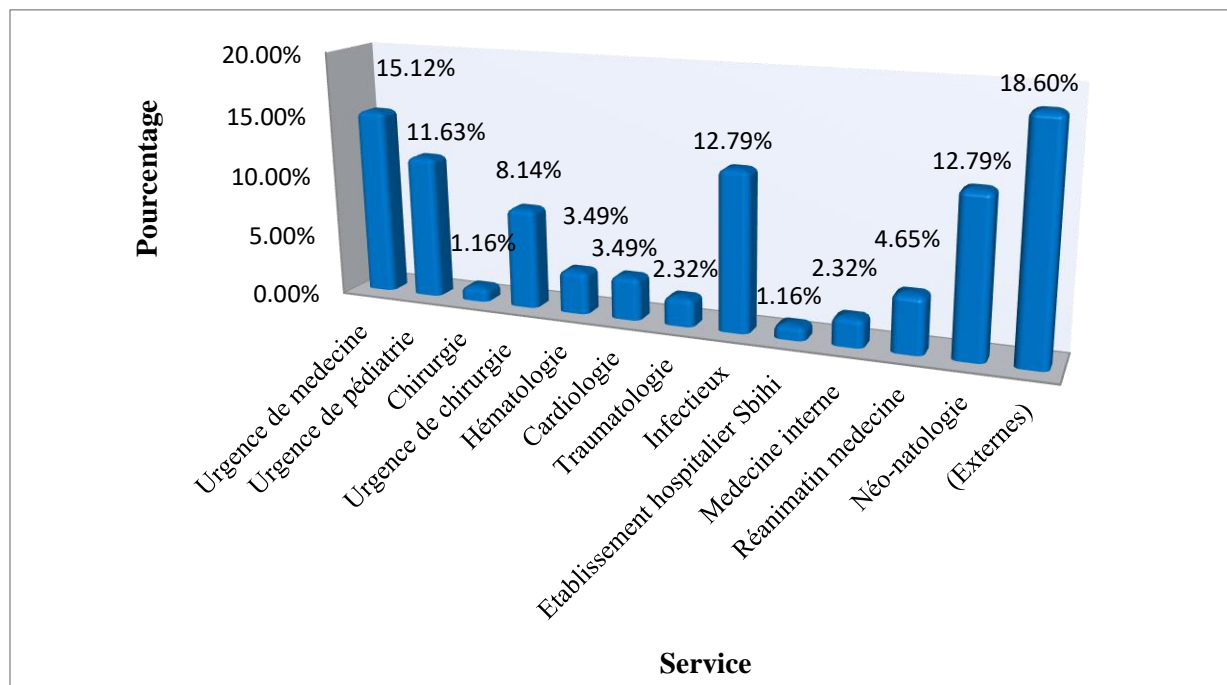


Figure 17 : Représentation graphique des entérobactéries résistantes aux C3G selon le service durant la période d'étude prospective.

### ➤ Interprétation

- Dans l'étude rétrospective

Les souches d'entérobactéries résistantes aux C3G provenaient surtout des urgences, on retrouve en tête le service d'urgence chirurgicale avec un taux de 12.66% suivi du service

d'urgence pédiatrique 12.48% enfin le service d'urgence de médecine avec un pourcentage de 8.29%.

- Dans l' étude prospective:

les résultats démontrent la prédominance des entérobactéries résistantes aux Céphalosporines de 3ème génération au niveau du service d'urgence de médecine 15.12% suivi de service de Néonatalogie avec un pourcentage de 12.79%.

On note que les Entérobactéries ont été aussi isolées dans le milieu extra-hôpital (communautaire) avec des pourcentages importants : 12.94% et 18.60% pendant l'étude rétrospective et prospective respectivement.

#### 4. Répartition des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G isolées selon le type de prélèvement

##### ✚ Étude rétrospective

Prélèvement	Année 2019	Année 2020	Année 2021	Nombre moyen	Moyenne
Urine	244	146	102	492	45.81%
PUS	154	95	84	333	31.01%
Sang	77	40	50	167	15.55%
Respiratoire	16	9	9	34	3.16%
Vaginal	9	7	5	21	1.68%
Liquide céphalo-rachidien	5	4	2	11	1.02%
Autre	8	4	4	16	1.39%
Total	513	305	256	1074	100%

Tableau XII: Répartition des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G isolées selon le type de prélèvement pendant l'étude rétrospective.

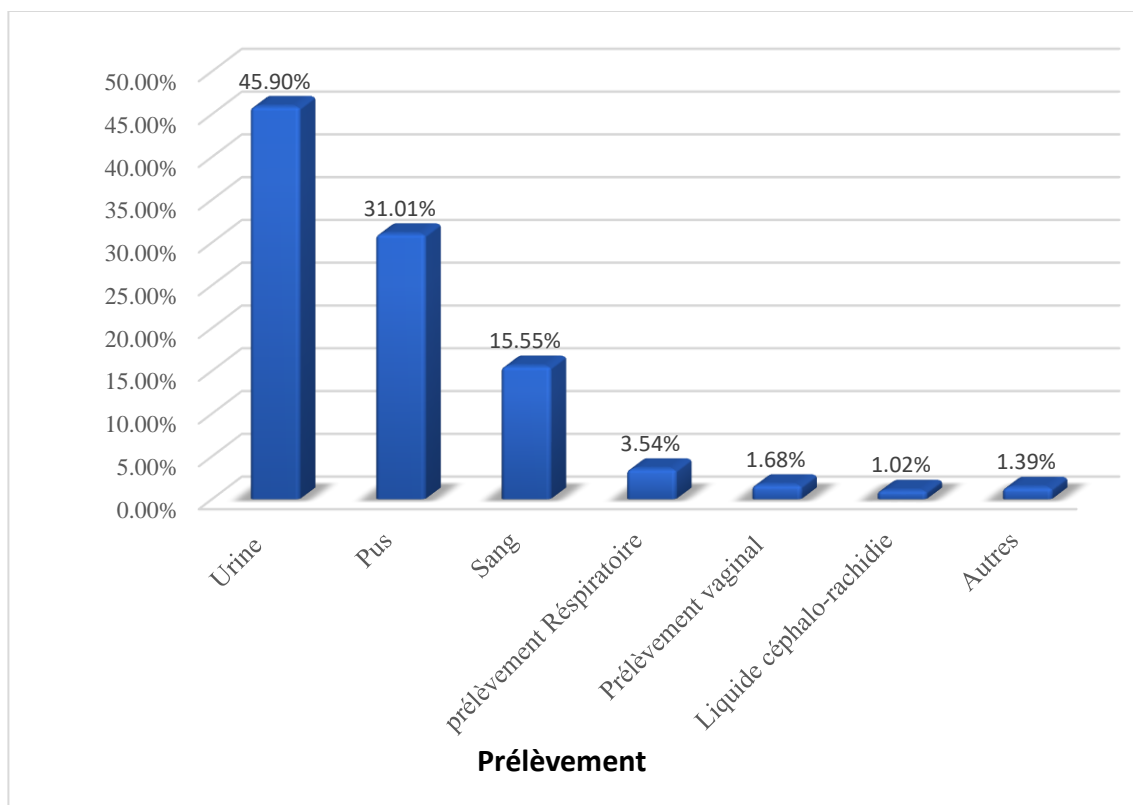


Figure 18 : Représentation graphique de souches d'entérobactéries résistantes aux C3G isolées selon le type de prélèvement pendant l'étude rétrospective.

#### ✚ Étude prospective

Nom de prélèvement	Nombre	Pourcentage
Urine	44	51,16%
Pus	20	23,26%
Sang	20	23,26%
Prélèvement vaginal	1	11,16%
Prélèvements respiratoires	1	11,16%
Total	86	100%

Tableau XIII : Répartition des souches des entérobactéries résistantes aux C3G isolées selon le type de prélèvement pendant l'étude prospective.

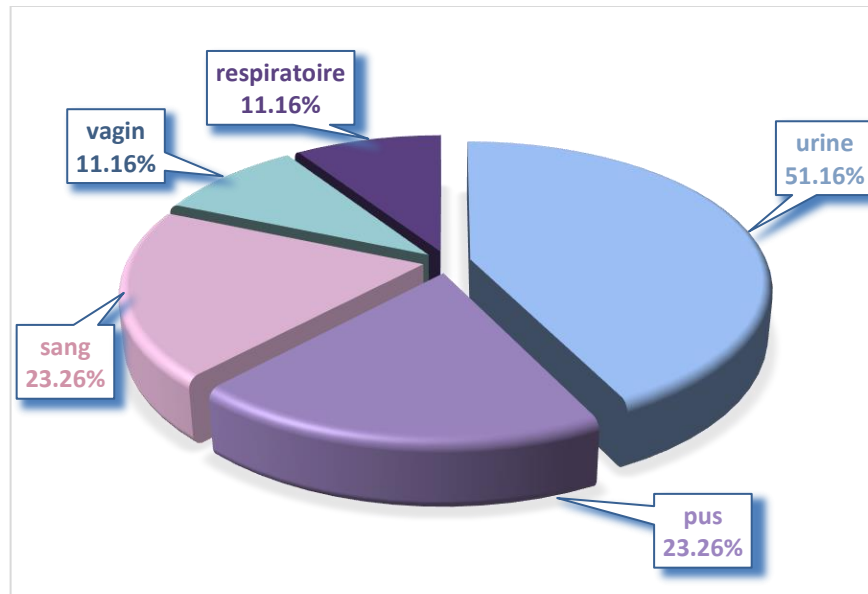


Figure 19: Représentation graphique des souches des entérobactéries résistantes aux C3G isolées selon le type de prélèvement pendant l'étude prospective.

### ➤ Interprétation

Parmi le total des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G isolées ; 45.81% des souches étaient isolées de prélèvement urinaires, 31.01% de prélèvements de pus et ponction et 15.55% d'Hémoculture.

Pendant l'étude prospective, 51.16% de souches étaient isolées de prélèvements urinaires, 23.16% de pus et 23.26% d'hémoculture.

Les résultats de notre études rétrospective et prospective démontrent la prédominance des entérobactéries dans les prélèvements urinaires .ils sont suivis par le prélèvement de pus puis le prélèvement de sang.

## 5. Répartition des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G isolées par espèce

## ✚ Étude rétrospective

Espèce	Nombre	Nombre total	Pourcentage
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	404	730	55.34%
<i>Enterobacter sp</i>	143	286	50.00%
<i>Klebsiella sp</i>	78	176	44.32%
<i>Citrobacter sp</i>	19	49	38.78%
<i>Morganella morgani</i>	9	27	33.33%
<i>Escherichia coli ep</i>	1	4	25.00%
<i>Escherichia coli</i>	389	1967	19.78%
<i>Serratia sp</i>	19	135	14.07%
<i>Proteus sp</i>	11	173	6.36%

Tableau XIV : Répartition des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G par l'espèce pendant l'étude rétrospective.

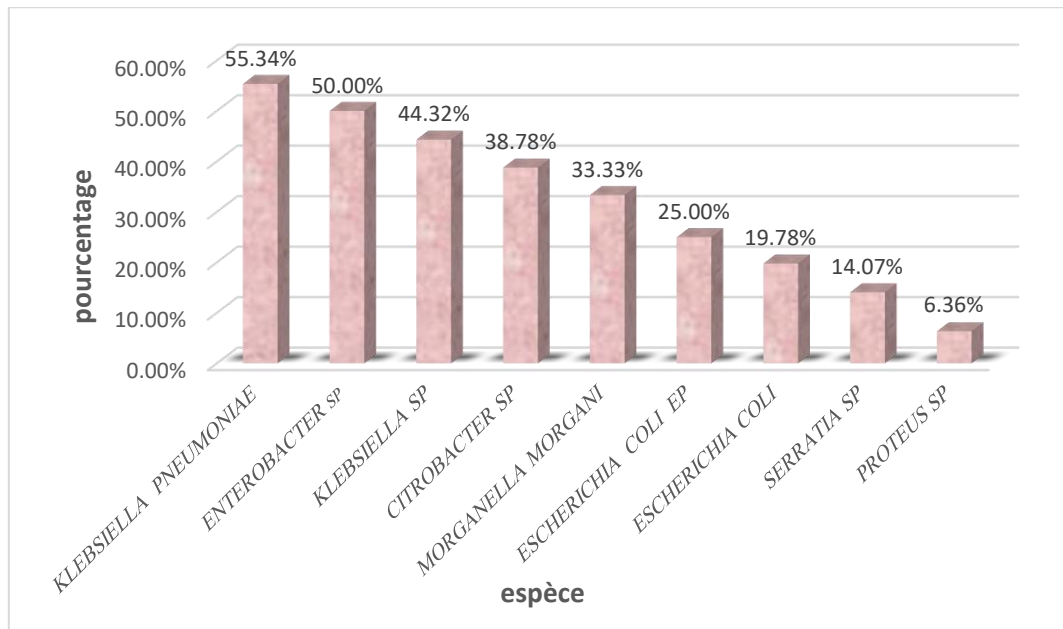


Figure 20 : Représentation graphique des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G par espèce pendant l'étude rétrospective.

