



Mémoire de fin d'études

Pour l'obtenir :

Le diplôme de Master Sciences et Techniques

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

**INFECTIONS RESPIRATOIRES BASSES
NOSOCOMIALE D'ORIGINE BACTERIENNE
Etude bactériologique et de sensibilité aux antibiotiques**

Présenté par :

M^{elle} DIAKHATE Absa

Encadré par :

- ✚ Dr.MAHMOUD (Laboratoire de bactériologie au CHU Hassan II Fès)**
- ✚ Pr.HAGGOUD (Faculté des Sciences et Techniques Fès)**

Soutenu le 21 Juin 2011

Devant le jury composé de :

✚ Dr.MAHMOUD	Encadrant
✚ Pr.HAGGOUD	Président du jury
✚ Pr.BEKHTI	Examineur
✚ Pr.RACHIQ	Examineur

SOMMAIRE

INTRODUCTION

RESUME

PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I- LES INFECTIONS RESPIRATOIRES

I.1- Définition et classification

I.1.1.- Les infections respiratoires aiguës hautes

I.1.2- Les infections respiratoires aiguës basses

I.1.3- Les infections respiratoires nosocomiales

I.1.4- Les infections respiratoires communautaires

II - LA BACTERIOLOGIE DES INFECTIONS RESPIRATOIRES

II.1.- Flore bactérienne des voies respiratoires

II.2.- classification suivant le type d'infection respiratoire

II. 3- caractéristiques des principaux germes responsables d'IRN

III - GENERALITE SUR LES ANTIBIOTIQUES

III.1- Définition

III.2- Classification

III.3- Mode d'action

IV – RESISTANCE BACTERIENNE

IV.1- Résistance naturelle des bactéries responsables d'IRN

IV.2- Résistance acquise

IV.3- Mécanismes biochimiques de la résistance

IV.4- Support génétique de la résistance

V. ETIOPATHOLOGIE

V.1 Origine des germes

V.2 Porte d'entrée

V.3 Facteur de risque

I- INTRODUCTION

II- ETIOPATHOGENIE

II.1- Nature des germes

II.2- Origine des germes

II.3- Porte d'entrée

II.4- Facteur de risque

III- DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

IV- ETUDE RETROSPECTIVE

IV.1 profil de sensibilité des germes années 2004-2007

IV.2 Evolution au cours des années 2004 à 2007

IV.3 Répartition des germes année 2010

IV.4 Profil de sensibilité des germes au cours de l'année 2010

DEUXIEME PARTIE : MATERIELS ET METHODES

I-MATERIEL D'ETUDE

I.1- Cadre d'étude

I.2-Prélèvements

I.3-Méthodes

I.4-Identification

I.5-Identification et antibiogramme automatique (phoenix)

I.6-Utilisation de logiciel d'identification Api web

I.7- Antibiogramme manuel

TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION

I. RESULTATS

I.1-Résultats des études rétrospectives

I.2-Partie pratique

II. DISCUSSION

III. CONCLUSION

VII-BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

Les infections respiratoires sont des affections graves et fréquentes, qui en dépit des progrès de la médecine en général, des moyens de diagnostic et de traitement en particulier et nonobstant les efforts consentis ainsi que les moyens déployés en matière de recherche allant dans ce sens, demeurent un problème sérieux de santé publique.

En effet, elles sont responsables dans le monde de 1 900 000 de décès par an et constituent en France la première maladie infectieuse, sa mortalité est la sixième cause de décès et la première cause de décès par pathologies infectieuses [1,2].

Le traitement se heurte à plusieurs difficultés parmi lesquelles on peut citer :

- _ La difficulté de réaliser un diagnostic précis avant toute prescription et ceci tend à augmenter la résistance aux antibiotiques par administration d'une molécule inadaptée.
- _ La difficulté d'une prise en charge correcte à l'hôpital à cause des infections nosocomiales surtout dans les pays en voie de développement.
- _ En Afrique, il ne faudrait pas oublier l'absence pratiquement de consensus thérapeutique si l'on sait que dans les pays développés se tiennent souvent des réunions, colloques, ateliers regroupant des experts dans tous les domaines concernés : cliniciens, biologistes, environnementalistes, statisticiens...

Parmi ces difficultés rencontrées, le diagnostic occupe une part importante.


L'incidence croissante de ces germes dans les IRB explique l'intérêt qui leur est accordé et ceci nous a poussés à entreprendre cette étude prospective.

Son principal objectif est :

- d'isoler les bactéries à partir des prélèvements reçus des services de réanimation
- d'étudier leur profil de sensibilité aux antibactériens.

Notre contribution s'articule en trois points :

- un rappel bibliographique suivi d'une étude rétrospective
- une partie méthodologique
- une discussion des résultats.



PREMIERE PARTIE :
INTRODUCTION
BIBLIOGRAPHIQUE

I- LES INFECTIONS RESPIRATOIRES

I.1- Définition

Elles se définissent comme étant l'implantation puis la multiplication d'une bactérie entraînant une infection des voies respiratoires (trachéite, bronchite) et / ou une infection du parenchyme pulmonaire (pneumonie, abcès).

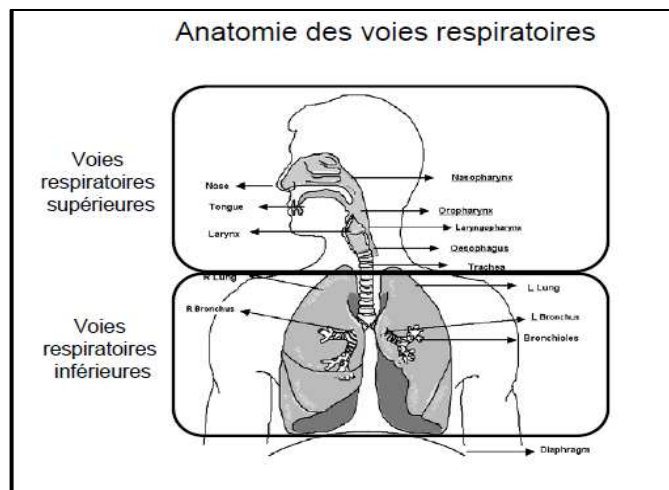


Fig.1 : anatomie des voies respiratoires

I.2.- Les infections respiratoires aiguës hautes

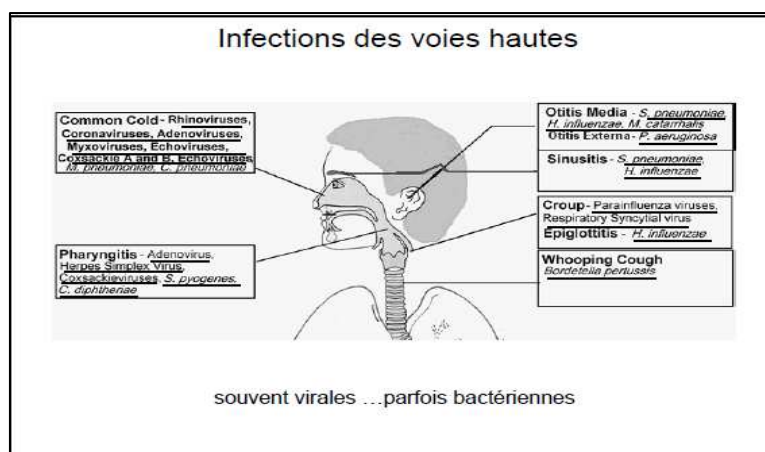


Fig.2 : les voies respiratoires hautes

Les voies respiratoires supérieures sont colonisées par une flore commensale diverse et variée. En revanche les voies respiratoires post-pharyngées ou voies respiratoires inférieures sont

normalement stériles. Les microorganismes responsables de ces infections sont soit des virus, soit des bactéries, soit des parasites ou encore des champignons opportunistes. Nous n'envisagerons ici que les bactéries.

a) Angine [3]

Ce sont des inflammations douloureuses et fébriles des formations lymphoïdes de l'oropharynx et essentiellement des amygdales palatines. Elles peuvent être en cause dans les complications infectieuses locorégionales, générales et inflammatoires à distance essentiellement pour les angines à Streptocoque β -hémolytique du groupe A. On distingue :

-Angine érythémateuse

-Angine érythémato-pultacée

- Angines avec fausses membranes

- Angines compliquées

b) Sinusite [3]

C'est l'inflammation aiguë de la muqueuse des sinus de la face, survenant habituellement dans un contexte de rhinopharyngite aiguë. On distingue :

-Le sinus éthmoïdal

- Le sinus maxillaire

Les germes responsables des sinusites sont les mêmes que ceux responsables de l'otite : Haemophilus influenzae, pneumocoque, staphylocoque.

b) Otite [3]

Il s'agit presque toujours de la surinfection bactérienne d'une infection virale dont le point de départ est le rhinopharynx. C'est surtout une pathologie pédiatrique consécutive aux très nombreuses infections rhino-pharyngées de l'enfant, beaucoup moins fréquentes à partir de 6-7 ans. On peut les observer très tôt, dès les premières semaines de la vie.

c) Laryngite et épiglottite [3]

C'est une inflammation de l'isthme laryngé qui peut siéger au niveau glottique, sous glottique et épiglottique.

I.3- Les infections respiratoires aiguës basses

Les infections respiratoires basses se définissent comme une atteinte du parenchyme respiratoire, des bronches et de la trachée artère. [4]

Les infections respiratoires basses sont des maladies très fréquentes avec une incidence annuelle de 12 % en Pédiatrie, augmentant avec l'âge et pouvant atteindre 100 % chez les personnes âgées. (10)

Elles demeurent ainsi en dépit des progrès de l'antibiothérapie, un problème de Santé Publique majeur de par la multiplication des cas et de par les échecs thérapeutiques répétés.

La prise en charge de ces infections est très difficile à cause d'une part, des nombreux facteurs de risque et d'autre part, de l'absence de corrélation entre la symptomatologie clinique et le germe en cause. [5]

a) Bronchites aiguës

Elles sont définies par une inflammation aiguë des bronches et des bronchioles. Son origine virale est très largement prédominante. *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* apparaissent comme des agents de surinfection.

b) Pneumonies

Les pneumonies sont des infections du parenchyme pulmonaire habituellement localisées à un segment ou à un lobe pulmonaire. Elles réalisent des infections potentiellement sévères relativement rares par rapport aux infections bronchiques.

Elle s'observe surtout en période automno - hivernale mais aussi au printemps. C'est la plus fréquente des I.R.A. basses : elle touche au moins 10 % des nourrissons de moins de 24 mois.

Les pneumopathies nosocomiales s'observent chez plusieurs catégories de patients, principalement les patients sous ventilation artificielle dans les unités de soins intensifs, où leur taux atteint 3 % par jour. La pneumopathie associée à la ventilation assistée possède un taux de létalité élevé, bien que le risque attribuable soit difficile à déterminer du fait de l'importance des co-morbidités. Les microorganismes colonisent l'estomac, les voies respiratoires supérieures et les bronches, et provoquent une infection pulmonaire (pneumopathie) ; ils sont souvent endogènes (appareil digestif ou rhinopharynx) mais peuvent être exogènes, souvent à partir d'un appareil respiratoire contaminé.

c) Bronchiolites

C'est une inflammation des bronchioles diagnostiquée chez les enfants de moins de deux ans et est le plus souvent due à un virus (VRS).

I.4- Les infections respiratoires nosocomiales

Une infection est dite nosocomiale si elle apparaît au cours ou à la suite d'une hospitalisation et si elle était absente à l'admission à l'hôpital. Ce critère est applicable à toute infection. Lorsque la situation précise à l'admission n'est pas connue, un délai d'au moins 48 heures après l'admission (ou un délai supérieur à la période d'incubation lorsque celle-ci est connue) est communément accepté pour distinguer une infection d'acquisition nosocomiale d'une infection communautaire.

La caractéristique principale des IN observées en réanimation est d'être directement ou indirectement associée aux techniques de suppléance invasives utilisées pour pallier une défaillance vitale, qui nécessitent le plus souvent la mise en place de dispositifs invasifs tels que cathéters, sondes...) et ont pour conséquence de court-circuiter les moyens de défense de 1ère ligne que sont la peau, les muqueuses et les sphincters.

Elle se manifeste par une apparition ou persistance d'un infiltrat à la radiographie thoracique sans autre causes, associé à deux critères cliniques chez patient ventilé >48h: Température > 38°, hyperleucocytose > 11000/mm³ ou neutropénie < 3500/mm³, sécrétions endotrachéales purulentes.

I.5- Les infections respiratoires communautaires

La pneumopathie aiguë communautaire (PAC) se définit comme une infection aiguë du parenchyme pulmonaire acquise en « ville », par opposition aux pneumopathies nosocomiales acquises à l'hôpital ou en milieu institutionnalisé. Elle se traduit sur le plan clinique par l'association au minimum d'une fièvre, de symptômes respiratoires (toux, dyspnée, expectoration) et d'une opacité radiologique compatible d'apparition récente.

Le caractère communautaire est évoqué devant l'absence d'hospitalisation au minimum dans les sept jours précédents le début de la pneumopathie et la constitution d'un foyer radiologique avant ou dans les deux jours suivants l'admission.

Dans le contexte particulier de l'anesthésie-réanimation, la distinction entre pneumopathie communautaire et nosocomiale est plus difficile. Si l'on considère que le germe est présent à l'admission et qu'au décours d'une intervention chirurgicale, d'un polytraumatisme ou d'une perte de connaissance le patient développe une pneumopathie précoce (< 72 heures), celle-ci doit être considérée comme communautaire.

C'est une affection potentiellement grave dont la mortalité peut être expliquée par :

- Le retard au diagnostic et à la mise en route du traitement.
- La gravité immédiate de l'infection
- La présence de facteurs de risque
- L'agent pathogène incriminé (pneumocoque).

Epidémiologie microbienne des pneumonies communautaires : Agents infectieux en cause :

- Streptococcus pneumoniae : germe le plus fréquent
- Haemophilus influenzae : place imprécise, mais fiable.
- Mycoplasma pneumoniae : adultes jeunes, contexte épidémique
- Chlamydia pneumoniae, Legionella pneumophila: incidence < 5%
- Staphylococcus aureus et entérobactéries : personnes âgées de plus de 75 ans, institutionnalisées et/ou atteintes d'affections chroniques débilantes : 10 à 20% des cas.

Les anaérobies : sont à considérer chaque fois qu'on suspecte une pneumonie de déglutition.

II- LA BACTERIOLOGIE DES IRN

II.1- Flore bactérienne des voies respiratoires

Les voies respiratoires au-delà du pharynx sont stériles, les bactéries sont chassées ou neutralisées par les sécrétions des glandes bronchiques et par le mouvement de la membrane qui tapisse les bronches. Les infections des bronches peuvent être le résultat d'une infection descendante, c'est-à-dire les bactéries du pharynx ou du nez descendent vers les bronches deviennent pathogènes capables de produire une bronchite (inflammation des bronches) ou une pneumonie (inflammation des poumons). Les bactéries sont au premier plan avec *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* et *Legionella pneumophila*.

I.2- Classification des bactéries suivant le type d'infection respiratoire

	Pneumonies communautaires
Fréquents	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i> <i>Legionella pneumoniae</i> Virus grippal
Rare	Entérobactéries Germes rares

Tableau 1 : classification des bactéries responsables de pneumonies communautaires

	Pneumonies nosocomiales
Fréquents	Staphylococcus aureus Pseudomonas aeruginosa Acinetobacter baumannii Entérobactéries
Rare	Streptococcus pneumonies Haemophilus influenzae champignons Germe rares

Tableau 2 : classification des bactéries responsables de pneumonies nosocomiales

I.3- Caractéristiques des principaux germes responsables d'IRN

I.3.1- Les entérobactéries

➤ Définition [7, 8, 9,10]

La famille des entérobactéries comprend plusieurs genres bactériens. Ce sont des bacilles à Gram négatif, immobiles ou mobiles grâce à une ciliature péritriche. Ils sont aéro-anaérobies facultatifs et se développent sur milieu ordinaire. Ils sont dépourvus d'oxydase et ont la faculté de fermenter le glucose, mais aussi de réduire les nitrates en nitrites.

Les différences entre les nombreux genres et espèces viennent de critères plus précis, comme la fermentation des différents sucres, la production ou non de sulfure, la présence ou l'absence d'enzymes du métabolisme (désaminases, décarboxylases).

➤ Habitat [11,12]

Les Entérobactéries sont des hôtes du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux où ils sont retrouvés soit à l'état de pathogène, soit à l'état de commensaux. Mais cette localisation digestive n'est pas exclusive.

On les retrouve également dans l'environnement (sols, eau) où ils participent à la dégradation des matières organiques, à l'altération des plantes suite à des nécroses, à une dégénérescence ou à un ramollissement.

➤ Classification

La famille des Enterobacteriaceae comprend actuellement 100 espèces répertoriées. Les espèces les plus communément isolées en bactériologie clinique appartiennent à 12 genres : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia*.

I.3.1.1- Caractères bactériologiques des entérobactéries

➤ Caractères morphologiques [13, 14 ; 15, 16, 17]

Toutes les entérobactéries ont une morphologie habituellement typique, sous forme de bacilles à gram négatif de 2 à 3 μ de long sur 0,6 μ de large généralement polymorphes. Les espèces les plus nombreuses le sont grâce à une ciliature péritriche. Les autres sont immobiles (*Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia pestis*). La présence d'une capsule visible au microscope est habituelle chez *Klebsiella*. La plupart des espèces pathogènes chez l'homme possèdent des pili (ou fimbriae) qui constituent des facteurs d'adhésion.

➤ Caractères cultureux [13, 18, 19, 20]

Les entérobactéries aérobie-anaérobies facultatives se développent facilement sur milieux nutritifs simples. Sur milieux gélosés, les colonies d'entérobactéries sont habituellement lisses, brillantes, de structure homogène (type « smooth » ou S). Cet aspect peut évoluer après cultures successives vers des colonies à surface sèche et rugueuse (type « rough » ou R). Les colonies de bactéries capsulées telles que *Klebsiella* sont mucoïdes, plus grandes que les colonies S, avec une tendance à la confluence.

➤ Caractères biochimiques [21]

Le diagnostic de genre et d'espèce repose sur l'étude des caractères biochimiques, après que le diagnostic de famille ait été établi avec certitude.

Production d'Hydrogène sulfuré (H₂S)

La production de SH₂ par les microorganismes est mise en évidence par incorporation du fer ou de plomb dans le milieu destiné à cette étude. Il se forme un **précipité noir** de sulfure de fer ou de plomb. Ce soufre réduit va se combiner avec le fer ferreux Fe²⁺ qui vient du sulfate de fer.

Recherche de l'uréase

Les bactéries possédant une uréase active scinde l'urée en dioxyde de carbone et en ammoniac. Ceux-ci en se combinant donnent du carbonate d'ammonium.

Le carbonate d'ammonium formé alcalinise le milieu, ce qui se traduit par le **virage de l'indicateur coloré de l'orange au rose framboise** ou dans de rares cas au rouge violacé.

Production d'indole

Certaines bactéries dégradent le tryptophane grâce à une tryptophanase. Il se forme de l'indole, de l'acide pyruvique et de l'ammoniac.

L'indole est apolaire et réagit fortement avec le paradiméthylaminobenzaldéhyde en milieu acide pour donner un **anneau rouge** qui remonte en surface.

Recherche des décarboxylases

Les décarboxylases (LDC, ODC, ADH) scindent les acides aminés, entraînant la formation de l'amine correspondante et la libération de CO₂.

Il s'agit d'enzymes induites dont la synthèse est favorisée par un pH acide (pH optimum : 3,5 à 5,5) et des conditions d'anaérobiose.

Le milieu d'étude contient du glucose, un indicateur coloré (le rouge phénol) et bien entendu un acide aminé.

Chez les bactéries à métabolisme, la fermentation du glucose entraîne une baisse de pH suffisante pour favoriser la synthèse de l'enzyme ; l'alcalinité due à l'amine entraîne ensuite le virage de l'indicateur au violet après une courte phase de jaunissement.

Si la bactérie étudiée ne possède pas de décarboxylases, le milieu restera acide, donc jaune.

Recherche des désaminases oxydatives

Les désaminases, enzymes induites, agissent sur les acides aminés en entraînant la formation des acides cétoniques correspondants.

Les acides cétoniques formés ont la propriété de donner des complexes colorés avec les ions Fe³⁺, réaction utilisée pour la lecture.

Utilisation du Citrate de Simmons (CS)

L'utilisation du citrate, comme seule source de carbone par les bactéries, se traduit par une alcalinisation du milieu (virage au bleu).

Utilisation du malonate

Le malonate inhibe le cycle de Krebs (inhibition de la succinate déshydrogénase).

Seules les bactéries qui peuvent utiliser le cycle glyoxalique sont capables de pousser sur un milieu au malonate. L'utilisation du malonate s'accompagne d'une libération d'ions OH⁻ alcalinisant

Action de la Phényl Alanine Désaminase (PDA)

La PDA, enzyme induite, agit sur la phényl alanine en entraînant la formation d'acide cétonique correspondant.

L'acide cétonique formé a la propriété de donner des complexes colorés avec les ions Fe³⁺ donnant une coloration bleue.

Milieu au Citrate de Christensen (CC)

A la différence du Citrate de Simmons, ce milieu contient une faible quantité de glucose, d'extrait de levure et une source d'azote organique.

Dans ces conditions, certaines bactéries citrate négatif sur milieu de Simmons sont capables d'utiliser le citrate en milieu de Christensen.

La formation d'ions hydroxydes alcalinise le milieu (virage du jaune au rose).

Recherche de l'acétoïne ou Réaction de Voges-Proskauer (VP)

On étudie la formation de l'acétyl méthyl carbinol (A.M.C. ou acétoïne) soit à partir de deux molécules d'acide pyruvique, soit à partir du glucose.

En présence d'une base forte, l'acétoïne donne une coloration rouge en milieu très oxygéné (oxydation en diacétal).

Test à l'ONPG (Orthonitrophényl b-D-Galactopyranoside)

Le terme ONPG hydrolase est plus à propos que celui de b-galactosidase dans la mesure où il précise que le substrat utilisé est l'ONPG et non le lactose.

En effet, il existe des germes qui reconnaissent l'ONPG du côté du nitro- 2-phénol et non de celui du b-galactoside. Ces germes ont donc une activité ONPG hydrolase tout en ne fermentant pas les lactoses.

Le test à l'ONPG est une technique basée sur l'action directe de l'enzyme sur une molécule chromogène pouvant être l'ortho-nitrophényl-b-Dgalactopyranoside ou le 2-naphtol-b-D-galactopyranoside. Ceux-ci sont utilisés comme substrats et libèrent respectivement l'orthonitrophénol (jaune) et le b-naphtol.

a) E.COLI

Hôte normal de l'intestin et des animaux, c'est l'espèce aérobie la plus représentée dans le tube digestif. La présence de colibacilles ou espèces voisines dans l'eau est un témoin de contamination fécale [23, 24] Escherichia coli exprime les caractères généraux des entérobactéries. Il est en outre :

lactose	Indole	Citrate	Acétoïne	H ₂ S	Gaz	Uréase
+	+	-	-	-	+	-

TESTS	ADH	ONPG	CC	CS	GEL	H ₂ S	IND	MAL	PDA	LDC	ODC	TDA	URE	NIT	GLU	LAC	VP	ESC
RESULTATS	(+/-)	(+)	(+)	-	-	(+)	(+)	-	+/-	(+)	(+)	(+)	+/-	-	(+)	(+)	-	-

Tableau 3 : Caractères biochimiques de *E. coli* [28, 29,30, 31]

b) KLEBSIELLA [25, 26, 27]

Au sein des entérobactéries, les bactéries du genre *Klebsiella* se distinguent par leur immobilité constante, leur groupement en diplobacilles généralement encapsulés. On distingue cependant plusieurs espèces mais *Klebsiella pneumoniae* est la plus fréquemment retrouvée en clinique humaine.

❖ *Klebsiella pneumoniae*

Connue autrefois sous le nom de pneumobacille de Friedlander, *Klebsiella pneumoniae* est une bactérie commensale de l'intestin, des voies respiratoires et des animaux. Chez l'homme, elle est l'agent responsable des pneumopathies aiguës, d'angines, d'otites, de cystites et d'affections rénales. Ce sont des bactéries Gram négatif immobiles capsulées, surtout au sortir de l'organisme, très polymorphes. Sur gélose : les colonies de type mucoïde ont un aspect caractéristique ; elles sont volumineuses (4 mm de diamètre), bombées, brillantes, opaques et souvent confluentes. En bouillon, on note la formation d'un trouble dense avec colorette visqueuse.

Klebsiella pneumoniae est en général :

lactose	Indole	ONPG	VP	ODC	Gaz	Urée
+	-	+	+	-	+++	+

TESTS	ADH	ONPG	CC	CS	GEL	H ₂ S	IND	MAL	PDA	LDC	ODC	TDA	URE	NIT	GLU	LAC	VP	ESC
RESULTATS	-	(+)	(+)	(+)	-	+	(+)	+/-	+/-	(+)	-		(+)	-	(+)	(+)	(+)	(+)

Tableau 4 : Caractères biochimiques de *K. pneumoniae* [28, 29,30, 31].

I.3.2- Les BGN non fermentaires

Ce sont des bacilles à gram négatif qui contrairement aux entérobactéries ne fermentent pas les sucres. Ces bactéries aérobies strictes sont le plus souvent oxydase positive et de culture très facile sur les milieux usuels. Elles sont soit mobiles soit immobiles par une ciliature polaire.

a) *ACINETOBACTER* [32, 33]

➤ Classification

Dès 1940, AUDUREAU avait noté la ressemblance entre *B. anitratum* et les *Moraxella*. En décrivant *M. glucidolytica*, PIECHAUD proposa de scinder les *Moraxella* en deux groupes

- *Moraxella* du groupe I : avec une oxydase
- *Moraxella* du groupe II : sans oxydase

Le sous-comité a proposé de séparer définitivement *Acinetobacter* de *Moraxella*. Ainsi *Acinetobacter* correspond aux *Moraxella* du groupe II de PIECHAUD. Les *Moraxella* constituent désormais le genre III de la famille des *Neisseriaceae*. Les *Acinetobacter*, proposés initialement en appendice de cette famille, en constituent maintenant le genre IV.

➤ Caractères bactériologiques

Les caractères morphologiques

Les espèces du genre *Acinetobacter* se présente sous forme de bacilles de longueur variable de 1µm (formes coccoïdes) à 3µm ou 5µm (en moyenne) jusqu'à des formes filamenteuses de plusieurs dizaines de µm. Leur diamètre est légèrement supérieur à 1µm. *Acinetobacter* est à Gram négatif. Cette bactérie ne possède pas de flagelle elle est immobile.

Les caractères culturels

Acinetobacter est aérobie strict. Il se développe facilement sur milieux nutritifs simples. En milieu liquide, le trouble est homogène, avec parfois une légère collerette en surface (souches muqueuses). Sur gélose nutritive, les colonies en 24h ont un diamètre de 2 à 3mm ; elles sont convexes, luisantes et blanchâtres. Sur gélose au sang les colonies sont plus volumineuses. Quelques souches se développent sans difficulté sur certains milieux sélectifs destinés à l'isolement des entérobactéries.