### ✚ Étude prospective

Espèce	Nombre	Nombre total	Pourcentage
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	29	45	64.44%
<i>Enterobacter sp</i>	5	8	62.50%
<i>Serratia marcescens</i>	10	17	58.82%
<i>Klebsiella sp</i>	5	11	45.45%
<i>Escherichia coli</i>	36	166	21.29%
<i>Proteus mirabilis</i>	1	6	16.67%

Tableau XV : Répartition des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G par espèce pendant l'étude prospective.

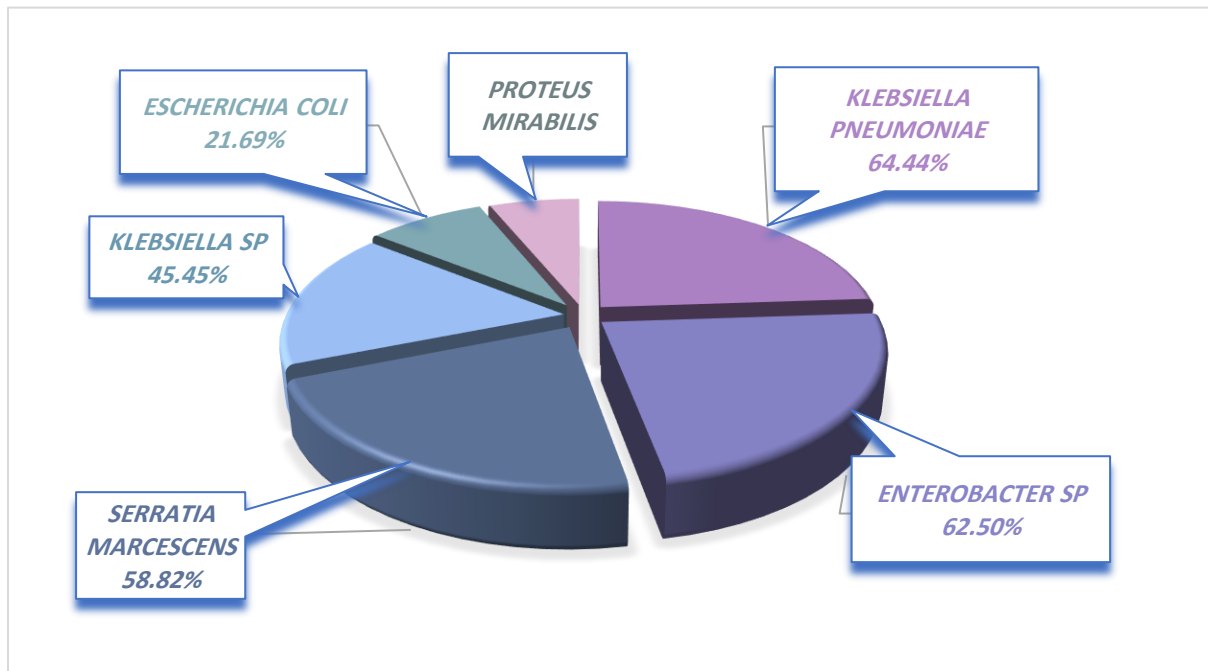


Figure 21 : Représentation graphique de souches d'entérobactéries résistantes aux C3G par espèce pendant l'étude prospective.

➤ **Interprétation :**

Les résultats d'étude rétrospective révèlent que *Klebsiella pneumoniae* est l'espèce qui possède les taux les plus élevés de résistance aux C3G avec un pourcentage de 55.34%(404/730), en deuxième position on retrouve *Enterobacter sp* avec un taux de 50%(143/286), en troisième position *Klebsiella sp* avec 44.32% (78/176) , par la suite on trouve les autres espèces comme *citrobacter sp*, *Morganella morganii* et *Escherichia coli* .

Sur un total de 253 souches d'entérobactéries isolées pendant l'étude prospective, nous avons collecté 86 souches résistantes aux C3G , les résultats montrent que *Klebsiella pneumoniae* est l'espèce qui a le taux le plus élevé de résistance aux C3G avec 64.44% (30/45), *Enterobacter sp* vient en deuxième position avec 62.50%(4/8) ,en troisième position *Serratia marcescens* avec 58.82%(8/17).

## 6. Évolution de la résistance des principales entérobactéries résistantes aux C3G aux autres classes d'antibiotiques isolées durant la période d'étude rétrospective

### 6.1 *Klebsiella pneumoniae*

Antibiotiques	Année 2019	Année 2020	Année 2021
AMK	8,50%	10,50%	7,80%
GEN	50,90%	41,60%	40,00%
CIP	61,80%	26,80%	20,20%
NAL	74,20%	37,30%	31,50%
COL	0%	0%	0%
FOS	100%	13,80%	13,50%
CHL	14,70%	23,30%	17,60%
SXT	81,30%	80,90%	79,40%

Tableau XVI : Evolution de la résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques.

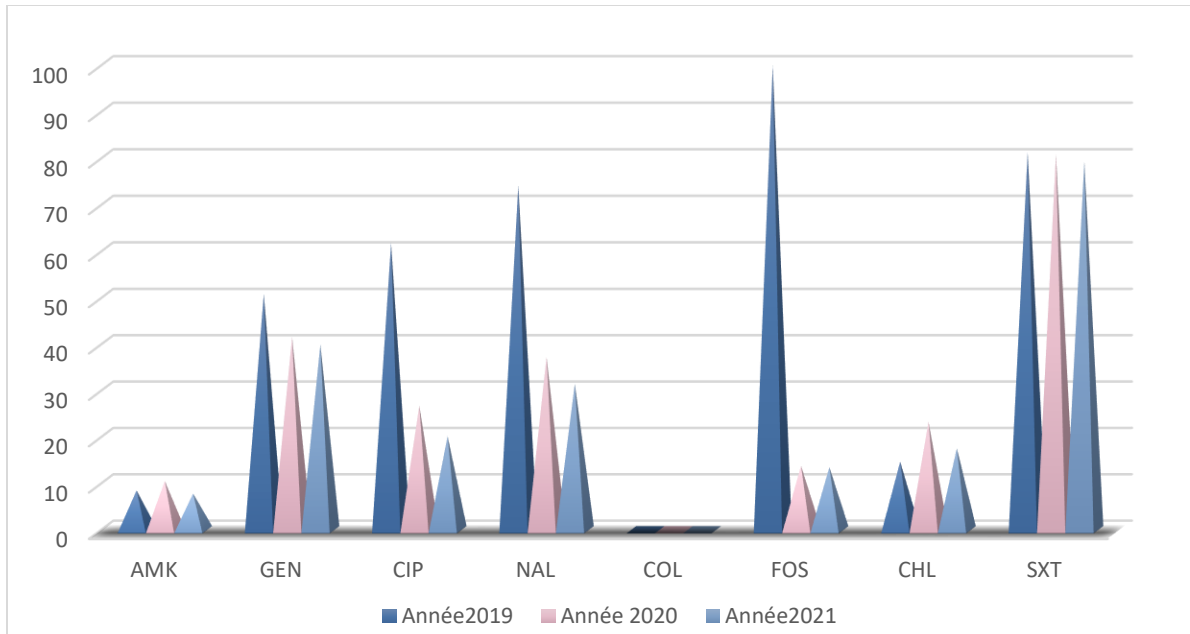


Figure 22 : Représentation graphique de l'évolution de la résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques.

### ➤ Interprétation

Selon l'histogramme, nous notons que l'évolutions de la résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux aminosides étaient différentes : les taux de résistance à l'amikacine sont relativement faibles (10%) cette résistance a connu une progression (de 8.5% en 2019 à 10.8% en 2020) puis une régression jusqu'à 7.8% en 2021, par contre les taux de résistance à la gentamycine sont plus élevés mais ont connu une diminution allant du 50.9% en 2019 à 40% en 2021.

Une diminution des taux de résistance à la ciprofloxacine (de 61.8% à 20.2%) et à l'acide nalidixique (du 74.2% à 31.5%) est constatée.

*Klebsiella pneumoniae* est restée sensible à la colistine (0% de résistance à la colistine durant les trois années a été enregistré).

Concernant la fosfomycine, la résistance a diminué au fil des années avec un pic de 100% en 2019.

La résistance au Chloramphénicol a connu une augmentation de 2019 à 2020 pour atteindre un taux de 23.3 % par la suite ce taux a diminué en 2021 (17,60%).

La résistance au STX avoisinant les 80% a connu des taux élevés et est restée relativement stable au cours des trois années.

## 6.2 *Enterobacter sp*

Antibiotique	Année 2019	Année 2020	Année 2021
AMK	20,60%	9,70%	3,80%
GEN	50 %	50 %	37,50%
CIP	63%	36,70%	30 %
NAL	100 %	64,30%	77,80%
COL	0%	0%	0%
FOS	0%	13,30%	15,40%
CHL	80 %	50 %	37,50%
SXT	83,30%	57,10%	77,80%

Tableau XVII : Evolution de la résistance de l'*Enterobacter sp* aux antibiotiques .

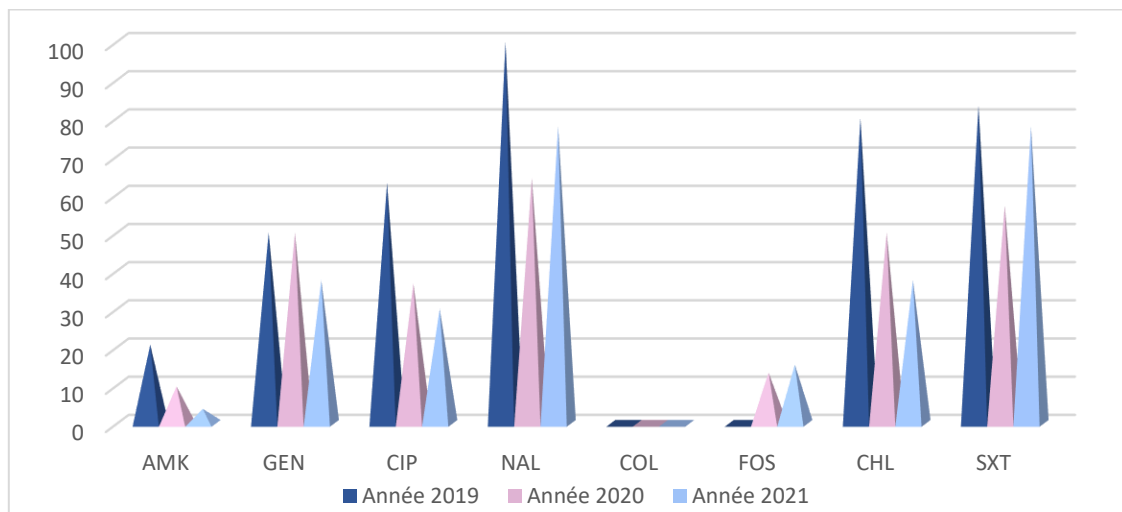


Figure 23 : Représentation graphique de l'évolution de la résistance du genre *Enterobacter* aux antibiotiques.

### ➤ Interprétation

La résistance du genre *Enterobacter* à l'amikacine a régressé de 20.60% en 2019 à 3.8% en 2021 et la résistance à la gentamycine était constante entre 2019 et 2020 avec un taux de 50% puis a régressé en 2021 jusqu'à 37.5%.

Pour la ciprofloxacine et l'acide nalidixique, on observe une diminution des taux de résistance de 62.5% à 30% et 100% à 77.8% respectivement. La résistance à l'acide nalidixique était plus grande à celles de la ciprofloxacine durant les années d'étude.

Concernant la colistine, elle était très active sur les souches du genre *Enterobacter* avec 0% de taux de résistance.

La résistance à la fosfomycine a connu une augmentation en passant de (0%) en 2019 et à 15,40% en 2021.

Pour le chloramphénicol, la résistance était très importante (80%) en 2019 puis elle a diminué jusqu'à atteindre 50% en 2020 et 37.5% en 2021.

La résistance au STX avait baissé après 2019 et était devenue stable à partir de 2020 avec un taux de 50%.

### 6.3 *Escherichia coli*

Antibiotique	Année 2019	Année 2020	Année 2021
AMK	8,80%	8,70%	4,70%
GEN	49,10%	33,90%	32,80%
CIP	63%	58,10%	63,70%
NAL	75,60%	71,70%	68,70%
COL	0%	0%	0%
FOS	0%	2,40%	2,60%
CHL	12,90%	6,50%	33,30%
SXT	71,40%	59,60%	56,30%

Tableau XVIII : Evolution de la résistance de l'*Escherichia coli* aux antibiotiques.