La température optimale de pousse est inférieure à 37°C. *Acinetobacter* n'est pas pigmenté et n'élabore pas de toxine.

Les caractères biochimiques

Dans une batterie d'épreuves d'identification pour bacilles à Gram négatif, *Acinetobacter* montre beaucoup de réactions constamment négatives :

Indole	Nitrate-réductase	H ₂ S	VP	RM
-	-	-	-	-

TESTS	ADH	ONPG	CC	CS	GEL	H ₂ S	IND	MAL	PDA	LDC	ODC	URE	VP	ESC
RESULTATS	-	-	(+)	(+)	-	-	(+)	+/-	+/-	-	-	(+)	-	-

Tableau 5 : caractères biochimiques d'*Acinetobacter*

b) PSEUDOMONAS AERUGINOSA : Caractères bactériologiques

Caractères morphologiques et culturaux

Bacille long et fin de 1-3 μ de long sur 0,5-1 μ de large. *Pseudomonas aeruginosa* est anciennement appelé bacille pyocyanique du fait de sa capacité à donner un pus de couleur bleu-vert. Il est mobile de type polaire avec un seul cil (monotriche) [34, 35].

C'est une bactérie non exigeante qui en culture sur milieu gélosé élabore des pigments notamment :

- la pyocyanique (de couleur bleu -vert) pathognomonique ;
- des pigments jaune pâle ou jaune orangé non spécifiques [36].

Caractères biochimiques

Pseudomonas aeruginosa est un germe catalase négative mais oxydase positive.

TESTS	ADH	ONPG	CC	CS	GEL	H ₂ S	IND	MAL	PDA	LDC	ODC	URE	NIT	GLU	LAC	VP	ESC
RESULTATS	(+)	-	(+)	(+)	(+)	-	-	-	+/-	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-

Tableau 6 : Caractères biochimiques de *P.aeruginosa*

I.3.3- Non entérobactéries

a) HAEMOPHILUS INFLUENZAE

➤ taxonomie

Le genre *Haemophilus* est placé dans la famille des Pasteurelloce avec les genres *Pasteurella* et *Actinobacillus*. *Haemophilus influenzae* est l'espèce type du genre qui contient seize espèces d'origine animale et humaine [37].

Les espèces exigeant les facteurs X et V (x=hémine v= NAD)

- _ *Haemophilus influenzae*,
- _ *Haemophilus aegyptius*,
- _ *Haemophilus haemolyticus*.

Caractéristiques morphologiques

Dans un produit pathologique ou dans une culture, *H.influenzae* apparaît sous la forme d'un BGN, immobile, non sporulé, de petite taille (0,5 à 2,4µ sur 0,2µ), polymorphe, souvent coccobacillaire, parfois filamenteux. Le polymorphisme s'accroît dans une culture âgée. Certaines cultures peuvent présenter des capsules.

Caractères culturels

Haemophilus influenzae ne peut pousser que sur des milieux de culture enrichis en sang, lequel apporte les deux facteurs que sont l'hémine (ou facteur X) et le NAD (nicotinamide adénine dinucléotide ou facteur V). Cette double exigence permet de le distinguer d'autres espèces et notamment *Haemophilus parainfluenzae* qui ne nécessite que du NAD.

Pendant que le sang frais contient également des inhibiteurs du facteur V, il est nécessaire d'utiliser des milieux d'isolement au sang cuit (15 min à 75-80°C). À l'inverse, un chauffage excessif détruit le NAD. Il est donc important de s'assurer de la qualité des milieux de cultures pour *Haemophilus*.

En anaérobiose, la croissance d'*H.influenzae* n'est pas dépendante de l'Hémine, ce qui peut être source de difficultés d'identification. L'exigence en NAD, peut être recherchée sur des milieux additionnés de NAD purifié, ou par la mise en évidence d'un satellitisme d'*H. influenzae* autour des colonies de *Staphylococcus aureus* (qui produisent du NAD).

Après 24 h de culture à 37°C sur gélose-chocolat, *H. influenzae* donne des colonies « smooth », convexes, grisâtres, translucides, de 0.5 à 1 mm. Les souches encapsulées donnent des colonies mucoïdes de plus grosse taille, iridescentes et transilluminantes obliques. Certaines espèces nécessitent pour leur croissance une atmosphère enrichie en CO₂.

Caractères biochimiques

Huit biotypes (I à VIII) ont été définis pour l'espèce *H. influenzae* à partir des caractères métaboliques suivants : production d'indole, activités enzymatiques uréase et ornithine décarboxylase [38]. Le biotype I est plus fréquemment retrouvé dans les méningites et le biotype IV dans les infections génitales [39].

Haemophilus influenzae possède une oxydase, une nitrate réductase, une uréase et produit de l'indole.

En effet, huit biotypes ont été définis pour l'espèce, à partir des caractères métaboliques suivants : production d'indole, activités enzymatiques (uréase et ornithine décarboxylase). Le biotypage se fait à l'aide de milieux usuels supplémentés ou demicrométhode (API – NH) avec un inoculum lourd. Le biotype II d'*Haemophilus influenzae* est le plus souvent impliqué dans l'étiologie des infections broncho-pulmonaires et les otites.

Test	Résultats
Synthèses porphirines	-
Exigences en facteur V	+
Hémolyse	-
D-glucose	+
D-fructose	-
d-xylose	+
d-ribose	+
d-mannose	-
d-galactose	+
Maltose	+
Mélibiose	-
Tréhalose	-
Raffinose	-
SH ₂	-
Hémagglutination	-
Besoin CO ₂	-
Phosphatase alcaline	+
Saccharose	-
Lactose	-

Tableau 7: Caractères biochimiques de *H.influenzae*

I.3.4- Les cocci gram positif

Les cocci Gram positif occupent en pathologie humaine une place importante par leur nombre et la gravité des infections qu'ils provoquent. Ce sont des espèces bactériennes constituées par des cellules de forme arrondie (cocci ou coques) immobiles, à Gram positif, aérobie anaérobie facultative, dont l'importance médicale est très grande.

Nous distinguons :

- Les Staphylocoques appartenant au genre *Staphylococcus*
- Les Streptocoques appartenant au genre *Streptococcus*
- Les Entérocoques

a) STAPHYLOCOQUE

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif, immobiles, asporulés et habituellement non capsulés. La plupart des espèces sont aéro-anaérobies facultatives, à catalase positive, à l'exception de *S.saccharolyticus* et *S. aureus* subsp.anaerobius. Ce sont des germes.

Caractères bactériologiques de *Staphylococcus aureus*

Caractères morphologiques

S. aureus se présente sous l'aspect de cocci en petit amas, en diplocoques ou en très courtes chaînettes (3 à 5 éléments), mesurant 0,8 à 1µm, positivement colorés au Gram. Sur les cultures en milieu solide il se dispose en grappe de raisin, alors qu'en milieu liquide il est isolé en diplocoques. Il est immobile, non sporulé et ne possède pas de capsule visible au microscope optique sauf de très rares souches (souches Smith) [40]

Caractères cultureux

Staphylococcus aureus est un germe aérobi-anaérobie facultatif. Il croît abondamment sur milieu gélosé (colonies de 1 à 2 mm de diamètre) ; certaines souches produisent un pigment jaune orangé, mais cette production est irrégulière [41], car certaines donnent des colonies blanches ; le caractère pigmentaire n'est pas propre à l'espèce.

La culture est obtenue en 18 à 24 heures à 37° C (culture possible entre 10 et 45° C) sur milieux ordinaires. *S. aureus* pousse en présence de fortes concentrations salines (milieu sélectif de Chapman à 75% de NaCl). Le pH optimal est de 7,0 à 7,5. Certains facteurs de croissance sont indispensables (vitamine B1, acide nicotinique) [41]

En bouillon ordinaire, la culture est rapide et les staphylocoques se multiplient en quelques heures, formant un trouble homogène ou un dépôt. Il n'y a pas de production de pigment en milieu liquide.

Sur gélose ordinaire, les colonies sont lisses, rondes, bombées et leur diamètre est de 1mm. A +4° C, les staphylocoques conservent leur vitalité pendant 3 mois dans le pus, pendant 1 an sur gélose, ils sont détruits à 58° C au bout de 60mn. Leur croissance est inhibée par les androgènes et la progestérone. *Staphylococcus aureus* possède un équipement enzymatique permettant de métaboliser de nombreux substrats (glucides, lipides, protides). [42]

Il existe des colonies naines de *S. aureus* provenant de milieux contenant certains sels minéraux (chlorure de lithium ou de baryum), certains colorants (violet de gentiane, acrydine orange), certains antibiotiques (mécilline, aminoside) ou provenant de prélèvements de patients mis sous antibiotiques. Ces souches retrouvent généralement leurs caractères cultureux normaux après une ou deux subcultures. [43]

Caractères biochimiques

	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Coagulase	+	-	-
Acidification aérobie du mannitol	+	d	d
Acidification anaérobie du mannitol	+	-	-
Production d'α - toxine	+	-	-
Nucléase thermostable	+	-	-
Exigence en biotine	-	+	NT
Acide ribitol teichoïque pariétal	+	-	+
Acide glycérol teichoïque pariétal	-	+	+
Protéine A pariétale	+	-	-
Sensibilité à la novobiocine	S	S	R

Tableau 8 : Classification des staphylocoques d'après Baird Parker

b) STREPTOCOQUE

Les infections streptococciques, si diverses dans leurs manifestations cliniques, sont parmi les plus fréquentes et les plus sévères des infections bactériennes. En effet, la plupart des streptocoques (streptocoques oraux, streptocoques des groupes B, C, D, G, L, *Streptococcus pneumoniae*) sont des commensaux habituels des cavités naturelles et des téguments, et peuvent dans certaines circonstances particulières, devenir pathogènes pour l'homme.

C'est ainsi que *Streptococcus pneumoniae*, commensal des voies respiratoires supérieures, est incriminé dans des infections très sévères décrites à tous les âges, avec une extrême gravité jusqu'à deux ans et après soixante ans, en dépit des moyens thérapeutiques efficaces disponibles actuellement [44].

➤ Streptocoque pneumoniae

Caractères morphologiques

A l'examen microscopique, le pneumocoque présente un aspect de diplocoque en flamme de bougie, en "8" ou en courtes chaînettes, Gram positif. Les formes virulentes sont capsulées.

Cependant, l'aspect n'est pas toujours évocateur. Par exemple, si l'environnement est carencé en magnésium ou en présence d'anticorps dirigés contre le sérotype capsulaire, on peut observer des chaînettes relativement longues.

Dans certains cas, si le malade est sous traitement, les pneumocoques peuvent prendre un aspect pseudo-bacillaire. Dans certains produits pathologiques fibrineux et dans les cultures anciennes, le pneumocoque prend mal le Gram et peut apparaître Gram négatif. La capsule est généralement visible dans les produits pathologiques, mais elle est parfois plus discrète, et particulièrement belle après inoculation à l'animal sensible (souris).

Caractères cultureux

❖ Milieux de culture

On utilise des milieux nutritifs riches comme par exemple la gélose au sang de mouton ou de cheval à 5%. L'addition de gentamicine à la concentration de 6 µg/ml rend le milieu sélectif au pneumocoque [45].

❖ Conditions de culture

La culture du pneumocoque peut être réalisée à une température comprise entre 25 et 42°C et à des pH situés entre 6,5 et 8,3. En routine, on cultive le germe en 24 à 48 heures, entre 35 et 37°C. Le pH optimal est de 7,8. Ce germe nécessite des conditions d'anaérobiose ou tout au moins une atmosphère enrichie en CO₂ à 5%.

❖ Aspect macroscopique des colonies

Les pneumocoques se présentent sous forme de petites colonies transparentes, rondes, de 0,5 à 1,5mm de diamètre. Ils développent une **hémolyse** de type **alpha** avec un verdissement du milieu, comme les streptocoques *viridans*.

Les pneumocoques en culture sont sujets à une autolyse spontanée ; une ombilication au centre de la colonie correspond à un début d'autolyse. Les colonies ont un aspect muqueux lorsque la capsule est de grande taille. Des colonies rugueuses, d'aspect ridé, sont rarement observées ; elles sont formées par des souches non capsulées.

Caractères biochimiques

Le pneumocoque ne possède ni catalase, ni peroxydase, ce qui induit l'accumulation de l'eau oxygénée responsable en partie de son autolyse. La mise en évidence d'activités enzymatiques, de la fermentation de sucres et de la croissance en milieu hostile, à l'aide de micro méthodes, permet l'identification de *Streptococcus pneumoniae* et le diagnostic différentiel avec d'autres espèces de streptocoques. Les caractères biochimiques de *Streptococcus pneumoniae* sont présentés dans le tableau ci dessous.

Test	VP	ESC	ADH	BHS	ARA	MAN	SOR	TRE	RAF	SOS	INU	LAC	RIB	AMI	GLY
Résultat	-	-	d	-	-	-	-	+	+	d	d	+	-	-	d

Tableau 9 : Caractères biochimiques de *Streptococcus pneumoniae*

VP : réaction de Voges-Prokauer

ADH : Arginine dihydrolase

RAF : Raffinose

SOS : Sorbose

ESC : esculine

ARA : L-Arabinose

BHS : bouillon hypersalé

MAN: Mannitol

SOR: Sorbitol

TRE : Tréhalose

(-) = Caractère négatif (0 – 25 % des souches)

(+) = Caractère positif (71 – 90 % des souches)

(d) = Caractère variable (26 – 70 % des souches).

INU : Inuline

LAC : Lactose

RIB : Ribose

AMI: Amidon

GLY: Glycérol

III - GENERALITE SUR LES ANTIBIOTIQUES

III.1- Définition

Le terme antibiotique signifie toute substance d'origine naturelle ou synthétique ayant une toxicité sélective envers le ou les micro-organismes visés et au contraire une toxicité suffisamment faible vis à vis de l'hôte humain, animal ou végétal pour qui son administration puisse être réalisée par voie générale.

Les antibiotiques sont caractérisés par :

- Une activité antibiotique ou antifongique
- Une toxicité sélective grâce à un mécanisme d'action spécifique
- Une activité en milieu organique dans le sang et les tissus.
- Une bonne absorption et une bonne diffusion dans l'organisme

III.2- Classification générale

Les antibiotiques sont classés sous plusieurs familles et suivant leur cible ou mode d'action.

III.2.1- Action sur la paroi bactérienne

1) **BETALACTAMINES**

a) **LES PENAMS (PENICILLINES)**

A-1- PENICILLINES G

Penicilline (nom commercial: Penicilline, Extencilline)

Spectre: cocci gram + et -, bacilles gram positif

A-2- PENEICILLINES A

Ampicilline (nom commercial: Totapen)

Amoxicilline (nom commercial: Clamoxyll, Hiconcil)

Ac.clavulanique+Amoxicilline (nom commercial: Augmantin)

Spectre : élargi à certains BGN, inactivées par les pénicillinases y compris celle des staphylocoques. Inactives sur le groupe KES et *Pseudomonas aeruginosa*.

A-3- PENICILLINES M

Oxacilline (nom commercial: Staphymicine, Bristopen)

Méticilline (nom commercial: Flabelline, Pénistaph)

Flulcoxacilline (nom commercial: Floxapen)

Spectre : même spectre, moins actifs, ces produits ne sont pas inactivés par les pénicillinases des *staphylocoques*. D'où leur indication dans les infections à *staphylocoques* producteurs de pénicillinase.

A-4- AMINOPENICILLINES

Mecillinam (nom commercial: Selexid)

Spectre: limité aux BGN (Entérobactéries).

A-5- CARBOXYPENICILLINES

Ticarcilline

Ticarcilline/Ac.clavulanique

Spectre:

A-6- UREIDOPENICILLINES

Piperacilline

Piperacilline/Tazobactam

Spectre: élargi à certains BGN, inactivés par les pénicillinases et celle des *staphylocoques*, actives sur les *Pseudomonas aeruginosa* et sur certaines souches productrices de céphalosporinases (en particulier *Proteus*).

A-7- PENAMS INHIBITEURS DES BETALACTAMASES

- Activité antibactérienne faible
- Inhibe la majorité des pénicillinases (et les betalactamines à spectre élargi)
- N'inhibe par contre qu'un faible nombre de céphalosporinases

Oxapénam : Ac.clavulanique

- Associé à l'**Amoxicilline** : Augmentin
- Associé à la **Ticarcilline** : Clavalin

Penicilline-Sulfones

Sulbactam : Bétamase, associé à l'Amoxicilline : Unacim

Tazobactam : associé à la Piperacilline : Tazocilline

b) MONOBACTAM

B-1- AZTREONAM (nom commercial: Azactam)

Spectre : active uniquement sur les BGN, y compris sur *Pseudomonas aeruginosa*

c) CARBAPENEMES LES PENEMS

C-1- IMIPENEME (nom commercial: Tiénam)

C-2- ERTAPENEME (nom commercial: Invanz)

Spectre: large, grande stabilité vis-à-vis de divers bêtalactamases

d) CEPHALOSPORINES LES CEPHEMS

Ce sont tous des produits à spectre large, mais dont l'intérêt réside surtout dans leur activité sur les BGN. Les céphalosporines sont classées en trois catégories, selon l'histoire (trois générations), leur spectre et surtout leur comportement vis-à-vis des céphalosporinases.

D-1- CEPHALOSPORINE DE 1^{ère} GENERATION (C1G)

Spectre: relativement résistantes aux pénicillinases, détruites par les céphalosporinases.

Inactive sur le *Pseudomonas aeruginosa*.

CEFACLOR (nom commercial: Alfatil)

CEFALEXINE (nom commercial: Céporéxine, Kéforal)

CEFALOTINE (nom commercial: Kéflin)

CEFAZOLINE (nom commercial: Céfacidal, Kefzol)

CEFATRIZINE (nom commercial: Céfapéros)

D-2- CEPHALOSPORINE DE 2^{ème} GENERATION (C2G)

Spectre: relative résistance à certaines céphalosporinases, léger gain d'activité sur les souches sensibles. Inactive sur *Pseudomonas aeruginosa*.

CEFUROXIME (nom commercial: Zinacef)

CEFOXITINE (nom commercial: Méfoxin)

CEFOTIAM (nom commercial: Pansporine)

CEFOTETAN (nom commercial: Apacef)

D-3- CEPHALOSPORINE DE 3^{ème} GENERATION (C3G)

Spectre : accentuent les avantages des précédentes : résistance accrue à l'inactivation par les céphalosporinases, gain d'activité sur les souches sensibles. Certaines sont actives sur *Pseudomonas aeruginosa*.

CEFIXIME (nom commercial: Oroken)

CEFOTAXIME (nom commercial: Claforan)

CEFTRIAXONE (nom commercial: Rocephine)

CEFPODOXINE (nom commercial: Céfodox)

CEFTAZIDIME (nom commercial: Fortum)

2) GLYCOPEPTIDES (Polypeptides)

Spectre : étroit, les bactéries gram+ et principalement *Staphylocoques* et *enterocoques*.

VANCOMYCINE (nom commercial: Vancocine)

TEICoplanine (nom commercial: Targocid)

3) FOSFOMYCINE (nom commercial: Fosfocine)

Spectre : large, cocci gram+ et -, bacilles gram+ et -. Elle est toujours utilisée en association pour éviter l'apparition de mutants.

III.2.2- Action sur la membrane

1) POLYMYCINES

Ce sont des antibiotiques de nature polypeptidiques.

Spectre : actif sur les BGN : **COLISTINE** (nom commercial: Colimycine)

a) GRAMICIDES ET TYROCIDINE

Spectre : étroit, BGP : **BACITRACINE, TYROTHRINE**

III.2.3- Action sur le Ribosome (synthèse des protéines)

1) AMINOSIDES (sous unité 30S du ribosome)

Spectre : large, cocci et bacilles gram+ (sauf les streptocoques), cocci et bacilles gram -, mycobactéries.

AMIKACINE (nom commercial: Amiklin)

GENTAMICINE (nom commercial: Gentaline, Gentamen)

GENTAMICINE 500 (nom commercial: Gentaline)

KANAMYCINE (nom commercial: Kanamycine, Kamycine)

NETILMICINE (nom commercial: Nétromicine)

SPECTINOMYCINE (nom commercial: Trobicine)

STREPTOMYCINE (nom commercial: Streptomycine)

TROBRAMYCINE (nom commercial: Nebcine)

1) PHENICOLES (sous unité 50S)

Spectre : large y compris rickettsies et chlamydiae.

CHLORAMPHENICOL (nom commercial: Tifomycine, Solnicol)

THIAMPHENICOL (nom commercial: Thiobactin)

2) TETRACYCLINES (sous unité 30S du ribosome)

Spectre : large mais résistances fréquentes. Active sur les germes à développement intracellulaire y compris rickettsies et chlamydiae et mycoplasmes.

DOXYCYCLINE (nom commercial: Vibramycine)

MINOCYCLINE (nom commercial: Mynocine)

OXYTETRACYCLINE (nom commercial: Terramycine)

TETRACYCLINE (nom commercial: Hexacycline, Tétracycline)

3) MACROLIDES ET APPARENTES (sous unité 50S du ribosome) (Groupes « M, L, S »)

Spectre : assez comparable à celui de la Penicilline G : cocci gram+ et -, bacilles gram+.
Totalement inactifs sur les entérobactéries et sur *Pseudomonas aeruginosa*.

ERYTHROMYCINE (nom commercial: Erythrocline) groupe **M** (Macrolides)

LINCOMYCINE (nom commercial: Linocine) groupe **L** (Lincosanides)

PRISTINAMYCINE (nom commercial: Pyostatine) groupe **S** (Synergistines)

SPIRAMYCINE (nom commercial: Rovamycine) groupe **M** (Macrolides)

JOSAMYCINE (nom commercial: Josacine) groupe **M** (Macrolides)

4) ACIDE FUSIDIQUE (sous unité 50S)

ACIDE FUSIDIQUE (nom commercial: Fucidine, Fucithalmic)

Spectre limité, surtout utilisé comme antistaphylococcique.

5) OXAZOLIDINONES

Spectre limité : gram+ : **LINEZOLIDE** (nom commercial: Zyvoxid)

III.2.4- Action sur la synthèse de l'ADN

1) QUINOLONES

Spectre limité aux BGN à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa*.

ACIDE NALIDIXIQUE (nom commercial: Ngram)

ACIDE PIPEMIDIQUE (nom commercial: Pipram)

TROVAFLOXACINE (nom commercial: Trovan)

2) FLUOROQUINOLONES

Spectre élargi au *Pseudomonas aeruginosa* et aux bactéries gram+, notamment les staphylocoques.

CIPROFLOXACINE (nom commercial: Ciproxine, Ciflox)

FLUMEQUINE (nom commercial: Apurone)

NORFLOXACINE (nom commercial: Uroctal, Noroxine)

OFLOXACINE (nom commercial: Oflozet)

LEVOFLOXACINE (nom commercial: Tavanic)

3) PRODUITS NITRES

Prodrogues dont certaines bactéries peuvent produire le radical (-NO²) ce qui fait apparaître un dérivé toxique pour le DNA par substitutions de bases ou par cassures.

- **OXYQUINOLEINES** : spectre large, utilisé dans les infections urinaires ou intestinales : NITROXOLINE (nom commercial: Nibiol), TILBOQUINOL (nom commercial: Intérix)
- **NITROFURANES** : spectre large, utilisé dans les infections urinaires ou intestinales : NITROFURANTOÏNE (nom commercial: Furadoine, Furadantine), NIFUROXAZIDE (nom commercial: Ercefuryl)
- **NITRO-IMIDAZOLES** : spectre limité aux bactéries anaérobies (surtout les BGN et les BGP sporulés). METRONIDAZOLE (nom commercial: Flagyl), ORNIDAZOLE (nom commercial: Tiberall)

III.2.5- Action sur la synthèse de l'ARN (blocage de l'ARN polymérase)

1) RIFAMYCINES

Spectre large, mycobactéries, cocci gram+ et -, bacilles gram+, divers BGN (dont *Brucella*). Elles sont actives sur les germes à développement intracellulaire.

RIFAMYCINE (nom commercial: Rifocine)

RIFAMPICINE (nom commercial: Rifadine)

III.2.6- Action sur la synthèse de l'acide folique

1) SULFAMIDES

Spectre théoriquement large mais résistances fréquentes.

SULFADIAZINE (nom commercial: Adiazine)

SULFAMETHISOL (nom commercial: Rufol)

2) TRIMETHOPRIME

Spectre large, résistances beaucoup moins fréquentes.

TRIMETHOPRIME+SULFAMETHOXAZOLE (nom commercial: Bactrim)

COTRIMOXAZOLE (nom commercial: Eusaprim)

III.3- Mécanismes d'action

La connaissance du mode d'action des antibiotiques est un préalable à la compréhension des mécanismes de résistance.

Schématiquement, on peut considérer que les antibiotiques interagissent avec les bactéries au niveau des cibles qui sont spécifiques soit d'un antibiotique soit d'une famille d'antibiotiques. L'interaction de l'antibiotique avec sa cible a pour effet de perturber la formation des enveloppes cellulaires (paroi, membrane cytoplasmique) ou encore d'inhiber certains processus métaboliques bactériens (synthèse des protéines, synthèse des acides nucléiques). Le mode d'action des antibiotiques qui agissent globalement sur les différentes structures cellulaires par un effet physico-chimique non spécifique.

Le mode d'action est différent suivant la famille ou classe d'antibiotique :

- a) **Les Bétalactamines** : Les β lactamines agissent au niveau de la paroi bactérienne en inhibant la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane entraînant une lyse bactérienne.
- b) **Les Glycopeptides** : Ces molécules n'agissent que sur les bactéries à Gram positif en inhibant la synthèse du peptidoglycane donc de la croissance bactérienne.
- c) **Les Fosfomycines** :
- d) **Les Polymycines** : Agit au niveau de la membrane cytoplasmique bactérienne entraînant l'éclatement de la bactérie.
- e) **Les Aminosides** : Ils perturbent la synthèse des protéines au niveau de la fraction 30S du ribosome entraînant la destruction bactérienne. Ils sont bactéricides.
- f) **Les Phénicoles** : Les molécules sont bactériostatiques. Elles agissent au niveau de la sous unité 50 S du ribosome. Ceci a pour conséquence une inhibition de la synthèse des protéines.
- g) **Les Tétracyclines** : Les tétracyclines inhibent la synthèse des protéines au niveau de la sous unité 30 S du ribosome.
- h) **Les macrolides** : Les macrolides agissent en inhibant la synthèse protéique bactérienne. Ils se fixent sur l'unité 50 S du ribosome et bloquent ainsi la réunion du dernier stade de la synthèse. Ils sont bactériostatiques. Les Lincosamides agissent sur la fraction 50 S du ribosome en inhibant la phase initiale de la synthèse protéique. Les deux composants des Synergistines agissent sur la sous unité 50 S du ribosome en bloquant en deux étapes différentes la synthèse de la chaîne peptidique.