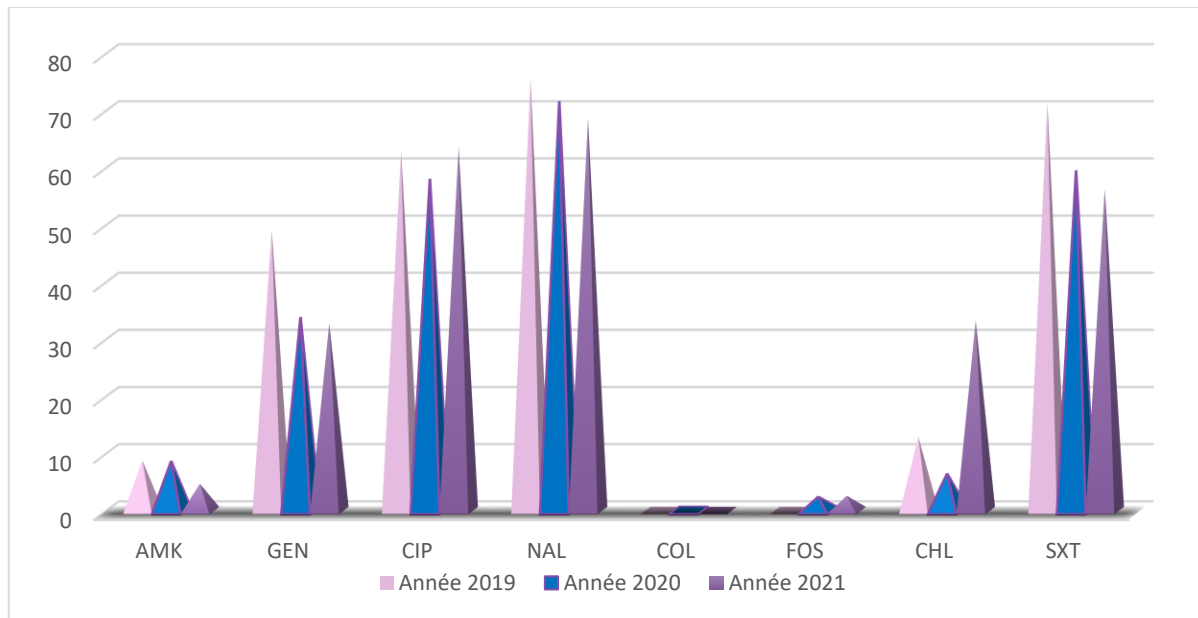


Figure 24 : Représentation graphique de l'évolution de la résistance d'*Escherichia coli* aux antibiotiques.

### ➤ Interprétation

Les taux de résistance des souches *d'Escherichia coli* RC3G à l'Amikacine sont relativement bas (moins de 10%), contrairement au taux de résistance à la gentamycine qui ont atteint les 49% en 2019.

Cependant, l'évolution de la résistance à ces deux aminosides a connu une diminution de 2019 à 2021 : de 8.8% à 4.7% pour l'amikacine et de 49.1% à 32.8% pour la gentamycine.

L'évolutions de la résistance aux deux quinolones (la ciprofloxacine, l'acide nalidixique) a connu une diminution entre 2019 et 2020, puis une augmentation en 2021 pour la ciprofloxacine et une diminution pour l'acide nalidixique.

La colistine représente l'antibiotique auquel *Escherichia coli* est restée très sensible durant les trois années avec des taux de résistance de 0%.

Le taux de résistance d'*Escherichia coli* à la fosfomycine a connu une augmentation en passant de 0% en 2019 à un pic de 2.6% en 2021.

*Escherichia coli* a présenté en 2021 le taux de résistance le plus élevé au chloramphénicol et qui est de 33.3 % alors que le taux de résistance le plus faible a été enregistré en 2019 et qui était de 12.9 %.

L'évolution de la résistance au STX a connu une diminution en passant du 71.4% en 2019 à 56.3% en 2021.

#### 6.4 *Citrobacter sp* :

Antibiotique	Année 2019	Année 2020	Année 2021
AMK	75%	33,30%	0%
GEN	40%	40%	100%
CIP	33%	80%	100%
NAL	0%	100%	0%
COL	0%	0%	0%
FOS	100%	0%	0%
CHL	100%	0%	0%
SXT	33,30%	20%	0%

Tableau XIX : Evolution de la résistance du *Citrobacter sp* aux antibiotiques.

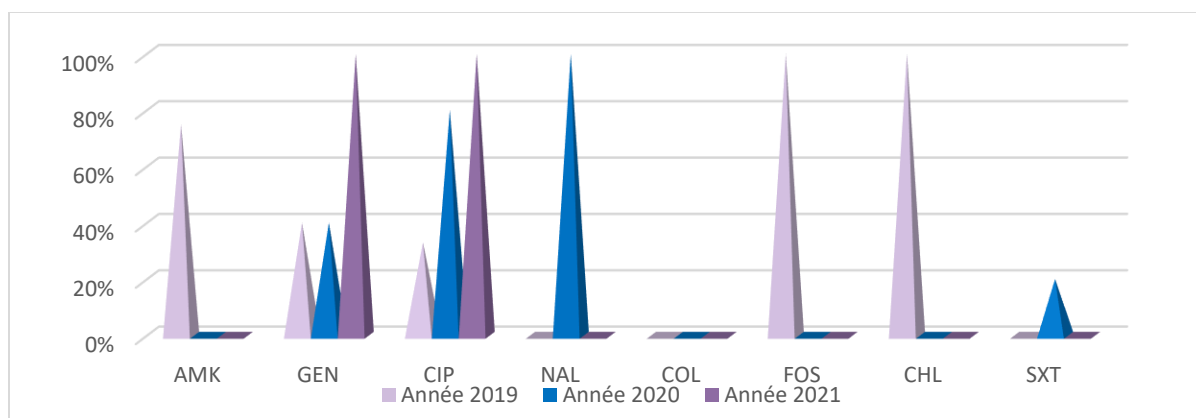


Figure 25 : Représentation graphique de l' évolution de la résistance du *citrobacter sp* aux antibiotiques.

### ➤ Interprétation

L'évolution de la résistance des souches du genre *Citrobacter* aux aminosides au fil des trois ans a connu une diminution pour l'amikacine (de 75% à 0%) et une augmentation pour la gentamicine (de 40% à 100%) entre 2020 et 2021 avec une stabilité d'un taux de 40% entre 2019 et 2020.

En ce qui concerne les quinolones : la résistance à la ciprofloxacine finit par une tendance augmentée vers l'année 2021, tandis que l'acide nalidixique a connu un pic de 100% en 2020.

La colistine représente l'antibiotique auquel le genre *Citrobacter* était très sensible avec des taux de résistance de 0%.

L'évolution de la résistance à la fosfomycine et du chloramphénicol se superpose parfaitement au fil des trois années (100% de taux de résistance en 2019 et 0% en 2020 et 2021).

La résistance au STX (Sulfaméthoxazole + triméthoprime) était en diminution au fil des trois années en passant de 33% en 2019 à 0% en 2021.

## 7. Profil de résistance aux autres classes d'antibiotiques des principales entérobactéries résistantes aux C3G isolées durant l'étude prospective

### 7.1 *Klebsiella pneumoniae*

Antibiotique	Pourcentage
Chloramphenicol	100%
Triméthoprime/Sulfaméthoxazole	76.50%
Nitrofurantoïne	56.70%
Acide nalidixique	56.70%
Gentamicine	50%
Ciprofloxacine	11.10%
Amikacine	0%
Colistine	0%
Fosfomycine	0%

Tableau XX : Profil de résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques .

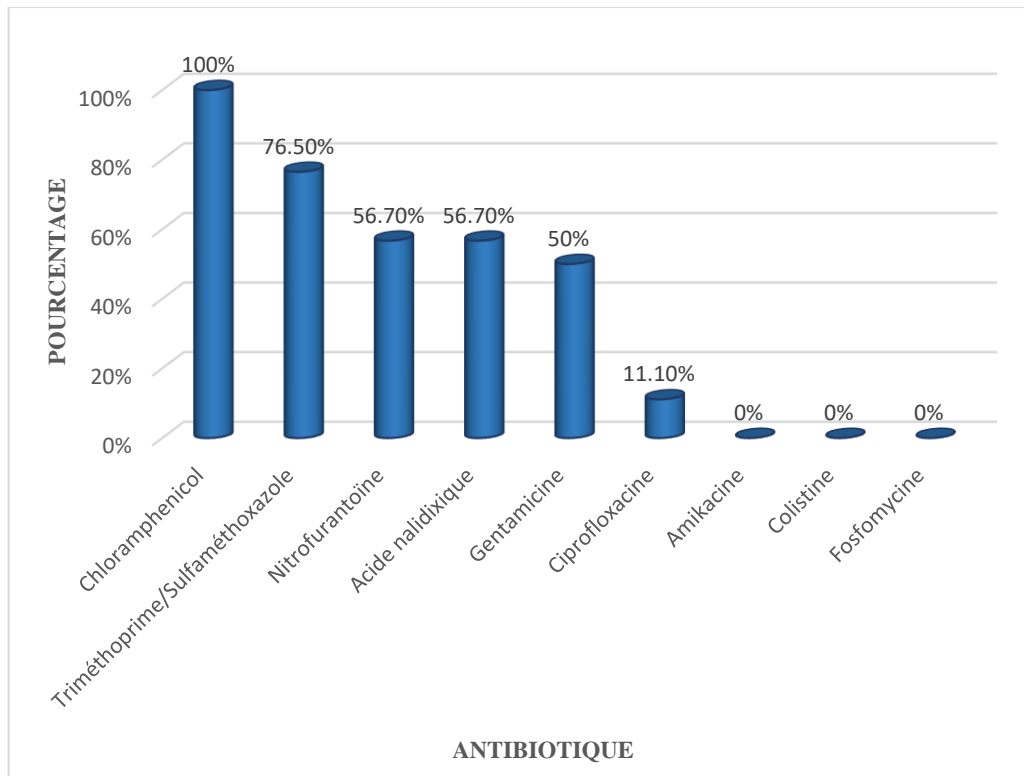


Figure 26 : Représentation graphique du Profil de résistance de *K. pneumoniae* aux antibiotiques

➤ **Interprétation :**

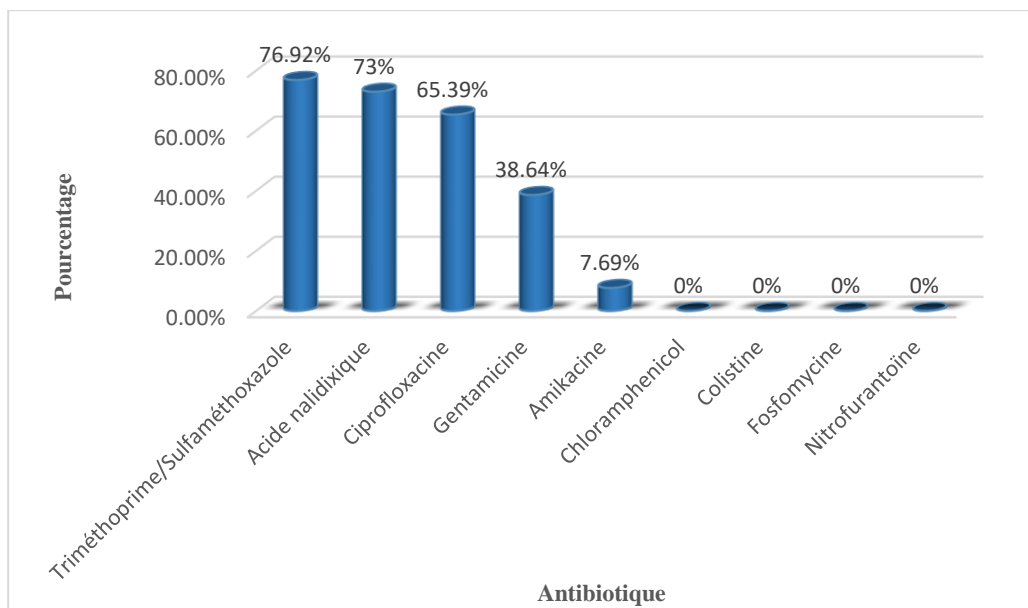
Les 20 souches de *K. pneumoniae* RC3G isolées pendant l'étude prospective présentent un taux de résistance élevé à la Chloramphenicol (100%), Et l'association Triméthoprim/Sulfaméthoxazole (76.5%).

Ces souches sont touchés par la résistance mais avec des taux plus bas pour la gentamicine (50%), La Nitrofurantoïne (56.7%) et les quinolones : la Ciprofloxacine (11.1%), et l'acide nalidixique (56.7%).

Toutes ces souches sont sensible à l'amikacine, la colistine et la Fosfomycine.

7.2 *Escherichia coli*

Antibiotique	Pourcentage
Triméthopriane/Sulfaméthoxazole	76.92%
Acide nalidixique	73%
Ciprofloxacine	65.39%
Gentamicine	38.64%
Amikacine	7.69%
Chloramphenicol	0%
Colistine	0%
Fosfomycine	0%
Nitrofurantoïne	0%

Tableau XXI : Profil de résistance d'*Escherichia coli* aux autres antibiotiques.Figure 27 : Représentation graphique du Profil de résistance d'*Escherichia coli* aux autres antibiotiques.

### ➤ Interprétation

Les 26 souches d'*E.coli* résistantes aux C3G isolées durant l'étude prospective présentent un taux de résistance élevé pour les quinolones ; Ciprofloxacine (65.39%) et l'acide nalidixique (73%), et l'association Triméthoprime/ Sulfaméthoxazole 76.92%.

Ces souches sont touchés par la résistance mais avec des taux plus bas pour la Gentamicine (38.46%) et l'amikacine (7.69%).

Toutes ces souches sont sensibles à la colistine, la Chloramphénicol, la Nitrofurantoïne et la Fosfomycine.

## 8. Taux d'Entérobactéries productrices de $\beta$ -lactamases à spectre élargi

### ✚ Étude rétrospective

	Nombre	Pourcentage
BLSE+	364	33.89%
BLSE-	710	66.11%
Total	1074	100%

Tableau XXII : Taux des souches d'entérobactéries productrices de BLSE+ isolées pendant la l'étude rétrospective.

Espèce	Année 2019	Année 2020	Année 2021	Nombre moyen	Moyenne
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	71	38	61	170	47%
<i>Escherichia coli</i>	61	50	34	145	40%
<i>klebsiella sp</i>	10	7	6	23	6%
<i>Enterobacter cloacae</i>	9	1	10	20	5.40%
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	0	1	2	0.50%
<i>Citrobacter sp</i>	1	1	0	2	0.50%
<i>Enterobacter sp</i>	0	0	1	1	0.30%
<i>Morganella morganii</i>	0	1	0	1	0.30%
Total	153	98	113	364	100%

Tableau XXIII : Répartition des souches d'entérobactéries productrices de BLSE isolées pendant l'étude rétrospective.

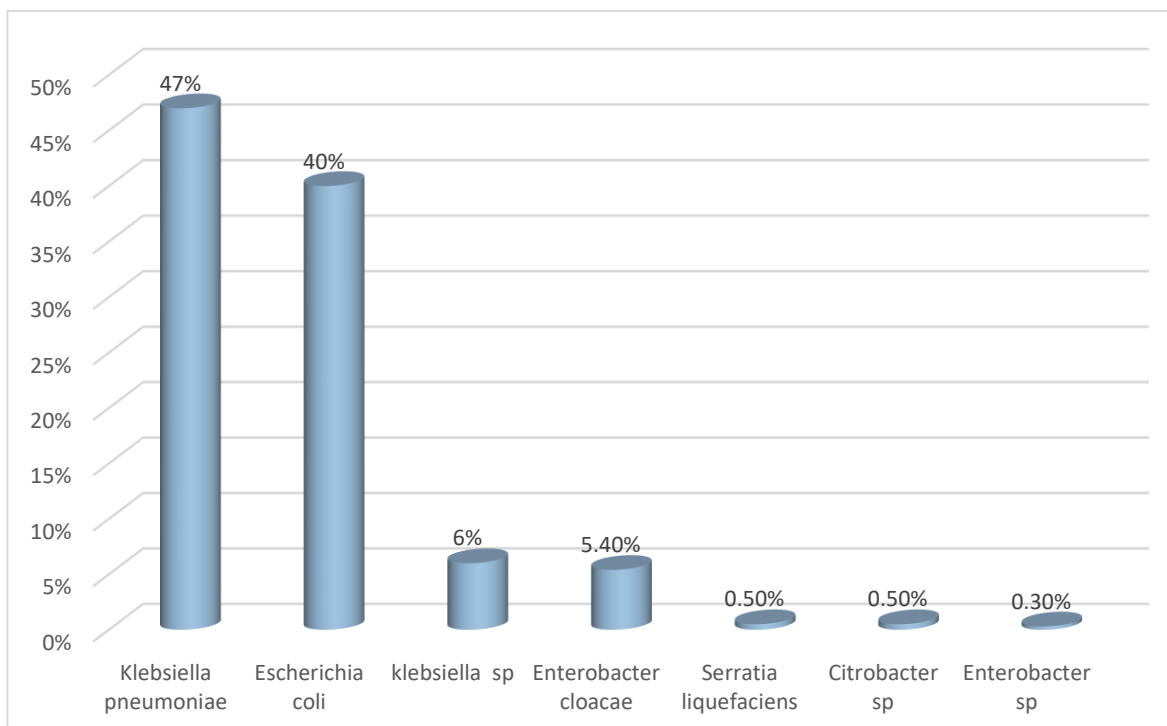


Figure 28 : Représentation graphique du pourcentage des souches d'entérobactéries productrices de BLSE+ isolées pendant l'étude rétrospective.

➤ **Interprétation**

Parmi les 1074 entérobactéries résistantes aux C3G, 364 ont été productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi, ce qui représente un taux de 33.89%.

✚ **Étude prospective**

Parmi les 86 entérobactéries RC3G testées, 55 ont été productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi, ce qui représente un taux de 63.95%.

	Nombre	Pourcentage
BLSE+	55	64%
BLSE-	31	36%
TOTAL	86	100%

Tableau XXIV : Taux des souches d'entérobactéries productrices de BLSE isolées pendant l'étude prospective.

Espèce	Nombre	Pourcentage
Escherichia coli	25	45.5%
Klebsiella pneumoniae	21	38.18%
klebsiella sp	5	9.1%
Serratia marcescens	2	3.62%
Enterobacter cloacae	1	1.8%
Enterobacter sp	1	1.8%
TOTAL	55	100%

Tableau XXV : Répartition des souches des entérobactéries productrices de BLSE+ isolées pendant l'étude prospective

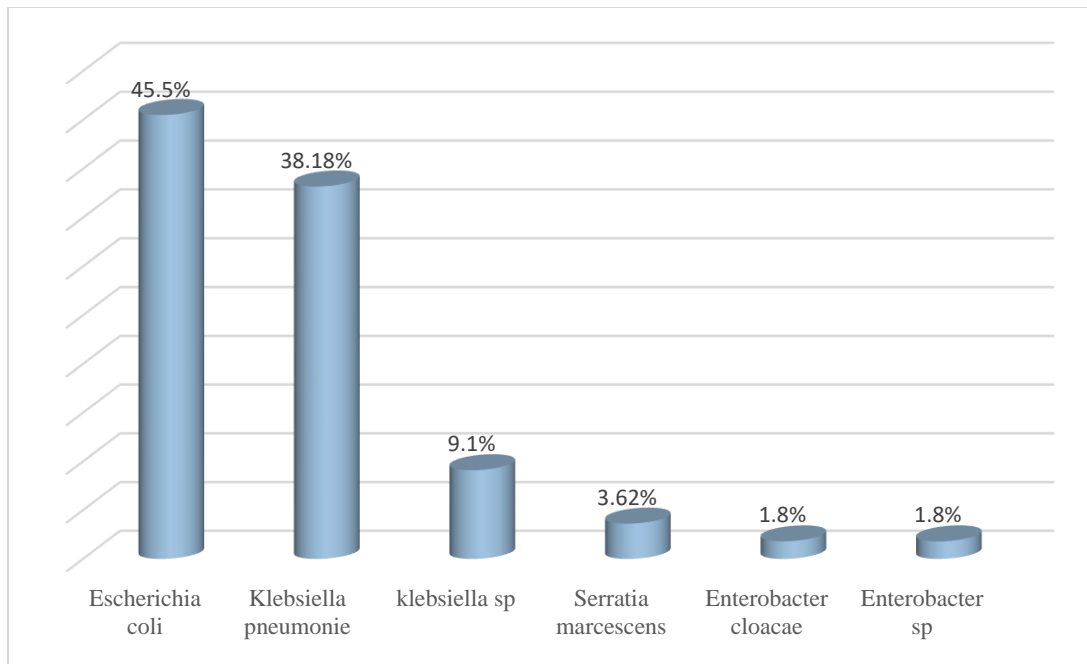


Figure 29 : Représentation graphique du pourcentage des souches d'entérobactéries productrices de BLSE isolées pendant l'étude prospective.

### ➤ Interprétation

Parmi les 86 entérobactéries RC3G testées, 55 ont été productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi, ce qui représente un taux de 63.95%.

La distribution totale des espèces productrices de BLSE pendant la période prospective relève que : *Escherichia coli* occupe la première place parmi les EBLSE (25/55) (45.5%). En deuxième position, on retrouve *Klebsiella pneumoniae* (21/55) (38.18%). Alors que pendant la période rétrospective *klebsiella pneumoniae* occupe la première place avec un pourcentage de 47% suivi par *Escherichia coli* avec un pourcentage de 40%.

A decorative gold frame with ornate, swirling flourishes at the corners and midpoints, enclosing the text.

*Discussions*

Les entérobactéries sont les bactéries les plus fréquemment isolées dans les laboratoires de bactériologie et qui sont responsable de nombreuses infections communautaires et nosocomiales particulièrement dans les pays en voie de développement [70].

Cette étude a été effectuée sur un collectif de 1074 souches d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération pendant la période rétrospective (2019,2020 ,2021) et 86 souches pendant la période prospective (08 février jusqu'à 08 avril 2022) isolées au niveau du laboratoire de microbiologie du CHU de TIZI OUZOU unité NEDIR MOHAMED.

Au cours de l'étude rétrospective, 3651 souches d'entérobactéries ont été isolées. Parmi eux, 1074 (29.42%) étaient résistantes aux C3G. Ce taux de résistance a diminué de 31.1% à 26.8% entre 2019 et 2020 ,cette diminution peut être expliquer par la diminution de l'activité des services de façons générale durant la période COVID-19, puis ce taux a ré-augmenté en 2021 à 29.5% avec la reprise progressive de l'activité des services . 261 souches EB isolées pendant la période prospective parmi les quelles 86 souches EBRC3G soit un taux de 33%.

Une étude similaire à notre étude en Tunisie, a révélé un taux plus bas (10.3%) d'ERC3G avec une augmentation significative de 8% à 16.3% entre 2002 et 2014[71].

Le sexe peut être considéré comme un facteur de risque important pour contracter une infection, dans notre étude rétrospective nous avons enregistré une prédominance des souches d'ERC3G chez les patients de sexe masculin (54.84%des souches étaient isolées chez des patients de sexe masculin et 43.39% de ces souches étaient isolées chez des patients de sexe féminin d'où un sexe ration H/F=1.2), Nous remarquerons de ce fait selon cette première étude que le sexe masculin est plus exposé aux infections à entérobactéries RC3G. Contrairement aux résultats de l'étude rétrospective, l'étude prospective a révélé que le sexe féminin est plus exposé à ces infections à ERC3G avec un pourcentage de 52.94%, chose constatée dans d'autres études similaires.

La prédominance féminine pourrait s'expliquer par le fait que les prélèvements d'origine urinaire étaient très largement majoritaires. En effet, les infections urinaires sont beaucoup plus fréquentes chez la femme que chez l'homme cela peut s'expliquer par plusieurs facteurs dont les plus importants sont les caractéristiques anatomiques de l'appareil urinaire féminin

En Algérie, La prédominance féminine est confirmée par plusieurs auteurs, Balahouane [72], Ould Baba ali et Taibi [73], avec une fréquence de 71,62 %, 54 % respectivement. Ceci a également été retrouvé Au Maroc [74] avec une fréquence de 85%, de même en Espagne[75]. Nous remarquerons que nos résultats de l'étude prospective sont proche de ceux de Ould Baba ali et Taibi [73] et inférieur à celui de Balahouane en 2013 [72], de Nadmi en 2010 [74] et de Seija et al en 2010[75].

Selon le présent travail, les services hospitaliers les plus touchés par les EBRC3G sont les services des urgences : on retrouve en tête le service d'urgence chirurgicale avec un taux de (12.66%) suivi du service d'urgence pédiatrique (12.48%) enfin le service d'urgence de médecine avec un pourcentage de (8.29%) pendant l'étude rétrospective. Cela s'explique par le fait que les patients admis dans ces services sont particulièrement vulnérables aux infections à des bactéries résistantes à cause de leur exposition fréquente aux antibiotiques ou de leurs défenses immunitaires amoindries .La circulation des patients entre unités différentes d'un même hôpital mais aussi entre hôpitaux, sur le plan national ou international, peut contribuer à la diffusion de cette résistance au monde entier. Par contre, En Tunisie les prévalences les plus élevées ont été observées dans le service de pédiatrie (25,1%), gynécologie (21,9%) et médecine (17,4%)[71].

Aussi, les souches isolées provenaient de divers prélèvements, la majorité des souches étaient isolées des prélèvements urinaires qui constituent donc le principal site d'infection par les entérobactéries résistantes aux C3G (54.90% des isolat pendant l'étude rétrospective et 51.16% des isolats pendant étude prospective proviennent des urines) suivis par le prélèvement de pus et enfin les autres types de prélèvements (sang, prélèvement respiratoire, vaginal ....) .la même répartition était retrouvée dans une autre étude faite dans un hôpital à DAKAR avec un taux important des souches isolées des urines suivis par le pus. Cette distribution est habituelle dans un laboratoire de bactériologie car l'ECBU constitue l'examen le plus fréquemment demandé.

En Tunisie, dans la région de Sfax un taux de 60% des souches isolées dans les urines ,est rapporté par mkaouar en 2008 [76].

Parmi ces entérobactéries résistantes aux C3G obtenues dans les études rétrospective et prospective on constate que *klebsiella pneumoniae* se positionne en tête comme l'espèce qui possède le plus de résistance aux C3G avec un taux de 53.34% (404/730), suivi d'*Enterobacter sp* avec un pourcentage de 50% (143/286), cette prédominance peut être expliquée par le fait que ces espèces sont caractérisées par des mécanismes de résistance qui leur permettent de faire face à la majorité des antibiotiques utilisés dans le traitement des maladies infectieuses. Une étude réalisée à l'hôpital de Douala, Cameroun de 2005 à 2012 montre aussi une prédominance de l'espèce *klebsiella pneumoniae* avec 680 souches résistantes [77].