- i) **Les Quinolones** : Les quinolones inhibent la synthèse de l'ADN de la bactérie en se fixant sur le complexe "ADN-ADN gy rase" en empêchant la réplication et transcription de l'ADN bactérien.
- j) **Les produits nitrés** : Les nitrofuranes agissent en perturbant la réplication de l'ADN. Les nitroimidazoles agissent en inhibant la synthèse des acides nucléiques entraînant la mort rapide de la bactérie. Les nitroimidazolés sont bactéricides.
- k) **Les Rifamycines** : Les rifamycines agissent en bloquant la transcription par inhibition de l'ARN polymérase.
- l) **Les Sulfamides et association** : les sulfamides ont une activité bactériostatique. Ils entrent en compétition avec le PAB bloquant ainsi l'action de la synthétase (voir figure ci-dessous).

L'association "sulfamide triméthoprim" la plus utilisée est le cotrimoxazol Bactrim®. Les deux molécules bloquent la synthèse des folates à deux stades différents, ce qui renforce leurs activités antibactériennes.

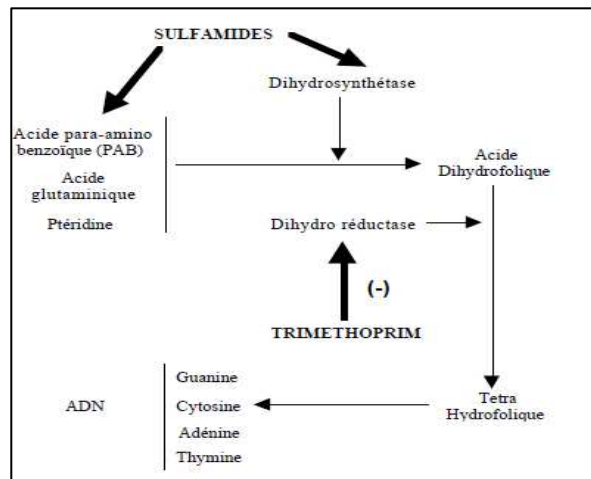


Fig.3 : action des sulfamides

- m) **Triméthoprim** : Le Triméthoprim agit dans le blocage enzymatique de la synthèse des folates, juste après les sulfamides.

IV – RESISTANCE BACTERIENNE

La résistance est une adaptation des bactéries aux agents antimicrobiens. La résistance bactérienne aux antibiotiques a, en fait deux définitions :

- une souche est dite "résistante" lorsque la concentration d'antibiotique qu'elle est capable de supporter est notablement plus élevée que la concentration atteignable in vivo.
- une souche est dite "résistante" lorsqu'elle supporte une concentration d'antibiotique notamment plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce

IV.1- Résistance naturelle des bactéries responsables d'IRN

C'est une insensibilité aux antibiotiques, existant naturellement chez tous les membres d'un genre ou d'une espèce bactérienne. Elle fait, donc, partie du patrimoine génétique normal du germe.

On peut citer les résistances naturelles des entérobactéries et de certaines espèces de *Pseudomonas* aux macrolides, des bactéries à Gram négatif à la pénicilline G et à la Vancomycine, des bactéries à Gram positif à la Colimycine, des Streptocoques aux aminosides. Ce type de résistance est recherchée dès les premières études réalisées afin de déterminer l'activité d'un antibiotique et contribue à définir son spectre antibactérien.

Elle détermine le **phénotype sauvage** d'une espèce vis-à-vis d'un antibiotique :

- les bactéries à Gram négatif sont naturellement résistantes aux glycopeptides par imperméabilité,
- *Klebsiella pneumoniae* est naturellement résistante à l'Amoxicilline par sécrétion d'une pénicillinase,
- les entérobactéries du groupe III sont naturellement résistantes à l'Amoxicilline par sécrétion d'une céphalosporinase,
- les staphylocoques sont naturellement résistants à l'Aztréonam par absence de cible.

Espèce	AM	AMC	TIC/ PIP	C1G	FOX	CTT	MA	CXM	GM	TET	COL	FT
<i>Klebsiella spp.</i>	R		R									
<i>C. koseri</i>	R		R									
<i>C. freundii</i>	R	R		R	R	R						
<i>E. cloacae</i>	R	R		R	R	R						
<i>E. aerogenes</i>	R	R		R	R	R						
<i>S. marcescens</i>	R	R		R			R	R			R	
<i>P. mirabilis</i>										R	R	R
<i>P. vulgaris</i>	R			R			R	R		R	R	R
<i>M. morgani</i>	R	R		R			R	R		R	R	R
<i>P. stuartii</i>	R	R		R					R	R	R	R
<i>Y. enterocolitica</i>	R	R	R	R	R		R	R				

R : résistance naturelle
 AM : aminopénicillines ; AMC : amoxicilline + acide clavulanique ; TIC : ticarcilline ; PIP : pipéracilline
 C1G : céphalosporines de 1^{ère} génération ; FOX : céfoxitine ; CTT : céfotétan ; MA : céfamandole ; CXM : céfuroxime ;
 GM : gentamicine ; TET : tétracyclines y compris la tigécycline ; COL : colistine, polymyxine B ; FT : nitrofuranes.

Tableau 10: résistance naturelle des *entérobactéries* opportunistes (CASFM 2009)

<i>P.aeruginosa</i>	Aminopénicillines, C1G et C2G, Céfotaxime, Ceftriaxone, Ceftizoxime, Ertapénéme, Kanamycine, Tétracyclines, Chloramphénicol, Triméthoprim, Quinolones
<i>A.baumannii</i>	Aminopénicillines, C1G et C2G, Ertapénéme, Fosfomycine, Triméthoprim, Furanes

Tableau 11 : résistance naturelle des BGN non fermentant (CASFM 2009)

- Résistance naturelle des BGN exigeants (**CASFM 2009**) :
H.influenzae : Macrolides, Lincosamides.
- Résistance naturelle cocci gram positif (**CASFM 2009**) :
Mecillinam, Aztréonam, Quinolones, Colistine

IV.2- Résistance acquise

C'est l'acquisition de nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotiques. Ce nouveau gène peut être obtenu soit par mutation au niveau du chromosome qui est un phénomène rare soit par transfert d'ADN de plasmides conjugatifs ou de transposons (mécanisme le plus fréquent).

- **Plasmides**

L'information génétique est portée par des plasmides, transférables à d'autres bactéries par conjugaison, transduction ou transformation.

- **Transposons**

Ce sont des fragments d'ADN "sauteurs" qui peuvent s'intégrer soit dans le chromosome soit dans des plasmides, en allant de l'un à l'autre.

IV.3- Mécanismes biochimiques de la résistance bactérienne [47,48]

Un ATB agit du fait de son affinité pour une cible vitale pour la bactérie. Sa fixation spécifique inhibe le fonctionnement de cette cible qui est en général une enzyme ou une structure clé impliquée dans la synthèse de la paroi, des acides nucléiques, des protéines ou de la membrane cytoplasmique.

Pour échapper à l'action létale des antibiotiques, les bactéries ont développé de très nombreux mécanismes biochimiques de résistance, associés à une grande ingéniosité génétique pour les acquérir et les diffuser. On observe plusieurs mécanismes de résistance aux ATB :

IV.3.1- Modification de la cible

Elle se fait par plusieurs mécanismes :

- Par modification des PLP : exemple par surproduction d'une PLP ayant moins d'affinité pour les **Bétalactamines**. c'est le cas de SAMR (acquisition d'une PLP supplémentaire (PLA 2a).
- Par la transformation du bout terminal du pentapeptide (D ALA-DALA) du peptidoglycane, normalement reconnaissable par les **Glycopeptides**, en D ALA-DLACTATE.
- Par modification des protéines du ribosome (**Aminosides et Macrolides**), ou remplacement des Adénines par une autre base (mutation) ou par méthylation par une méthylase.
- Avec les **Quinolones**, les bactéries modifient l'ADN gyrase de la topoisomérase II/et ou de la topoisomérase IV.
- Avec la **Rifamycine**, on note une modification de l'ARN polymérase

- Les bactéries agissent par hyperproduction de la cible (dihydro ptéorate synthétases) des **Sulfamides**.

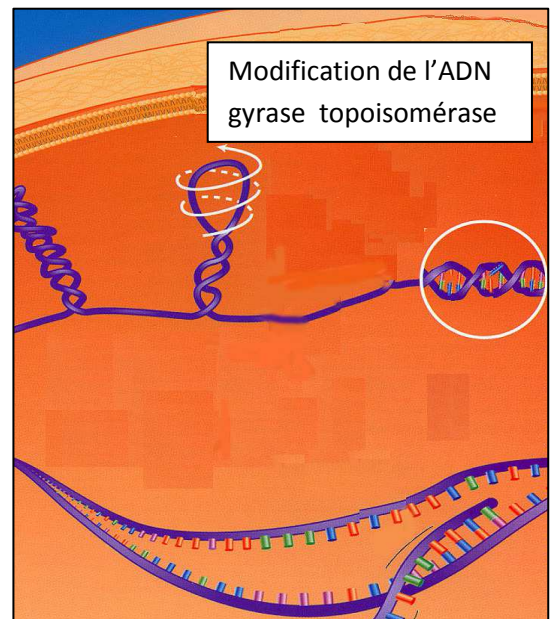
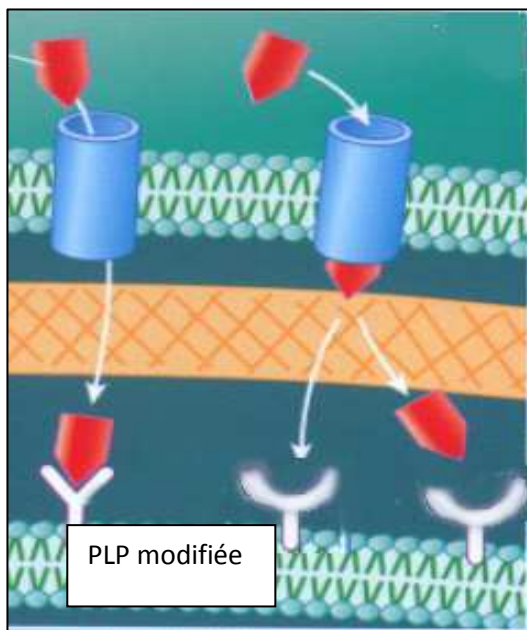


Fig. 4&5: Modification de cible notée avec les **Bétalactamines, Aminosides, Glycopeptides, Macrolides, Quinolones, Rifamycine, Sulfamides**

IV.3.2- Imperméabilisation

Elle se fait par :

- La mutation des porines : Les porines (Omp ou Opr) sont des canaux aqueux ou hydrophiles constitués de trois molécules de protéines qui laissent diffuser diverses molécules de faible masse moléculaire comme des substrats ou encore des antibiotiques. Le dysfonctionnement ou la perte de l'une d'entre elles peut entraîner la résistance bactérienne. Ce sont des tunnels hydrophiles. Les **Bétalactamines** passent

de la membrane externe à travers les porines pour pénétrer dans l'espace périplasmique dans le cas normal. exemple : *Pseudomonas aeruginosa* et l'Imipénème par modification de la porine D2.

- Avec les **Aminosides** on note une modification au niveau du transporteur permettant le passage de la membrane cytoplasmique, au niveau du système générateur d'énergie.
- Une mutation du système de transport des hexoses monophosphates permettant la pénétration de la **Fosfomycine**.

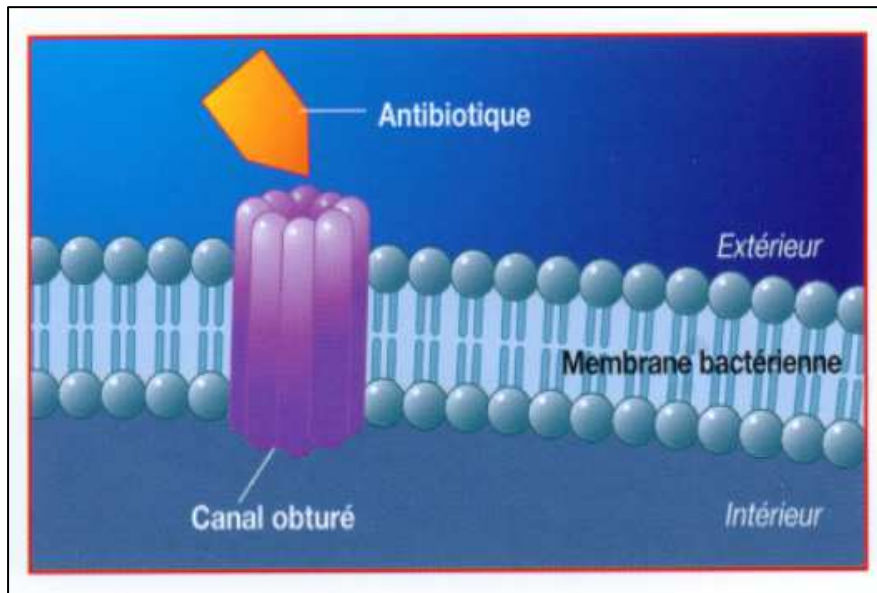


Fig. 6: Imperméabilisation contre les **Bétalactamines, Aminosides, Fosfomycine**.

IV.3.3-Inactivation de l'antibiotique par sécrétion d'enzymes

Les enzymes sécrétées par les bactéries vont détruire ou modifier l'antibiotique.

- Les **Bétalactamines** sont détruites par des **Pénicillinases, Céphalosporinases, Imipénémases, Bétalactamases à spectre large (BLSE)**.
- Les **Aminosides** sont désactivés par des **phosphorylases, acétylases, adénylases**.
- Les **Macrolides** désactivés par des estérases, lincomycine acétylases.
- Les **Phénicoles** par des chloramphénicols acétylase.