Par ailleurs des études menées à Lomé, Togo [78], Mahdia, Tunisie [71], Sfax, Tunisie [76] et à Bouira, Algérie [79], ont montré des résultats différents de notre étude avec une prédominance de l'espèce *Escherichia coli*.

Les entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération (C3G) occupent une place importante dans les infections nosocomiales. Ces bactéries deviennent de plus en plus résistantes aux antibiotiques et commencent à franchir les limites de l'hôpital pour émerger dans la communauté. La dissémination de ces bactéries présente une menace grave qui met en cause la validité de l'arsenal antibiotique actuellement disponible, d'autant plus qu'aucune classe nouvelle d'antibiotique n'est attendue dans les prochaines années [76]. Les entérobactéries résistantes aux C3G avaient exprimé une résistance associée à la majorité des antibiotiques habituellement actifs sur les EB : comme les aminosides et les quinolones.

Durant la période d'étude, les souches d'*Escherichia coli* résistantes aux C3G ont présenté une résistance multiple à plusieurs antibiotiques. Pour la famille des quinolones, l'acide nalidixique constitue la molécule vis-à-vis de laquelle *Escherichia coli* a été la plus résistante avec un pourcentage de (72%) suivi de la ciprofloxacine (61.6%). Pour les aminosides (GEN, AMK) on a trouvé un taux de résistance de (38.6%) pour la gentamicine et (7.4%) pour l'amikacine. Notre étude a marqué des taux plus élevés de résistance par rapport à ceux notés par BOUZERAA A 2018 [20] et qui ont trouvé que *Escherichia coli* présente un faible taux de résistance pour la gentamicine (25%) et une sensibilité totale à l'amikacine. Pour la ciprofloxacine et l'acide nalidixique, ils ont trouvé une évolution de la résistance de (25%) à (50%) et (42,31%) à (50%) respectivement.

Nos résultats montrent un niveau de résistance important pour le STX (62.43%), ce taux est plus élevé que celui révélé par les résultats de (Bodring A. 2017)[80] et qui ont trouvé un pourcentage de résistance de 20.80%.

Par ailleurs, dans notre étude la colistine (0%), la fosfomycine (1.67%) et le chloramphénicol (17.57%), Ses résultats ont montrées les taux de résistances les plus faibles pour l' *Escherichia coli*.

Dans le cadre du suivi de l'évolution de la résistance des souches de *Klebsiella pneumoniae* résistante aux C3G, nous avons remarqué que pour la famille des aminosides, un taux de résistance faible a été noté pour l'amikacine (8.93%) et un taux plus élevé pour la gentamycine (44.7%). Pour l'acide nalidixique et la ciprofloxacine, on a enregistré des taux de résistance de (47.67%) et (36.27%) respectivement. Ceci peut être le résultat de l'utilisation abusive de ces molécules en médecine humaine qui a fait augmenter les taux de résistance et réduire ainsi l'efficacité de ces molécules.

Un taux de 80.53% a été détecté pour le STX et la meilleure sensibilité a été obtenue aussi bien avec le chloramphénicol (18.53%) qu'avec et colistine (0%).

Les résultats obtenus dans notre étude sont similaires à ceux de SAYE en 2012[81] en ce qui concerne les antibiotiques (GNT , AMK , COL ) et qui a obtenu 43.6% pour la gentamycine, 8.8% pour l'amikacine et 0% pour la colistine .

Nos isolats concernant la résistance d'*Enterobacter sp* ont montré des taux élevés de résistance vis-à-vis de l'acide nalidixique (80.7% de résistance), la ciprofloxacine (43.23%), le SXT (72.73%) et le CHL (55.83%)

Concernant les aminosides; on note un taux bas pour l'amikacine (11.37%) et la gentamicine n'est active presque que sur la moitié des souches (45.83%).

Nos résultats sont plus proches de ceux de SAYE T en 2012[81] concernant les antibiotiques (GNT, AMK, CHL) et qui a obtenu 47.5% pour la gentamycine, 13.5% pour l'amikacine et 54.5% pour le chloramphénicol.

Pour la Colistine (0%) et la Fosfomycine (9.5%) une excellente activité sur les souches étudiées est remarquée .comme cela été rapporté par (BOUZERAA A. et. Al 2018)[20].

Pour ce qui est de la résistance des souches de *Citrobacter sp* vis-à-vis des fluoroquinolones, un taux élevé a été noté pour la ciprofloxacine (71%) . pour les aminosides, la gentamycine (60%) et une résistance plus ou moins importante à l'amikacine (33%).

Par ailleurs, des taux de résistance similaires (33%) pour la fosfomycine et le chloramphénicol.

Une sensibilité totale envers la colistine et contrairement aux souches des autres espèces, les souches de l'espèce *Citrobacter sp* sont sensibles aussi au STX (que 18% de résistance)

D'un point de vue général, les molécules les plus actives sur les EBRC3G sont l'amikacine suivi de la fosfomycine et le chloramphénicol.

L'amikacine avait une bonne activité sur les souches d'EBRC3G. Cette tendance a également été retrouvée en Espagne par Guembe M. et al[82]. . Par contre Hashemi et al. Retrouvaient des taux plus élevés de résistance de l'ordre de 30% pour l'amikacine [84]. Les souches d'entérobactéries avaient des taux élevés de résistance aux fluoroquinolones contrairement à l'étude de Hashemi en Iran [83].

D'un autre côté, Pendant l'étude rétrospective on a retrouvé que 33.89% des souches des entérobactéries isolées sont productrices de BLSE. Ce taux de production de BLSE est largement supérieur à ceux rapportés à Marrakech (Maroc) par Ajdakar en 2015 [13] (13%) et en France par Jarlier en 2012 [84] avec 13,6%.Mais il est légèrement inférieur à ceux rapportés par Djahida en Algérie (37,1%).

Les principales espèces productrices de BLSE sont comme suit : *klebsiella pneumoniae* (*k pneumoniae* BLSE+) avec un taux de 47% suivis par l'*Escherichia .coli* (*E.coli* BLSE+) avec un pourcentage de 40%. Nos résultats sont supérieurs à ceux trouvés en 2007, au CHU Ben badis de Constantine où la fréquence d'isolement des souches *K pneumoniae* BLSE+ isolée à partir des

urines était de 14.28% (Sekhri-Arafa, 2011) [85], Et à celui de (Moukrad et al., 2012) [86] au Maroc qui a mis en évidence 31.4% de souches de *K pneumoniae* BLSE+.

Le taux de production de BLSE chez les souches d'entérobactéries isolées durant l'étude prospective est très élevé par rapport à celui de l'étude rétrospective où on a noté un taux de 63.95%, Dont 45.5% de ces souches appartiennent à l'espèce *E.coli* et 38.18% sont de type *Klebsiella pneumoniae*.

L'apparition des BLSE chez les souches d'entérobactéries est en rapport avec l'augmentation importante de l'utilisation des C3G et avec le déterminisme plasmidique des BLASE leur conférant une transmission d'espèce à espèce (Sirot J, .1988) [87].

A decorative gold frame with ornate, swirling flourishes surrounding the text.

*Conclusion*

Les entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif qui constituent une part importante des bactéries isolées lors de diagnostic bactériologique des infections humaines. Leur abondance dans l'intestin, leur mobilité, leur rapidité de multiplication, leur fréquente résistance aux antibiotiques expliquent qu'elles soient les bactéries les plus impliquées en pathologies infectieuse humaine.

A la lumière des résultats obtenus, il en ressort que 3651 souches d'entérobactéries ont été isolées et identifiées pendant l'étude rétrospective dont 1074 (29%) sont résistants aux C3G et 261 souches d'entérobactéries ont été isolées pendant l'étude prospective dont 86 (33%) sont résistantes aux C3G. Les infections par ces EBRC3G sont plus fréquentes chez le sexe masculin (54.84%) que chez le sexe féminin (43.39%) avec un sexe ratio de 1.2 pendant l'étude rétrospective, par contre le sexe féminin présente un taux d'infections par ERC3G plus élevé (52.94%) pendant l'étude prospective avec un sexe ratio de 1.1.

D'autre part, la plupart des souches d'EBRC3G ont été isolées essentiellement des prélèvements d'urines et de pus dans les deux études rétrospective et prospective. Ces souches provenaient essentiellement du service d'urgence chirurgicale pendant l'étude rétrospective et du service d'urgence de médecine pendant l'étude prospective.

D'après l'analyse des résultats d'antibiogramme on constate que *Klebsiella pneumoniae* a été l'espèce qui possédait les taux les plus élevés de résistance aux C3G dans les deux études. Ainsi que les antibiotiques les plus actives sur les EBRC3G sont l'Amikacine suivi de la Fosfomycine et du Chloramphénicol.

La production de BLSE chez les EBRC3G isolées durant l'étude prospective est plus importante que celles de l'étude rétrospective avec une prédominance des souches de *Klebsiella pneumoniae* BLSE+ durant l'étude rétrospective et *Escherichia coli* BLSE+ durant l'étude prospective.

Le taux de résistance des EB aux C3G dans le CHU de Tizi-ouzou est menaçant, en effet, la résistance de nombreuses espèces d'entérobactéries isolées aux céphalosporines à large spectre est en nette progression. Ce phénomène de résistance, difficile à maîtriser, doit trouver ses solutions dans de nouvelles approches de contrôle des infections et de la politique de l'antibiothérapie beaucoup plus que dans l'attente du développement de nouvelles thérapeutiques.

A decorative gold frame with ornate, swirling flourishes at the corners and midpoints, enclosing the text.

*Recommendations*

La dissémination des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques contribue à la morbidité et la mortalité dues aux maladies infectieuses. L'émergence et la propagation de la résistance bactérienne représentent une menace grave en milieu hospitalier et pour faire face à cette situation inquiétante plusieurs politiques de lutte nationales et internationales ont été mises en place et cela à plusieurs niveaux :

### **-Au niveau individuel**

Pour prévenir et combattre la propagation de la résistance aux antibiotiques, vous pouvez :

- N'utiliser ces médicaments que s'ils sont prescrits par un professionnel de santé qualifié ;
- Toujours respecter les conseils du soignant lorsque vous utilisez des antibiotiques ;
- Ne jamais partager vos antibiotiques avec d'autres personnes ou utiliser les médicaments qui vous restent ;

- Prévenir les infections en vous lavant régulièrement les mains, en suivant les règles d'hygiène pour la préparation de la nourriture, en évitant les contacts proches avec des malades et en tenant vos vaccinations à jour ;

- Eviter l'auto infection et la propagation des souches multirésistantes en respectant les règles d'hygiène.

### **- Les professionnels de santé**

Pour prévenir et combattre la propagation de la résistance aux antibiotiques, ils peuvent :

- Faire de la prévention en veillant à la propreté des mains, des instruments et de leur environnement ;
- Ne prescrire et délivrer des antibiotiques que quand ils sont nécessaires, en application des directives en vigueur ;
- Signaler les infections résistantes aux antibiotiques aux équipes de surveillance ;
- Isolement technique et géographique des patients infectés par les souches multirésistantes afin d'éviter la contamination croisée ;
- Parler à leurs patients de la prise correcte des antibiotiques, des résistances et des dangers d'un usage abusif ;

- Parler à leurs patients de la prévention des infections ( vaccination, lavage des mains...)

### **- Le secteur des soins de santé**

Pour prévenir et combattre la propagation de la résistance aux antibiotiques, il peut : investir dans la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques, vaccins, produits de diagnostic et autres outils [88] .



*Annexes*

## Annexe I

**Différents types de colorations utilisés dans l'examen microscopique**

- **Coloration de Gram** : C'est la coloration de référence en bactériologie. Elle est réalisée comme suite :
  - Sur frottis fixé à la chaleur puis l'alcool ;
  - Recouvrir la lame de violet de gentiane : 1 minute ;
  - Rejeter le violet de gentiane ;
  - Recouvrir de lugol : 1 minute ;
  - Rejeter le lugol ;
  - Décolorer à l'alcool, la lame étant tenue inclinée .la durée de décoloration à l'alcool est variable selon l'épaisseur de frottis .En pratique la durée de décoloration set suffisante lorsque ce qui s'écoule en bas de la lame inclinée est devenir clair
  - Stopper la décoloration par un nouveau lavage à l'eau ;
  - Recouvrir la lame de fuschine diluée : 30 secondes à 1 minute puis laver à l'eau ;
  - Sécher entre deux feuilles de papier filtre, puis à la chaleur ;
  - Examiner à l'immersion.

Résultat :

Les bactéries à Gram positif doivent apparaitre colorées en violet

Les bactéries à Gram négatif doivent apparaitre colorées en rose [15].

- **Coloration au bleu de méthylène** : Réalisée Sur un frottis correctement fixé comme suit
  - Recouvrir la lame avec le bleu de méthylène et le laisser agir pendant 1 minute ;
  - Effectuer un lavage à l'eau du robinet ;
  - Sécher entre deux feuilles de papier buvard puis observer à l'immersion[15].

## Annexe II

### Différents milieux utilisés pour la culture des entérobactéries

#### 1. Gélose BCP

La gélose BCP (Bromocrésol pourpre) est un milieu non sélectif, lactosé, utilisé essentiellement pour la culture des bacilles Gram négatif non exigeants et permet d'orienter l'identification des entérobactéries fermentant ou non le lactose.

- Le milieu vire au jaune (colonies jaune) : acidification du milieu par fermentation du lactose : lactose +

Le milieu reste violet : pas d'acidification du milieu : lactose - [89].

#### 2. Gélose au sang :

Les entérobactéries cultivées sur gélose au sang présentent généralement de grandes colonies lisses ou muqueuses, brillantes, circulaires et peuvent être hémolytiques ou non .les espèces *Proteus* présentent souvent un essaimage[26].

#### 3. Gélose au désoxycholate citrate

La gélose au désoxycholate citrate est un milieu sélectif utilisé pour l'isolement des agents pathogènes entériques, en particulier les espèces de *Salmonella et Shigella*. Ce milieu est sélectif pour les agents pathogènes entériques grâce à l'utilisation de grandes concentration de sels de citrate et de désoxycholate qui sont inhibiteurs pour les bactéries gram positif et la plupart des autres organismes intestinaux normaux. le lactose contenu dans ce milieu aide à différencier les bactéries fermentant le lactose (produisent des colonies rouges) de celles qui ne le fermentent pas (produisent des colonies incolores) , la dégradation du lactose provoque l'acidification du milieu

qui entoure les colonies concernées et donc virage de l'indicateur de PH de rouge neutre au rouge .les espèces *Shigella* et *Salmonella* ne fermentent pas le lactose mais les espèces *Salmonella* peuvent produire H<sub>2</sub>S , formant des colonies incolores avec ou sans centre noir[26].

#### 4. Gélose XLD

C'est un milieu sélectif des entérobactéries, utilisé pour l'isolement des *Salmonella* et *Shigella*, il permet l'orientation de l'identification en se basant sur 3 critères :

- La fermentation des sucres : les Shigelles ne fermentent pas le xylose ;
- La décarboxylation de la lysine : les Shigelles et salmonelles possèdent une LDC ;
- La production d H<sub>2</sub>S[15].

#### 5. Gélose Hektoen

C'est un milieu d'isolement sélectif des bacilles à Gram négatif, utilisé pour l'isolement des *Salmonella* et *Shigella* dans les selles .Ce milieu est plus riche que la gélose SS (gélose salmonella et *Shigella*) et convient d'avantage aux Shigelles.

Il contient :

- Des sels biliaires, le désoxycholate de sodium, pour inhiber la croissance des bactéries à gram positif ;
- 3 glucides : le lactose, saccharose et la salicine. La fermentation d'au moins un de ces glucides se traduit par une acidification du milieu et donc virage du bleu de bromothymol au jaune. Les bactéries n'utilisant aucun de ces glucides présentent des colonies vertes ou bleues.

Le thiosulfate de sodium et le citrate ferrique pour détecter les bactéries H<sub>2</sub>S+. Ainsi, sur ce milieu, les salmonelles forment des colonies bleu-vertes avec ou sans centre noir et les Shigelles présentent des colonies verte[90].

## 6. Gélose SS

Milieu d'isolement sélectif, utilisé pour rechercher les salmonelles et les Shigelles dans les selles.

Il contient :

- Des sels biliaires associés au vert brillant pour inhiber la culture des bactéries G+ ;
- Du lactose pour étudier le caractère lactose. La fermentation du lactose provoque l'acidification du milieu et donc virage du rouge neutre, utilisé comme indicateur du ph, au rouge/rose. Les bactéries n'utilisant pas le lactose présentent des colonies jaunes ou incolores.
- Le thiosulfate et citrate ferrique pour détecter les bactéries H<sub>2</sub>S+ ;

Ainsi, sur ce milieu :

- Les salmonelles forment des colonies incolore (lactose-) avec ou sans centre noir (H<sub>2</sub>S+ ou H<sub>2</sub>S-) ;
- Les Shigelles forment des colonies incolores (lactose-) sans centre noir (H<sub>2</sub>S-) ;
- E. coli forme des colonies roses/rouges : lactose+ et H<sub>2</sub>S- [91].

## 7. Gélose Mackonkey

C'est un milieu à base nutritive ordinaire, lactosé et sélectif des bacilles à Gram – non exigeants.

La croissance des bactéries Gram + dans ce milieu est inhibée par l'utilisation du cristal du violet et du désoxycholate de sodium.

La présence du lactose et du rouge neutre comme indicateur de ph permet de différencier les bactéries fermentant le lactose (colonies roses/rouges) de celles qui ne le fermentent pas (colonies incolores ou jaunes) [92]

## 8. Gélose CLED

La gélose CLED (Cystine Lactose Electrolyte Deficient) est un milieu d'isolement non sélectif, recommandé pour l'analyse bactériologique des urines.

La présence du lactose et du bleu de bromothymol permet de différencier les bactéries lactose + (colonies jaunes) des bactéries lactose – (colonies vertes/bleues).

La déficience en électrolytes limite l'envahissement du milieu par les Proteus[93].

## 9. Gélose Drigalski

C'est un milieu d'isolement lactosé, sélectif des bacilles Gram- non exigeants, contient le cristal violet et le désoxycholate de sodium pour inhiber la croissance des bactéries gram+. La présence du lactose et du bleu de bromothymol permet de distinguer les bactéries fermentant le lactose (colonies jaunes) et les bactéries lactose – (colonies vertes/bleues) [94].

### Annexe III

#### 1/Recherche de catalase

##### Technique

Il se fait par la mise en contact d'une colonies bactérienne avec l'eau oxygénée sur une lame ou dans un tube à hémolyse .la positivité de la réaction est révélée par la formation de bulles de gaz[95]..

#### 2/ Recherche de nitrate réductase

##### Technique

On utilise un milieu nitraté, par exemple, un bouillon nutritif supplémentaire de nitrates, ce milieu estensemencé avec la bactérie à étudier. Après incubation, on ajoute le réactif de Griess (mélange d'une solution d'acide sulfanilique et d'une solution de naphtylamine). Ce Réactif

prend une teinte rose en présence d'ions nitrites, l'apparition de cette coloration dans le milieu signifie que la bactérie possède un nitrate réductase.

En l'absence de coloration, soit la bactérie ne possède pas de nitrate réductase, soit les nitrates ont été réduits jusqu'au stade azote. Pour trancher, on ajoute le réactif de Zobell (poudre de zinc), composé capable de réduire les ions nitrates en nitrites. L'apparition de la coloration rose signifie que la bactérie ne possède pas de nitrate réductase. A l'inverse, l'absence de la coloration signifie que les nitrates ont été réduits au stade azote[15].

## **Annexe IV**

### **Galerie API**

#### **Technique**

-On réunit fond et couvercle d'une boîte d'incubation et on répartit environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide et on place la galerie dans la boîte d'incubation.

-A partir d'une culture fraîche sur milieu gélosé une suspension bactérienne dense est préparée en dissociant 4-5 colonies dans 5 ml d'eau physiologique stérile ;

-On remplit les tubes et cupules des tests CIT, VIP et GEL avec la suspension bactérienne et on remplit uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests ;

-On réalise une anaérobiose dans les tests ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE en remplissant leur cupule d'huile de vaseline ;

-On referme la boîte d'incubation qu'on incube à 37°C pendant 24H. Après incubation, on note sur la fiche de résultat, toutes les réactions spontanées ;

-La révélation des trois TDA, VP et indole est faite par l'ajout des réactifs nécessaires (TDA, VP1, VP2 et KOVACS) ;

-L'identification est réalisée à l'aide d'un code obtenu après la lecture de la galerie.

#### **➤ Lecture de la galerie**

La lecture de la galerie est réalisée après l'incubation à 37 °C pendant 24 heures, les tests sont regroupés par triplet de gauche à droite, les trois valeurs obtenues sont additionnées pour obtenir le code du triplet, on obtient un code à 7 chiffres qui devrait correspondre aux références de la base de données, ce qui permet d'identifier la bactérie[25].

## Annexe V

### Mode opératoire de système Vitek 2

Au laboratoire, il existe une nouvelle méthode d'identification et d'antibiogramme en utilisant un appareil récent « Vitek 2 ».

#### ➤ Préparation des suspensions bactériennes

- Déposer les tubes secs sur le portoir et remplir chaque tube avec 3ml d'eau physiologique (En considérant chaque deux tubes successifs en ordre correspondent à une même suspension bactérienne) ;

- Prélever une colonie bien isolée sur milieu gélosé (Hektoen ou Chapman) à l'aide d'une pipette Pasteur, puis dissocier la colonie dans le 1er tube jusqu'à voir un trouble ;

- Mesurer la densité de la suspension bactérienne à l'aide d'un Densimètre, en jouant sur la concentration de notre suspension bactérienne (la densité doit être de 0,5) ;

**NB** : Ce 1er tube va servir pour l'identification si on ne connaît pas la souche.

- A partir du 1er tube, prélever 145µl de la suspension bactérienne Gram négatif, ou 280µl de la suspension bactérienne Gram positif, et Mettre le volume prélevé dans le 2 -ème tube contenant 3 ml d'eau physiologique, et agiter.

**NB** : Le 2ème tube servira pour l'antibiogramme.

#### ➤ Installation des cassettes d'identification ou d'antibiogramme

Déposer stérilement les cassettes d'identification pour les 1ers tubes et les cassettes d'antibiogramme (Gram négatif ou gram positif) pour les 2èmes tubes dans le portoir en trempant leur collecteur à l'intérieur des tubes préparés.

- Chaque cassette d'identification présente plusieurs caractères biochimiques.
- Chaque cassette d'antibiogramme présente plusieurs antibiotiques.

➤ **Remplissage, chargement et incubation des cassettes**

- Mettre le portoir contenant les tubes et les cassettes dans la chambre de remplissage de Vitek 2 et signaler sur l'écran le remplissage ;
- Patienter jusqu'à ce que les cassettes se remplissent de la suspension et Vitek 2 va arrêter de remplissage ;
- Déplacer le portoir de la chambre de remplissage à la chambre de chargement (cette dernière possède un système d'incubation) et signaler le chargement sur l'écran ;
- Laisser les cellules des cassettes jusqu'elles se charge, Vitek 2 va détacher le portoir avec les tubes et laisser les cassettes pour incubation ;
- Enregistrer dans le logiciel : le numéro, le nom et le prénom du patient ;
- Après 9 à 10 h d'incubation, l'opération va se terminer, les cassettes vont se retirer de l'appareil, et les résultats sont imprimés.

Les cartes sont identifiées par un code à barres précisant le type de carte (carte Gram négatif, Gram positif, corynébactéries, Neisseria / Haemophilus), le numéro de lot, la date de péremption.

L'inoculum de départ doit être voisin de 0,5 McFarland et le délai d'obtention du résultat variable de 2 à 8 heures pour les grams positifs et de 2 à 10 heures pour les grams négatifs.

Les tests varient bien évidemment en fonction des cartes et ce principe plus de 120 espèces peuvent être identifiées pour les Grams positifs et plus de 150 pour les Grams négatifs fermentants et non fermentants [15].

## **Annexe VI**

### **Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**

Le principe de la technique consiste à réaliser une succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en œuvre deux amorces ou primers (séquences nucléotidiques courtes) qui définissent alors, en la bornant, la séquence à amplifier.

Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes : une dénaturation de l'ADN pour séparer les deux brins complémentaires qui le composent, puis une hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée et enfin une élongation grâce à l'action d'une ADN polymérase. Ce cycle est répété un grand nombre de fois afin d'obtenir une multiplication de la séquence d'ADN cible à la fin de la réaction [96].

## **Annexe VII**

### **Test de sensibilité aux antibiotiques (Antibiogramme)**

- **Milieu pour antibiogramme**

- Le milieu adéquat il doit être coulé en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm.
- Les géloses doivent être séchées avant l'emploi.

- **Préparation de l'inoculum**

-A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques. Dans le cas de

Streptococcus sp et d'Haemophilus sp utiliser un écouvillon pour prélever plus facilement les colonies bactériennes.

-Bien décharger l'anse ou l'écouvillon dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.

Dans le cas de Neisseria gonorrhoeae, décharger l'anse dans 1 à 2 ml de tampon phosphate stérile à pH 7,2.

-Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 MF ou à une D.O. de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm. L'utilisation d'un densitomètre est fortement souhaitable.

- **Ensemencement**

- Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum ;

- L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum ;

- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées ;

- Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose ;

- Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

- **Application des disques d'antibiotiques**

Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotique sur une boîte de 90 mm.

Pour les bactéries exigeantes (Streptococcus sp. Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Haemophilus sp...), ne pas mettre plus de 4 disques par boîte de 90 mm.

Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de pinces bactériologiques stériles et ne pas déplacer les disques après application.

- **Conditions d'incubation :**

- Respecter la température, l'atmosphère et la durée d'incubation recommandées pour chaque bactérie.

- **Lecture**

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse ;
- Pour les bactéries testées sur MH simple, les mesures seront prises en procédant par transparence à travers le fond de la boîte de Pétri fermée ;
- Pour les bactéries testées sur MH au sang, les mesures de diamètres de zones d'inhibition seront prises, boîte de Pétri ouverte et bien éclairée ;
- Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes ;
- Classer la bactérie dans l'une des catégories S (sensible), R (résistant), ou I (intermédiaire)[69].