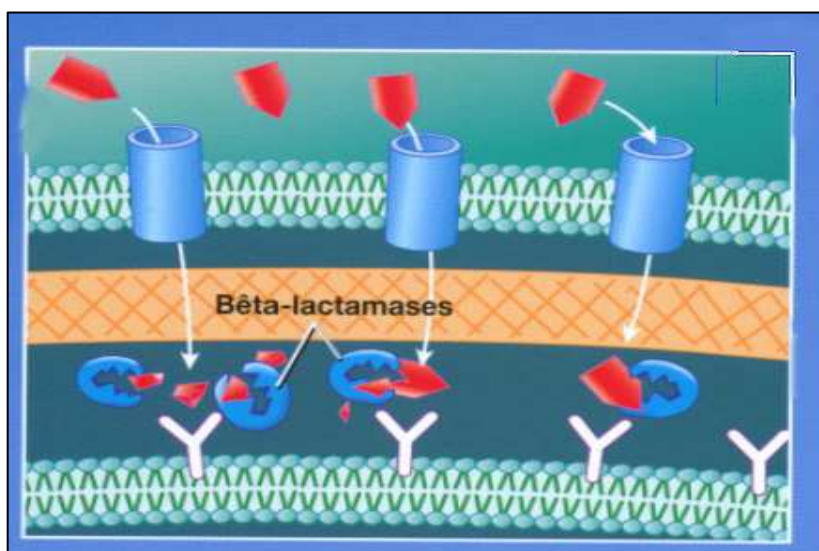


Fig.7 : Inactivation antibiotique par sécrétion d'enzymes contre **les Bétalactamines, Macrolides, Phénicoles, Aminosides**

C'est un mécanisme commun à toutes les cellules (procaryotes et eucaryotes), il permet d'expulser les substrats vers l'extérieur de la cellule. Chez les bactéries gram+, on observe une structure relativement simple avec une pompe dans la membrane simple. Par contre chez les bactéries gram- on observe une structure plus complexe car il faut évacuer à travers la membrane externe. On a 3 composants :

- ❖ Une pompe dans la membrane cytoplasmique
- ❖ Un tunnel de jonction périplasmique
- ❖ Une porine permettant de passer la barrière de la paroi bactérienne

Ce système d'efflux est exercé avec les **Bétalactamines** (*Pseudomonas aeruginosa* face au céfepime), **Aminoside** (*Pseudomonas aeruginosa*), **Macrolides** (*Staphylocoque*, *Pneumocoque* résistant au Erythromycine mais sensible au kétolides), **Quinolones** (seule la norfloxacine et la ciprofloxacine sont touchées par ce système).

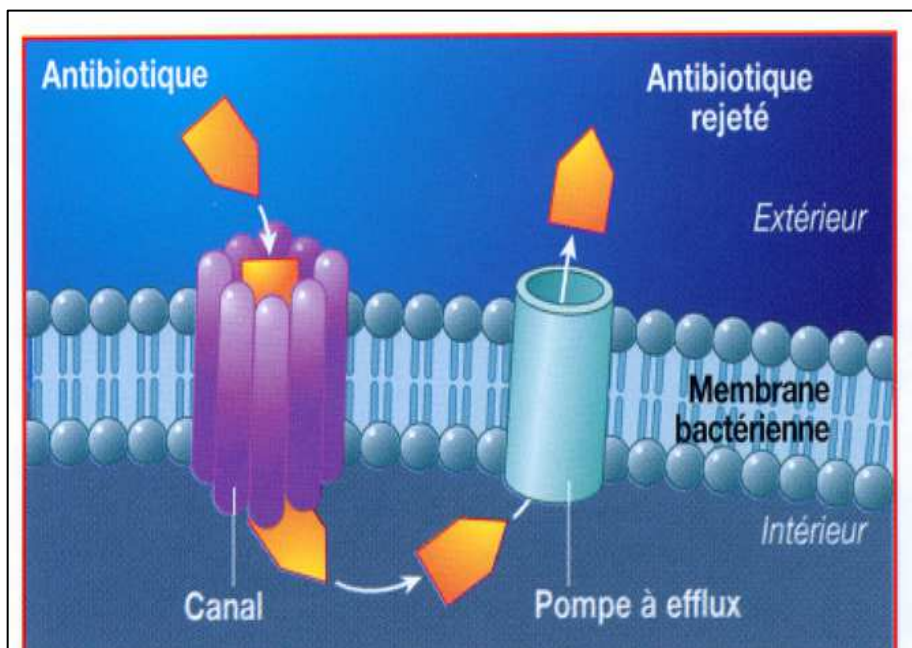


Fig. 8: mécanisme d'efflux contre **Bétalactamines, Aminosides, Macrolides, Quinolones**

Parfois certaines bactéries utilisent un système de protection de la cible antibiotique, ceci est observé contre les **Tétracyclines** et les **Fluoroquinolones**.

IV.4- Support génétique de la résistance bactérienne

La résistance génétique aux antibiotiques se manifeste par des mécanismes tels que la mutation génétique, ou par l'acquisition de matériel génétique étranger.

a) Mutation : Ces mutations sont rares (fréquence = 10^{-6} à 10^{-9}), mais leur taux est stable.

Elles sont héréditaires, mais non transmissibles en dehors de la progénie. Quelques gènes susceptibles de muter en entraînant des résistances :

- ADN gyrase : modification de la cible des quinolones
- ARN polymérase : modification de la cible de la rifampicine
- répresseur des β -lactamases : inactivation des β -lactamines
- porines imperméabilité

b) Acquisition de matériel génétique étranger

Un ou plusieurs gènes acquis rendent la bactérie insensible à l'antibiotique. Ils encodent de nouvelles molécules responsables : d'une inactivation de l'antibiotique, d'un efflux de l'antibiotique, d'une altération ou une substitution de la cible de l'antibiotique. L'acquisition de gènes se fait par :

- conjugaison (grâce aux pili sexuels),
- transformation,
- Transduction

V. ETIOPATHOGENIE

V.1- Origine des germes

Sous réserve d'un contrôle strict des sources exogènes de contamination telles que la voie manuportée et les matériels souillés, nous savons depuis près de 30 ans que le patient lui-même représente la principale source d'infection nosocomiale.

Cependant l'origine précise des germes responsables de pneumopathie nosocomiale reste controversée. Contrairement à la sphère otorhinolaryngologique, l'appareil respiratoire est physiologiquement stérile, tout comme le contenu gastrique. Lorsqu'une solution de continuité est créée entre ces structures, les germes se répandent et se multiplient à tous les niveaux. Qu'il s'agisse d'une flore commensale ou pathogène, la simple présence de bactéries sans invasion des tissus et sans réaction de l'organisme s'appelle une colonisation.

V.2 Porte d'entrée

a) Colonisation trachéobronchique et oropharyngée

Une colonisation trachéobronchique et oropharyngée à germes pathogènes existe chez les malades de réanimation même non ventilés mais également en dehors des réanimations en cas de pathologie respiratoire chronique. Le point de départ d'une colonisation trachéobronchique peut être une auto-inoculation à partir d'un site

oropharyngée ou gastrique, mais parfois l'atteinte trachéobronchique est première. Le développement de pneumopathie nosocomiale acquise sous ventilation mécanique (PNAVM) à partir d'un phénomène de translocation bactérienne a également été évoqué. Le nombre de patients colonisés augmente avec la durée d'hospitalisation en réanimation. Johansen et al ont clairement démontré que la colonisation trachéobronchique précède presque toujours le développement d'une PNAVM. La flore colonisante est composée initialement en majorité de BGP pour comporter après quelques jours essentiellement des BGN. Leur durée est croissante avec la durée du séjour. Une telle modification de flore survient parfois dès les premières 24 heures d'hospitalisation. Les raisons de la prédominance des Gram négatifs sont peu claires : origine digestive ou antibiothérapie venant détruire la flore commensale chargée d'inhiber le développement des germes pathogènes ? Ainsi la contamination exogène à partir des éléments du respirateur est de nos jours rarement impliquée.

En effet, le remplacement quotidien plutôt que tous les 2 jours des systèmes échangeurs de chaleur et d'humidité, ou le remplacement des circuits des ventilateurs plutôt que l'utilisation du même circuit pendant toute la durée de ventilation ne diminue pas l'importance de la colonisation des patients ventilés. Ceci tient en partie au fait que les circuits sont contaminés de proche en proche par les propres sécrétions du malade.

b) Colonisation gastrique

Elle a longtemps été considérée comme étant la première source de colonisation trachéobronchique. En effet, une prolifération bactérienne existe dans l'estomac des patients de réanimation. Des prélèvements répétés sur différents sites ont permis de démontrer la séquence suivante : après une progression rétrograde des germes de l'estomac vers l'œsophage et l'oropharynx, l'arbre trachéobronchique est contaminé à la faveur de troubles de déglutition avec micro ou macro-inhalations répétées qui se produisent même en présence d'une sonde d'intubation. La colonisation gastrique est favorisée par l'élévation du pH gastrique au dessus de 4,5, en particulier par les thérapies antiulcéreuses anti-H₂ et les antiacides. Soulignons que plusieurs travaux récents ont mis en évidence une colonisation trachéale première.

c) Inhalations

Elles sont favorisées par les troubles de la vigilance ou par certaines interventions chirurgicales lourdes ayant justifié une anesthésie et une intubation trachéale de longue durée avec troubles secondaires de la déglutition. Par une augmentation du volume intragastrique, la nutrition entérale majore encore le risque d'inhalation. Ibanez et al ont décrit un phénomène de reflux gastrooesophagien précédant la survenue d'inhalation chez 74% des patients ventilés ayant une sonde nasogastrique.

d) Adhérence bactérienne

L'adhérence des bactéries aux cellules épithéliales est une propriété de certains micro-organismes tels que le *Pseudomonas aeruginosa*. Par le calcul d'un index d'adhésion,

plusieurs travaux ont révélé une adhérence préférentielle des bactéries sur les cellules buccales des patients de réanimation par comparaison aux sujets sains. La séquence adhérence-colonisation-infection est alors très probable.

e) Altération des moyens mécaniques de défense

Suite à plusieurs mécanismes :

- Absence de filtration par les voies aériennes supérieures des particules de plus 10 μ m de diamètre.
- Communication entre la glotte et l'oropharynx.
- Diminution du réflexe de la toux.
- Les lésions muqueuses entraînées par la présence du matériel étranger.
- Les inhalations répétées du liquide gastrique.
- Les aspirations trachéales.
- La dysfonction mucociliaire majorée en cas d'insuffisance d'humidification ou en cas de concentrations élevées d'oxygène.
- L'immobilisation en décubitus dorsal favorise les atelectasies et les pneumopathies nosocomiales ; des résultats rapportés dans plusieurs études suggèrent que le système de lits oscillants, permet une mobilisation alternative des patients, serait un moyen de prévention.

f) Altération des moyens biochimiques et cellulaires de défense

Les immunoglobulines A sécrétées semblent tenir le rôle principal dans les processus de défense envers les infections pulmonaires. Une équipe a rapporté une augmentation croissante avec la durée de ventilation mécanique du rapport IgA/albumine dans les sécrétions bronchiques. Cette élévation était environ 6 fois moindre chez les patients développant une PNAVM par rapport à ceux qui n'en développaient pas.

Une autre substance, la protéine A, serait la principale des composantes du surfactant, impliquées dans les processus alvéolaires de destruction bactérienne. Elle a été retrouvée en quantité significativement diminuée dans le liquide bronchoalvéolaire des patients atteints de pneumopathie par comparaison avec des volontaires sains et des malades atteints de fibrose idiopathique.

V.3- Facteur de risque

a) Facteurs liés au service exemple la réanimation

❖ Ventilation mécanique

C'est le facteur majeur associé à l'émergence de pneumopathie nosocomiale et l'ensemble des travaux sur ce sujet montre que le nombre de PNAVM augmente avec sa durée. Un suivi prospectif de 567 patients a montré que le risque de développer une PNAVM augmente de façon constante de 1% à chaque jour supplémentaire de ventilation. Langer et al. ont démontré que le risque de développer une PNAVM est maximal vers le 8-10ème jour de ventilation.

❖ Respirateurs et circuits

Sous réserve d'une stérilisation adéquate du matériel et du respect des règles élémentaires d'hygiène en réanimation, il est clairement démontré que les circuits ne sont pas responsables de PNAV. Une élévation de l'incidence des PNAV a même été rapportée lorsque des changements quotidiens des circuits sont effectués. Toutefois la condensation formée dans les tuyaux peut contenir plus de 105 BGN /ml et conduire à une attention particulière lors des soins pour éviter leur déversement vers la trachée. Les nébuliseurs véhiculent des particules jusqu'aux structures distales (<4µm) et s'ils sont contaminés, ils peuvent entraîner des pneumopathies très sévères.

❖ Sondes d'intubation

Elles représentent une voie de passage des germes depuis l'oropharynx vers la trachée en dépit des ballonnets d'étanchéité qui, lorsqu'ils n'atteignent pas une pression de 20 cm H₂O, multiplient par 2,5 le risque de PNAV. Des systèmes d'aspiration permanente des sécrétions sous-glottique mais au-dessus du ballonnet ont été proposés. Leur efficacité est rapportée par plusieurs équipes et serait surtout probante chez les patients ne recevant pas d'antibiothérapie. Enfin les sinusites maxillaires, favorisées par la présence de sondes nasogastriques et nasotrachéales, multiplient par près de 4 fois le risque de PNAV.