**Annexe VIII** : : Classification des antibiotiques [32].

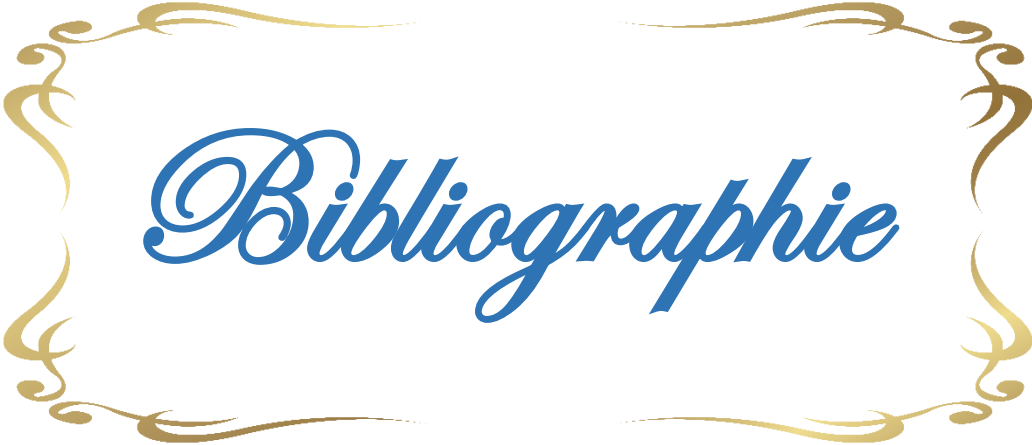
Classe	Dci
<b>Bêtalactamines</b>	
Pénicillines	G : benzylpénicilline (et forme retard) V : phénoxyéthylpénicilline M : cloxacilline, oxacilline A : amoxicilline, ampicilline Carboxypénicillines : ticarcilline Urédopénicillines : pipéracilline Apparenté : pivmécillinam Témocilline

Céphalosporines	1ère génération : céfaclor, céfadroxil, céfatrizine, céfalexine, céfazoline 2ème génération : céfamandole, céfuroxime 3ème génération (injectable) : céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone 3ème génération (orale) : céfixime, cefpodoxime, céfotiam, ceftazidime-avibactam 4ème génération : céfépime Autres céphalosporines : ceftobiprole, ceftaroline, ceftolozane + tazobactam
Céphamycines	Céfoxitine
Carbapénèmes	Imipénem, ertapénème, méropénem
Monobactam	Aztréonam
Inhibiteurs de bêta Lactamases	Acide clavulanique, tazobactam – amoxicilline + acide clavulanique – ticarcilline + acide clavulanique – Pipéracilline + tazobactam – ceftolozane + tazobactam
<b>Glycopeptides</b>	
Vancomycine, teicoplanine, télavancine (AMM européenne)	
<b>Polypeptides</b>	
Polymyxine	Polymyxine B, colistine (polymyxine E)
Lipopeptides	Daptomycine
<b>Quinolones</b>	
Quinolones	1ère génération : Acide pipémidique, fluméquine
Fluoroquinolones	Norfloxacin, ofloxacin, péfloxacin, ciprofloxacine, lévofloxacine, moxifloxacine, loméfloxacine
Rifamycines	
Rifamycines, rifabutine	
<b>Sulfamide</b>	
Sulfaméthoxazole – triméthoprime	
<b>Nitro-imidazolés</b>	
Métronidazole, ornidazole	
<b>Aminosides</b>	

Tobramycine, gentamicine, amikacine	
<b>Tetracyclines</b>	
Cyclines	Minocycline, doxycycline
Glycylcyclines T	Tigécycline
<b>MLSK : macrolides, lincosamides, synergistines, kétolides</b>	
Macrolides	Érythromycine, azithromycine, clarithromycine, josamycine, roxithromycine, spiramycine
Lincosamides	Clindamycine, lincomycine
Synergistine-Streptogramine	Pristinamycine
Kétolide	Télithromycine
<b>Oxazolidinones</b>	
Linézolide, tédizolide	
<b>Phénicolé</b>	
Thiamphénicol	
<b>Divers</b>	
Acide fusidique, fosfomycine, nitrofurantoïne	

**Annexe IX :** Nombre de Contrôles qualité interne par année pour la souche de référence .

La souche de référence	Année 2019	Année 2020	Année 2021
<b>E.coli ATCC25922</b>	<b>36</b>	<b>30</b>	<b>30</b>

A decorative gold frame with ornate, swirling flourishes at the corners and midpoints, enclosing the text.

*Bibliographie*

## BIBLIOGRAPHIE

1. Joly B, Reynaud A. Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic. Paris: Edition Techniques et Documentation paris : techniques et documentation ; 2007.
2. Paterson D. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. Am J Infect Control. mai 2006 ; 34(5): 20-8 p.
3. . Rossolini GM, Mantengoli E, Docquier JD, Musmanno R A, Coratza G. Epidemiology of infections caused by multiresistant gram-negatives: ESBLs, MBLs, panresistant strains. New Microbiol. Fév2008; 30(3):332-9 p.
4. Cavallo JD, Fabre R, Jehl F, Rapp C, Garrabé E. FRJFRCGE.. Bêtalactamines. EMC- Maladies infectieuses. Mar2004; 34(5):20-8 p.
5. Baba Ahmed-Kazi TZ, Decre D, Genel N, Boucherit-Otmani Z, Arlet G, Drissi M. Molecular and Epidemiological Characterization of Enterobacterial Multidrug-Resistant Strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008-2010). Microb Drug Resist. 2013 jun; 19(3): 185-90 p.
6. J Freney . Bactériologie des Entérobactéries isolées au niveau du Service de Réanimation de l'Hôpital Militaire Régional Universitaire de Constantine.
7. FRENEY J, RENAUD F, HANSEN W, et BOLLET C. Précis de bactériologie clinique. Paris: Editions EKA; 2000, 1107 p.
8. Identification of Enterobacteriaceae - Gov.uk - Recherche Google [Internet]. cité:13fev2021. disponible sur :  
**<https://www.google.com/search?q=Identification+of+Enterobacteriaceae++Gov.uk&aq=chrome.69i57.9117j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8>**.
9. Khayar Y . Comportement des entérobactéries isolées des urines vis-à-vis de l'amoxicilline – acide clavulanique, l'imipenème et l'ertapénème (Thèse); 2011.
10. Guiraud P J. Microbiologie alimentaire. paris: les preses ISBN; 2012; 22,80,171 p.
11. Bonnet R .  $\beta$ -lactamines et Entérobactéries. Dans R. LECLERCQ, & E. BINGEN, Antibiogramme. edition:ESKA . paris; 2006, 141-177 p.
12. CRRISTIAN C. Microbiologie Hygiène Base Microbiologique de la diététique. PARIS:édition TEK et DOK LAVOISIER ; 2008, 250 p.
13. Adjakar. , Entérobactéries  $\beta$ -lactamases à spectre étendu EBLSE : mécanismes de résistance aux antibiotiques et méthodes de détection au laboratoire ,Mémoire d'obtention du diplôme de master en sciences biologique. 2015..
14. Delarras C. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire

## BIBLIOGRAPHIE

- paris: Techniques et Documentation Lavoisier,; 2007, 128-129 p.
15. Denis F, Cécile M, Christian M , Cattoir V. Bactériologie Médicale, techniques usuelles.Elsevier masson 3ème édition ; 2016.
  16. DCEM1 N. Bactériologie. Université Pierre et Marie Curie. 2003;; 72 p.
  17. Kassama M , Hamadi S. Evaluation de la résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries isolées à l'établissement hospitalier spécialisé de Constantine. Constantine: Université Constanstine ; 2013, 62 p.
  18. Ben moussa A . Profile de sensibilité des entérobactéries aux fluoroquinolones au chu de Rabat. Université Mohammed V- Rabat[thèse]; 2016.
  19. AVRIL L, DARBERNAT H, DENIS F, MONTEIL H. Bactériologie clinique, 3 ème génération: Paris: Ellipses édition Marketing S.A; 2000, 171,172 p.
  20. Bouzeraa A, Berrihil H. bactériologie des entérobactéries isolées au niveau du service de réanimation de l'hôpital militaire régional universitaire de constantine(HMRUC)[mémoire] Constantine:université frères mentouri constantine1; 2018.
  21. Pr D Raoult ,Sacha R. manuel de prélèvement marseille ; 2018.
  22. Yahia R. Rôle du laboratoire dans le diagnostic d'une infection bactérienne; 2015.
  23. Hayette M.P. Huynen P, Meex C. Travaux pratiques de microbiologie générale. Documents pédagogiques : notes de cours et syllabus. Université De Liège; 2010, 8,36,38,39,40 p.
  24. B Carbonnelle, Denis F, Marmonier E, Pinon G, Vargues R. Bactériologie médicale : Techniques usuelles. SIMEP SA PARIS; 1987, 121-137, 146-155. p.
  25. veg-di-g-Galerie API[Internet].[Cité 9 avr 2021] Disponible sur. [En ligne]. Disponible sur: <http://ephytia.inra.fr/fr/C/23587/Veg-Di-g-Galeries-API>.
  26. ENTEROBACTERIACEAE-CAMPYLOBACTER-HELICOBACTER.PDF[internet]cité:15fév2021.disponiblesur. [En ligne]. Disponible sur: [https://www.jfmed.uniba.sk/fileadmin/jlf/Pracoviska/ustav-mikrobiologie-a-immunologie/ENTEROBACTERIACEAE\\_CAMPYLOBACTER\\_HELICOBACTER.pdf](https://www.jfmed.uniba.sk/fileadmin/jlf/Pracoviska/ustav-mikrobiologie-a-immunologie/ENTEROBACTERIACEAE_CAMPYLOBACTER_HELICOBACTER.pdf).
  27. CLSI Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Second Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, M100 S22, Wayne, PA.; 2012.
  28. Jorgensen J H.Ferraro M J,. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. Clin Infect Dis; 2009, 49(11) ;1749-1755 p.

## BIBLIOGRAPHIE

29. Pouget M . salmonellose mammaire ovine : caractérisation clinique et bactériologique.école nationale vétérinaire de Toulouse ; 2006.
30. Sako A. l'évaluation d'un test rapide dans le diagnostic de fièvre typhoïde dans les centres périphériques du district de bamako; 2004.
31. Mohammedi D. Classification et mode d'action des antibiotiques –cours de microbiologie .
32. Limat S. Pharmacie clinique et thérapeutique, 5e édition revue et Augmentée. Elsevier Masson, 2018.
33. agence française de sécurité sanitaire des aliments, « BULLETIN DU RESAPATH », no08; 2005.
34. Silver L. fosfomycin:mechanism and resistance, cold spring harb perspect med , 2017 fev;7(2). , doi: 10.1101/cshperspect.a025262.
35. Malhotra A ; Kakar P N ;Arora D, Das S ,Govil P. Colistin and polymyxin B: Are-emergence , Indian J. Crit. Care Med. juin2009 ; 13(2): 49-53 p.
36. Gadou V. epidemiologie moleculaire des enterobactéries productrice de b-lactamases a spectre elargi résistates aux aminosides et aux fluoroquinolones dans le district d'abidjan,cote d'ivoire,université Félix Houohouet-Biogny :disponible sur. [En ligne]. [consulté le 23 mars 2021]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02417084>.
37. Hachemian S, Farhadi T, Ganjparvar M. Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care , drug des.Devel ,THER. 2018; 1759-1767 p.
38. Andriole VT. The Quinolones. Elsevier,; 2000.
39. Organisation mondiale de la santé (OMS).thème de santé.résistance. 16 nov 2015.
40. Muylaert A, Mainil J. Bacterial antimicrobial resistances: the mechanisms and their contagiousness. Annales de Médecine Vétérinaire. ; 156(2): 109-123 p.
41. Meunier O, Exinger J, Kara F. des BMR à l'émergence des BHRé; 2016, 20 p.
42. Jenkis D R . Nosocomial infections and infection control », Medicine (Baltimore). sept 2021, doi: 10.1016/j.mpmed.2021.07.007..
43. Carle S . La résistance aux antibiotiques: un enjeu de santé publique important! Pharmactuel. 2009; 42: 6-21 p.
44. TALBERT WILLOQUET G, GERVAIS R M. Guide pharmaco clonique. Italie: Les presses d'imprimer LEGOPRINT. 2015; 1060,1068,1077,1091 p.

## BIBLIOGRAPHIE

45. Philippon A. Résistance bactérienne : définitions, mécanismes, évolution. Maladies infectieuses. 2008.
46. Frédéric Robina LG. Résistances naturelles et acquises aux bêta-lactamines chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quotidienne ? L'ANTIBIOGRAMME ET SON INTERPRÉTATION PHÉNOTYPIQUE EN 2012. 5 juin 2012; 48-53 p.
47. Grimont F. et Grimont P.A.D. The Genus Enterobacter. Prokaryotes; 2006, 197-214 p.
48. Bonnet R . Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. 2019.
49. Gral N . Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle. Journal des Antinfectieux. Journal des Antinfectieux. 2011;: 3-16 p.
50. Jean Marie Pagés. Perméabilité membranaire et résistance aux antibiotiques chez les bactéries à gram négatif. sciencedirect. 2003;: 57-63 p.
51. Robin L, Gibold , Bonnet R. Résistances naturelles et acquises aux  $\beta$ -lactamines chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quotidienne ? , Rev. Francoph. Lab. 2012 sept;: 47-58 p.
52. Bush K ,Jacoby, G.A.. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2010; 54: 969-976 p.
53. Perez F, Endimiani A, Hujer K.M, Bonomo R A. The continuing challenge of ESBLs. Curr Opin Pharmacol. 2007; 7: 459-469 p.
54. Bassetti M. Antibiorésistance des entérobactéries isolées d'ECBU réalisés dans huit établissements pour personnes âgées dépendantes(EHPAD)en france. journal of clinical microbiology. 2008; 29-34 p.
55. Queenan AM, Bush K. Carbapenemase: the versatile  $\beta$ -lactamases. Clin. Microb. Review. 2007; 20(3): 440-458 p.
56. Perez F, Endimiani A, Hujer K M , Bonomo R.A. Prevalence and characteristics of rmtB and qepA in Escherichia coli isolated from diseased animals in China. Frontiers in Microbiology. 2013.
57. Arakawa Y, Wachino J. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. Drug Resistance Update. 2012; 15:133-148P.
58. Galimand M , Courvalin P, Lambert T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. Antimicrobial. 2003.
59. Durante-Mangoni E , Grammatikos A , Utili R, Falagas M E . Do we still need the

- aminoglycosides? *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2009; 33: 201-205 p.
60. Baba Ahmed-Kazi Tani Z, Decré D, Genel N, Boucherit-Otmani Z., Arlet, G , Drissi M.. Molecular and Epidemiological Characterization of Enterobacterial Multidrug Resistant Strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008–2010). *Microbial Drug*. .
61. Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation : emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clinical Infectious Diseases*. 2007; 45: 88-94 p.
62. Tran J H, Jacoby G A , Hooper D C .Interaction of the plasmid encoded quinolone resistance protein Qnr A with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 2005, 118-125 p.
63. Honoré S, Lascols C, Malin D, Targaouchi R, Cattoir V, Legrand P, et al. Émergence et diffusion chez les entérobactéries du nouveau mécanisme de résistance plasmidique aux quinolones Qnr (résultats hôpital Henri-Mondor 2002–2; 2006.
64. Huovinen P, Sundström L, Swedberg G, Sköld O.. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995; 39(2): 279-289 p.
65. Sundström L, Rådström P, Swedberg G, Sköld O. Site-specific recombination promotes linkage between trimethoprim-and sulfonamide resistance genes. Sequence characterization of *dhfrV* and *sulI* and a recombination active locus of Tn21. *Molecular and general genetic MGG*. 1988; 213(2-3): 191-201 p.
66. Amyes S; Towner K. Trimethoprim resistance; epidemiology and molecular aspects:—a review based upon a Symposium held on 19 April 1989 at the 4th European Congress of Clinical Microbiology, Nice, France. *Journal of medical microbiology. ournal of medical microbiology*. 1990; 31(1).
67. Shaw W V. Chloramphenicol acetyltransferase: enzymology and molecular biology. *CRC Crit Rev Biochem*. 1983; 14(1): 1-46 p.
68. Parent R , Roy P H. The chloramphenicol acetyltransferase gene of Tn2424 : a new breed of cat. *J Bacteriol*. 1992; 174(9): 2891-2897 p.
69. Abaiyad R , Aggoune N , Ammari H , Azzam A , Benamrouche N , Benslimani A et al. Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotique à l'échelle nationale , 8 -ème édition 2020.
70. Bao L, Peng R , Ren X , Ma R L , Wang Y. 2013. Analysis of some common pathogens and their drug resistance to antibiotics. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 2013 ; 29: 135–139.
71. Majdoub A, Ben Hadj Kalifa A , Bannour I , Meksi Y , Ouaz M. situation épidémiologique des entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3ème génération dans la région de mahdia, tunisie (2002-2014). *LA TUNISIE MEDICALE* , 2018.

## BIBLIOGRAPHIE

72. Balahouane N . Étude de la résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries isolées à partir de divers prélèvements pathologiques au niveau de l'hôpital de Koléa. Mémoire de master : Microbiologie. Blida, Algérie : Université Saad Dahlab,2013 ; P 76.
73. Ould Baba Ali, R ; Taibi K . Étude de l'antibiorésistance des entérobactéries productrices de Beta-lactamases à spectre étendu isolées à l'Hôpital de Boufarik. Mémoire de Master : Microbiologie. Blida, Algérie. Université de Blida 1,2019 ; P 76.
74. Nadmi, H ; Elotmani, F ; Talmi, M , Zerouali, K . Profil de résistance aux antibiotiques des entérobactéries uropathogènes communautaires à El Jadida (Maroc). Médecine et maladies infectieuses.2010 ; 40(5) : P 303-305.
75. Seija V, Frantchez V, Pintos M, Bataglino M N, Torales M , et al. Etiología de la infección urinaria de adquisición comunitaria y perfil de susceptibilidad de Escherichia coli a los principales agentes antimicrobianos. Revista Médica del Uruguay .2010 ;26(1):14-24.
76. Mkaouar D, Mahjoubi F, Mezghani S, Znazen A, Ktari S, Hammami A. Étude de la résistance des entérobactéries aux céphalosporines de troisième génération dans les hôpitaux de Sfax, Tunisie (1999-2005). Médecine et maladies infectieuses.2008 ; 38 :293-298.
77. Okalla Ebongue C, Martial Dongmo T , Nda Mefo'o J P, Guy Pascal N, Beyiha G, Evolution de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées à l'Hôpital Général de Douala de 2005 à 2012
78. Fortune Djimabi S . Augmentation de la résistance aux antibiotiques des Entérobactéries isolées à l'Institut National d'Hygiène de Lomé de 2010 à 2017.
79. AHMANACHE S, KACI O. Etude de la résistance des bacilles à Gram négatif aux  $\beta$ -lactamines à partir de divers prélèvements pathologiques [mémoire],2019
80. Bodering A. Utilisation des antibiotiques et profil de résistance des souches de Salmonella sp. et Escherichia coli isolées des exploitations avicoles des villes de N'Djaména et Doba au Tchad. International journal of biological and chemical sciences.2017; Vol 11: P 1677
81. SAYE T. PREVALENCE DES ENTEROBACTERIES PRODUCTRICES DE BETA-LACTAMASES A SPECTRE ELARGI AU CHU DU POINT G DE 2006 A 2008.2012 ; P:37-38 .
82. Guembe M. Evolution of antimicrobial susceptibility patterns of aerobic and facultative gram-negative bacilli causing intra-abdominal infections: results from the SMART studies 2003-2007. Revista Espanolade Quimioterapia.2008 ; P 166-173.
83. Hashemi SH, Esna-Ashari F ,Tavakoli S , Mamani M . The prevalence of antibiotic Resistance of Enterobacteriaceae strains isolated in community and Hospital acquired in infections in teaching hospital of Hamadan, west of Iran. Journal of research in Health Sciences.2013 ; P 75-80.

## BIBLIOGRAPHIE

84. Jarlier V, Arnaud I, BMR-Raisin groupe de travail. Surveillance des bactéries multirésistantes dans les établissements de santé français-données 2012-. SaintMaurice Inst Veill Sanit. 2014;
85. Sekhri-Arafa N. Fréquence et marqueurs épidémiologiques de *Klebsiella pneumoniae* dans les services à haut risque infectieux au niveau du CHU Benbadis de Constantine.2011 ; 187p.
86. Moukrad N, Filali F R, Makoudi Y. Prévalence de la multirésistance bactérienne aux antibiotiques des infections urinaires dans la ville de Meknès (Maroc) et son évolution dans le temps. Sciences Lib ED. Mercenne.2012; 4(121105): p2111-4706
87. Sirot J, Chanal C, Petit A, Sirot D, Labia R, Gerbaud G. *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae producing novel plasmid-mediated beta-lactamases markedly active against third-generation cephalosporins: epidemiologic studies. Rev Infect Dis. 1988 ; 10 : 850–9
- 88 . organisation mondiale de la santé, « Résistance aux antibiotiques », 13 juillet 2020.  
<https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
89. Gélose BCP - [Internet]. microbiologiemedicale.fr. [cité 11 avr 2021]. Disponible sur:  
<https://microbiologiemedicale.fr/gelose-bcp/>
90. Gélose Hektoen - [Internet]. microbiologiemedicale.fr. [cité 12 avr 2021]. Disponible sur:  
<https://microbiologiemedicale.fr/gelose-hektoen/>
91. Gélose Salmonella Shigella (SS) - [Internet]. microbiologiemedicale.fr. [cité 12 avr 2021].  
Disponible sur: <https://microbiologiemedicale.fr/gelose-salmonella-shigella-2/>
92. Gélose Mac Conkey - [Internet]. microbiologiemedicale.fr. [cité 12 avr 2021]. Disponible sur: <https://microbiologiemedicale.fr/gelose-mac-conkey/>
93. Gélose CLED - dénombrement des germes urinaires [Internet]. microbiologiemedicale.fr. [cité 12 avr 2021]. Disponible sur: <https://microbiologiemedicale.fr/gelose-cled-denombrement-germes-urinaires/>
94. Gélose Drigalski - [Internet]. microbiologiemedicale.fr. [cité 12 avr 2021]. Disponible sur:  
<https://microbiologiemedicale.fr/gelose-drigalski/>
95. Cappuccino. microbiology Laboratory manuel 11<sup>ème</sup> édition. 2017.
96. Bustin S A. Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology.2000; 25: 169-193.

## Abstract

**Title:** Infections with enterobacteriaceae resistant to third-generation cephalosporins

**Objectives:** The aim of our work was to determine the frequency of isolation of C3G-resistant enterobacteriaceae strains as well as their sensitivity profile to other families of antibiotics and to study the evolution of their resistance over the years.

**Methods:** Retrospective study spread over a period of three years: 2019, 2020 and 2021 and a prospective study from February 8 to April 8, 2022 at the University Hospital of Tizi - Ouzou on all strains of enterobacteriaceae resistant to third-generation cephalosporins on any type of clinical specimen.

**Results:** Between 2019 and 2021, 3651 enterobacteria are identified, 29.41% of these isolates are resistant to C3G. Most of the samples are represented by urine. The highest prevalences were observed in emergency departments. The rate of resistance to C3G is higher for males (54.84%) compared to females (43.39%). (55.34%) of isolated *Klebsiella pneumoniae* are resistant to these molecules against only 19.78% of *E.coli*. 33.89% and 64% of the EB RC3G strains isolated during the retrospective and prospective study respectively are ESBL producers. The co-resistance of these strains is significant, in particular with respect to fluoroquinolones, SXT and gentamicin, with fairly low resistance to fosfomycin and total sensitivity to colistin.

**Conclusion:** The resistance rate of ERC3G in the Tizi-Ouzou University Hospital seems to be increasing, hence the need to introduce preventive measures and identify the mechanisms involved in this resistance, in order to limit the dissemination of these strains both in breast of hospital than in the community.

**Key – words:** Enterobacteriaceae, C3G resistance , retrospective study, prospective study, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, co-resistance.

## Résumé

**Titre :** Les infections à entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération.

**Objectifs:** Le but de notre travail était de déterminer la fréquence d'isolement des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G ainsi que leur profil de sensibilité aux autres familles d'antibiotiques et d'étudier l'évolution de leur résistance au fil des années.

**Méthodes:** Etude rétrospective qui s'est étalée sur une période de trois ans : 2019,2020 et 2021 et une étude prospective allant du 8 février au 8 avril 2022 au CHU de Tizi Ouzou sur toutes les souches des entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération sur tout type de prélèvement clinique.

**Résultats :** Entre 2019 et 2021, 3651 entérobactéries sont identifiées, 29.41% de ces isolats sont résistants aux C3G .l'essentiel des prélèvements est représenté par les urines. Les prévalences les plus élevées ont été observées dans les services d'urgence. Le taux de résistance aux C3G est plus important pour le sexe masculin (54.84%) comparativement au sexe féminin (43.39 %). (55.34 %) des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées sont résistantes à ces molécules contre 19.78% seulement des *E.coli*. 33.89% et 64% des souches des EB RC3G isolées durant l'étude rétrospective et prospective respectivement sont productrices de BLSE. La Co-résistance de ces souches est importante notamment vis-à-vis des fluoroquinolones, du SXT et de la gentamicine avec une résistance assez faible à la fosfomycine et sensibilité totale vis-à-vis de la colistine.

**Conclusion :** Le taux de résistance des Entérobactéries aux C3G dans le CHU de Tizi-Ouzou semble être en augmentation, d'où la nécessité d'instaurer des mesures préventives et d'identifier les mécanismes impliqués dans cette résistance, afin de limiter la dissémination de ces souches aussi bien au sein de l'hôpital que dans la communauté.

**Mots-clés :** Entérobactéries, résistance aux antibiotiques, Céphalosporines de 3ème génération, *Klebsiella pneumoniae* , *Escherichia coli* , la Co-résistance.