❖ Trachéotomie

On décrit plus de cas de PNAV chez les patients trachéotomisés qu'en cas d'intubation oro ou nasotrachéales. Cependant, à ce jour aucun travail méthodologiquement bien conduit n'a démontré d'effet protecteur d'une technique (intubation ou trachéotomie) par rapport à l'autre à l'égard des PNAV.

❖ Aspirations trachéales

Elles peuvent entraîner une contamination exogène par voie manportée. Les systèmes clos d'aspiration ne semblent pas pour autant s'accompagner d'une diminution de l'incidence des PNAV comparés aux systèmes ouverts standards. En fait, dès les premières heures d'une intubation, un biofilm contenant des bactéries tapisse la lumière de la sonde. Les aspirations trachéales favorisent sa fragmentation et les particules libérées sont propulsées dans l'arbre aérien par le flux inspiratoire du respirateur.

b) Facteurs liés aux patients

❖ Gravité de la maladie sous jacente

Le risque de contracter une PNAV est d'autant plus important que l'évolution spontanée des malades soit estimée fatale à court ou à moyen terme. D'autres caractéristiques sont à considérer bien qu'elles soient inconstamment retrouvées comme facteur de risque indépendant lors des analyses multivariées : l'âge, l'obésité, l'alcoolisme, la malnutrition, l'immunodépression, les BPCO, les défaillances viscérales associées, brûlures, traumatisme.

❖ Motif d'hospitalisation en réanimation

Les patients chirurgicaux développent davantage de PNAV que les patients médicaux. Le risque est majeur en cas de chirurgie combinée thoracoabdominale. La

chirurgie en urgence augmente encore ce risque tout comme la présence d'un traumatisme crânien ou d'un coma.

Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) constitue un facteur de risque important : dans une étude prospective conduite par Chastre et al. 55% des 56 patients présentant un SDRA ont présenté une PN, contre 28% parmi les 187 patients ventilés pendant la même période et ne présentant pas de SDRA. Le diagnostic de pneumopathie reposait sur des critères stricts (brosse distale protégée et lavage bronchioloalvéolaire ; la mortalité était de 61% parmi les patients présentant un SDRA contre 34% chez les autres. Néanmoins, dans ce sous groupe de patients la survenue d'une PN ne semble pas modifier la mortalité. Cependant, dans l'étude de Chastre et al, la survenue d'une pneumopathie dans le groupe SDRA semble être surtout liée à la durée de la ventilation mécanique.

DEUXIEME PARTIE :
MATERIELS ET METHODES

I. MATERIELS D'ETUDE ET METHODES

I.1-Cadre d'étude

Ce travail a été réalisé à l'unité de bactériologie du Laboratoire Central d'Analyse Médicale (LCAM) du CHU Hassan II de Fez. Cette étude s'est déroulée sur 4 mois (de janvier en avril) et s'est effectuée sur 37 prélèvements constitués de PDP et de fibroaspiration (FA) issus des services de réanimation (A1, A4, Réa mère enfant).

I.2- Prélèvements

Les prélèvements retenus dans cette étude sont les PDP, FA et les LBA car sont caractéristiques des infections respiratoires basses nosocomiales. Ces prélèvements sont transportés immédiatement au laboratoire pour les analyses.

➤ prélèvement distal protégé (PDP)

C'est l'introduction d'un dispositif de prélèvement protégé des sécrétions oropharyngées, par l'intermédiaire d'un fibroscope. Une fois au site de l'infection, une aspiration (après instillation d'une faible quantité de sérum physiologique) ou un brossage de la muqueuse est réalisée. L'aspiration est ensemencée directement alors que la brosse est « vortexée » dans 1ml d'eau stérile. Significatif si le pathogène est $\geq 10^3$ UFC/mL

➤ liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) et mini-LBA

C'est un prélèvement qui consiste à recueillir les sécrétions et les cellules qui bordent les bronchioles et les alvéoles dans le territoire pulmonaire. Il s'agit d'injecter puis de ré-aspirer du sérum physiologique (100 à 200 mL) directement dans la bronche à explorer.

Ce prélèvement est réalisé chez des patients en soins intensifs et/ou immunodéprimés.

Son principal avantage est de pouvoir explorer un vaste territoire pulmonaire (bronchioles distales et alvéoles). En revanche, c'est un prélèvement invasif obligatoirement réalisé sous fibroscopie.

Le mini-LBA est une alternative au LBA qui consiste à injecter puis ré-aspirer un volume plus faible de sérum physiologique (seulement 20 mL). L'injection se fait à l'aide d'un double cathéter protégé (dans la sonde d'intubation).

C'est un prélèvement réalisé surtout pour des patients hospitalisés en soins intensifs.

Son avantage principal est d'être un prélèvement « protégé » de la flore salivaire sans besoin de fibroscopie. Mais, il est réalisé à l'aveugle dans l'arbre trachéo-bronchique.

-Avantages : C'est un prélèvement de bonne qualité qui permet l'étude et la mise en évidence des germes, il diminue fortement la contamination par la flore salivaire.

- Inconvénients : Cette méthode de prélèvement est douloureuse et nécessite une endoscopie en plus, le prélèvement est dilué.

Le seuil de positivité est de 10^4 UFC/mL pour le LBA.

Le seuil de positivité est de 10^3 UFC/mL pour le mini-LBA.

	Expectoration / Crachat	Aspiration endotrachéale (AET)	Lavage broncho-alvéolaire (LBA)	Mini-LBA	Brossage bronchique protégé (BBP)
Seuil de positivité	10 ⁷ UFC/mL	10 ⁵ UFC/mL	10 ⁴ UFC/mL	10 ³ UFC/mL	10 ³ UFC/mL
Avantages	Facile, non invasif Par le patient lui-même	Non invasif	Exploration d'un large territoire pulmonaire	Mieux supporté que le LBA Pas de fibroscope Prélèvement protégé	Précision du prélèvement (fibro) Prélèvement protégé
Inconvénients	Contamination importante	A l'aveugle Risque de contamination	Invasif (fibro) Mal supporté Contamination possible	A l'aveugle	Faible quantité de prélèvement Invasif

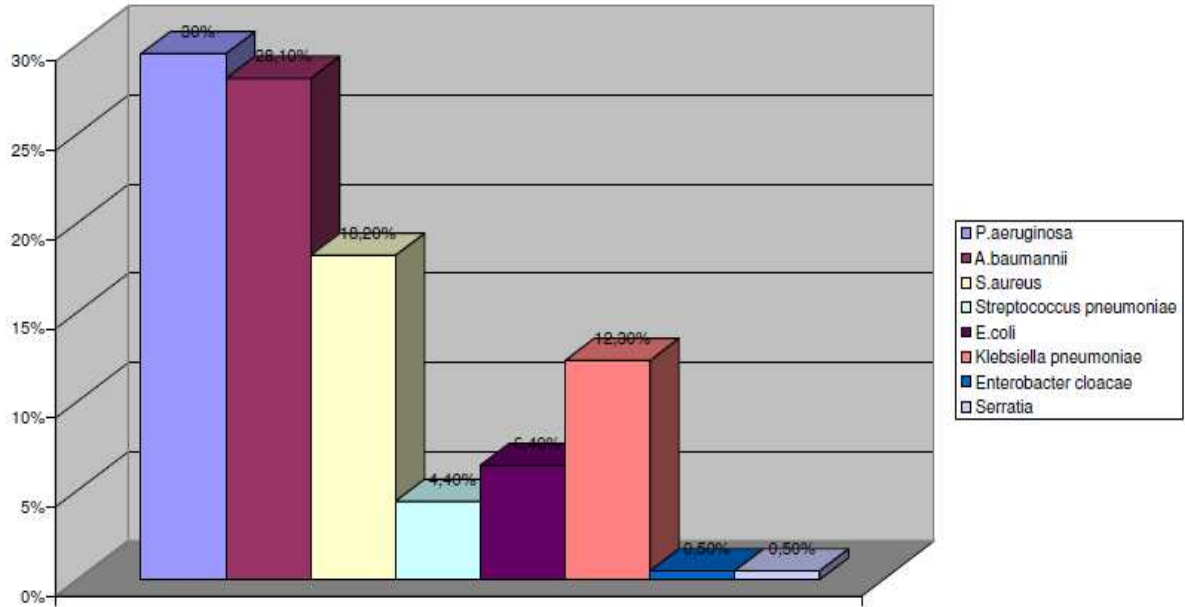
Tableau 12: les seuils de positivité

II. ETUDE RETROSPECTIVE

Des études réalisées au service de réanimation polyvalente de CHU Hassan II montrent que les germes les plus fréquemment rencontrés au cours des 4 années de surveillance (2004-2007) sont : *Pseudomonas aeruginosa* (30%), *Acinetobacter baumannii* (28,10%), *S.aureus* (18,2%) et *Klebsiella pneumoniae* (12,3%).

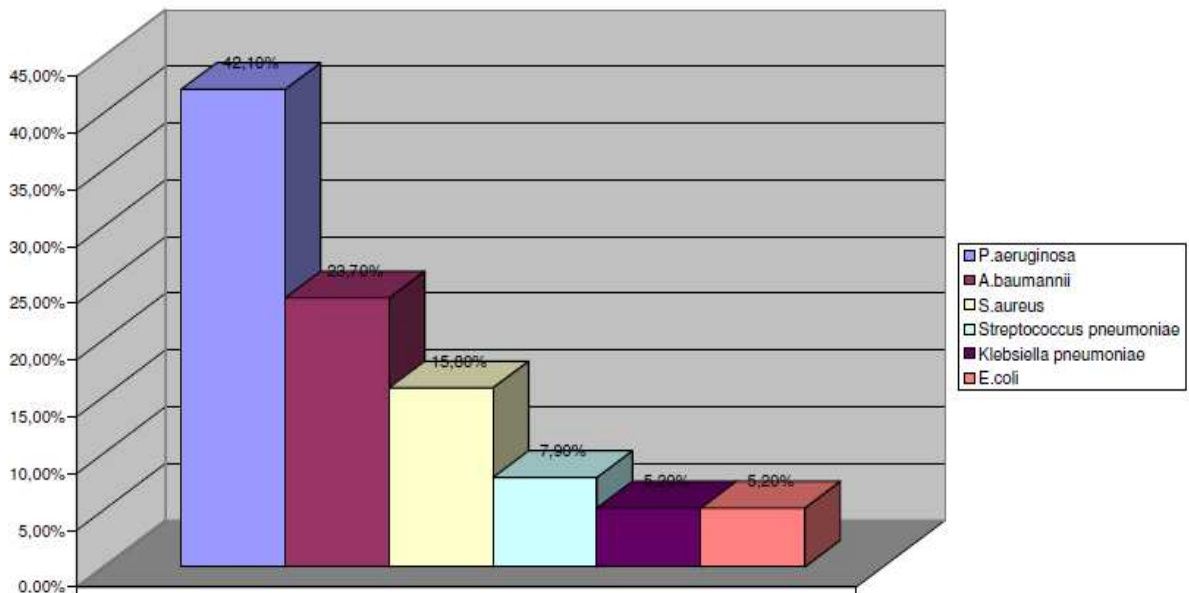
- ❖ 2004 : *A.baumannii* est le premier (33%), suivi de *P.aeruginosa* (27,8%), *S.aureus* (17%), *Klebsiella* (11,2%) et *Streptococcus pneumoniae* (11,2%).
- ❖ 2005 : On remarque que *A.baumannii* (23,7%) a cédé la place à *P.aeruginosa* (42,1%). On note aussi l'apparition d'*E.coli* (5,2%).
- ❖ 2006 : *P.aeruginosa* toujours en tête (31,7%), suivi d'*A.baumannii* (25,4%). On remarque l'augmentation de *Klebsiella* (12,7%) et qui dépasse le *Streptococcus pneumoniae* (4,8%).
- ❖ 2007 : *A.baumannii* prend maintenant la relève et devient en tête (31%), suivi de *P.aeruginosa* (22,6%). On voit aussi la disparition de *Streptococcus pneumoniae* et l'apparition de germes nouveaux : *Enterobacter cloacae* et *Serratia*. Autre remarque très importante c'est l'apparition de souches d'*A.baumannii* qui sont multirésistantes au cours de l'année de 2007.

203 résultats sont recensés sur les 4 ans, dont **18** en 2004, **38** en 2005, **63** en 2006, **84** en 2007
Sur le total des 203 prélèvements, les germes retrouvés sont (voir histogramme n°1) :

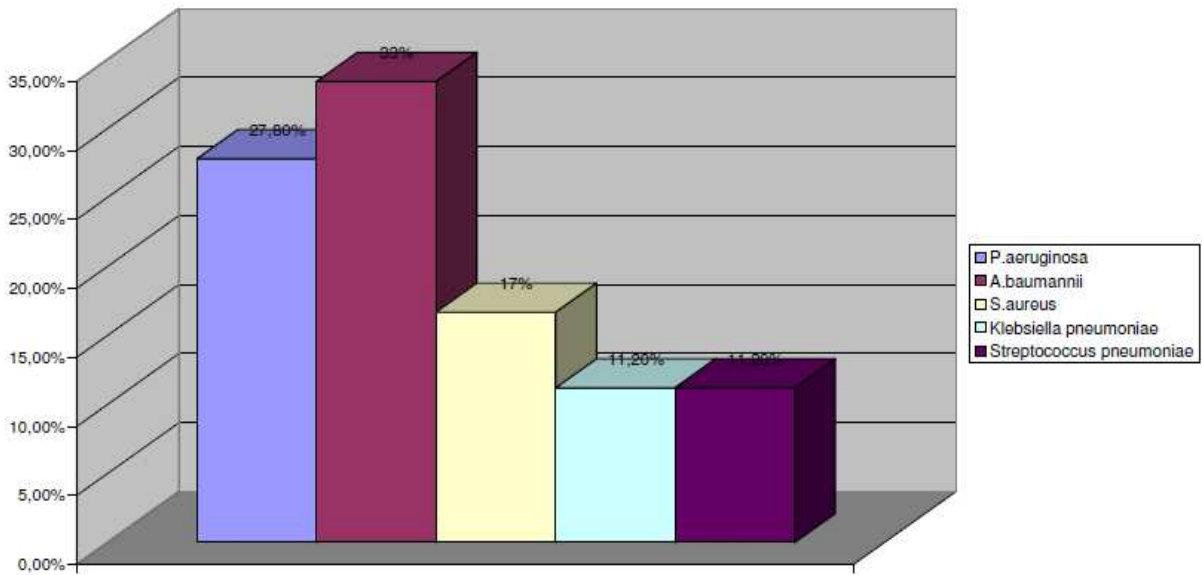


Histogramme n°1:Épidémiologie des infections broncho-pulmonaires nosocomiales au cours des 4 années (n=203)

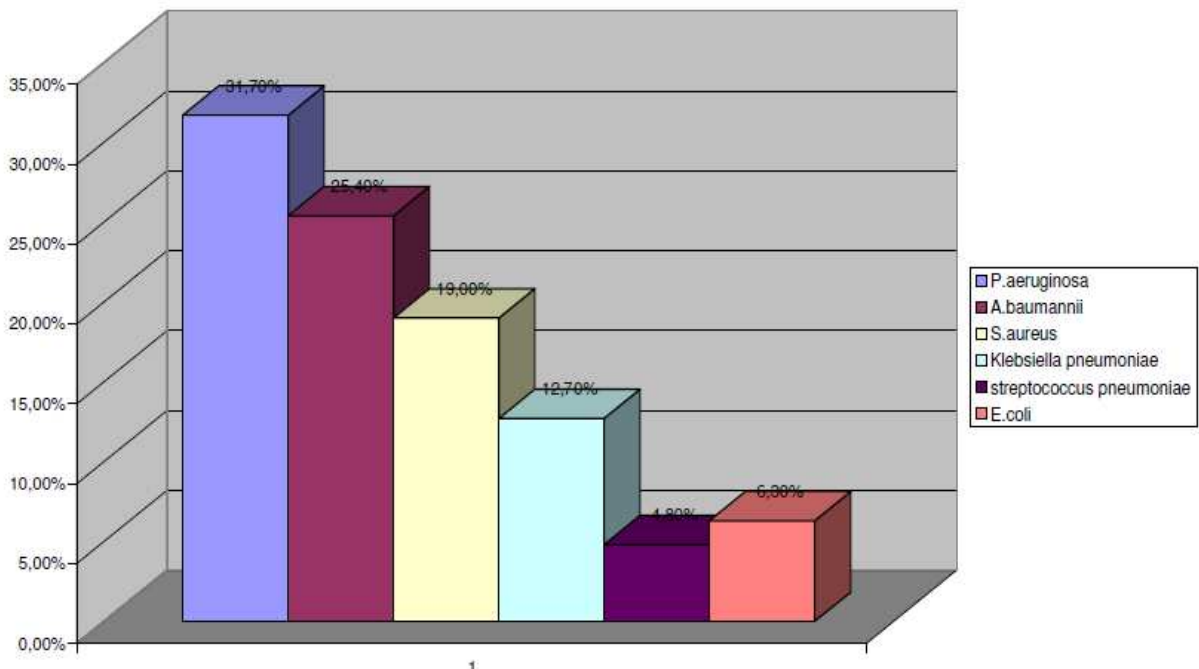
La répartition selon les années 2004, 2005, 2006, 2007, est la suivante :(**histogrammes n°2, 3,4 et 5)**



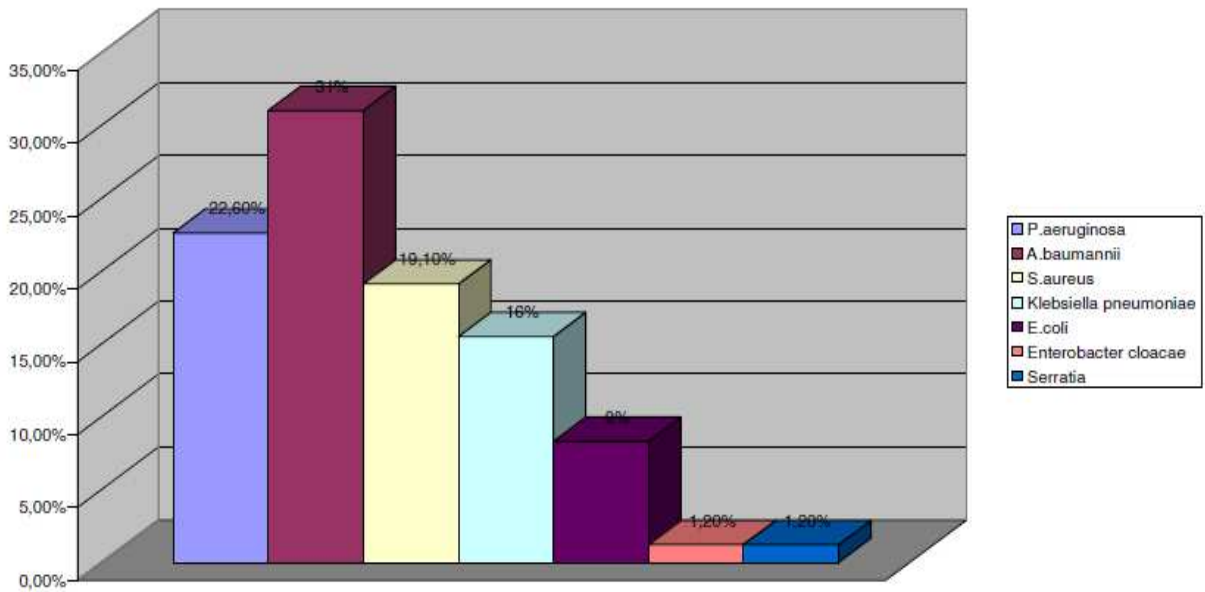
Histogramme n°2: Epidémiologie des infections broncho-pulmonaires nosocomiales au cours de l'année 2004 (n=18)



Histogramme n°3: Epidémiologie des infections broncho-pulmonaires nosocomiales au cours de l'année 2005 (n=38)



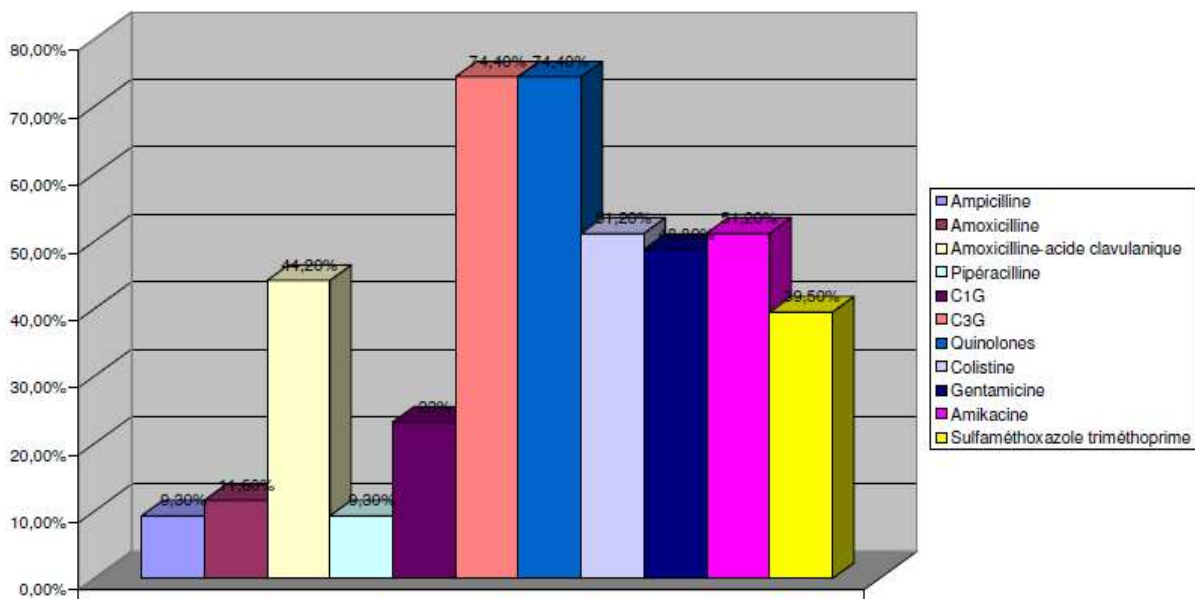
Histogramme n°4: Epidémiologie des infections broncho-pulmonaires nosocomiales au cours de l'année 2006 (n=63)



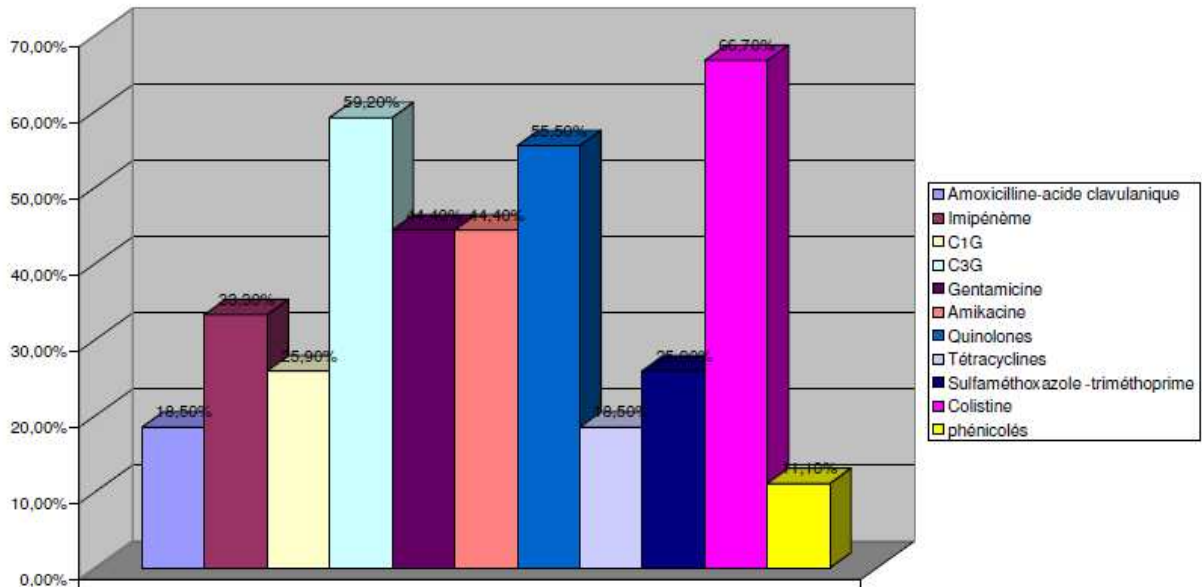
Histogramme n°5: Epidémiologie des infections broncho-pulmonaires nosocomiales au cours de l'année 2007 (n=84)

IV.1 profil de sensibilité au cours des années 2004-2007

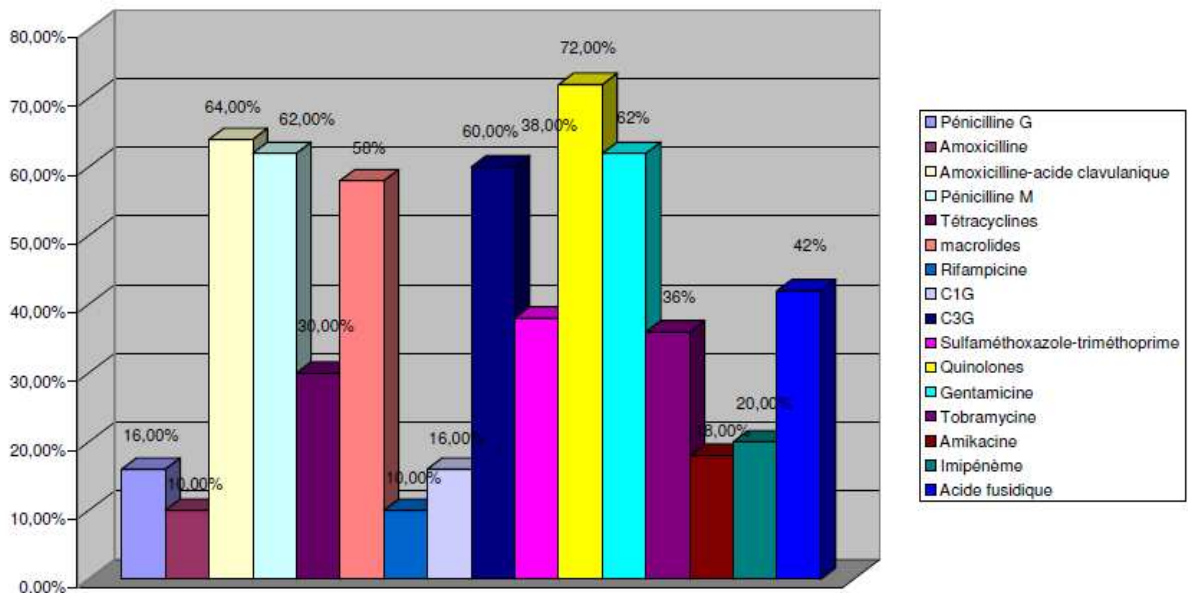
Durant ces 4 années, les profils de sensibilité des principaux germes sont les suivants (Voir **histogrammes n°6, 7, 8, 9**) :



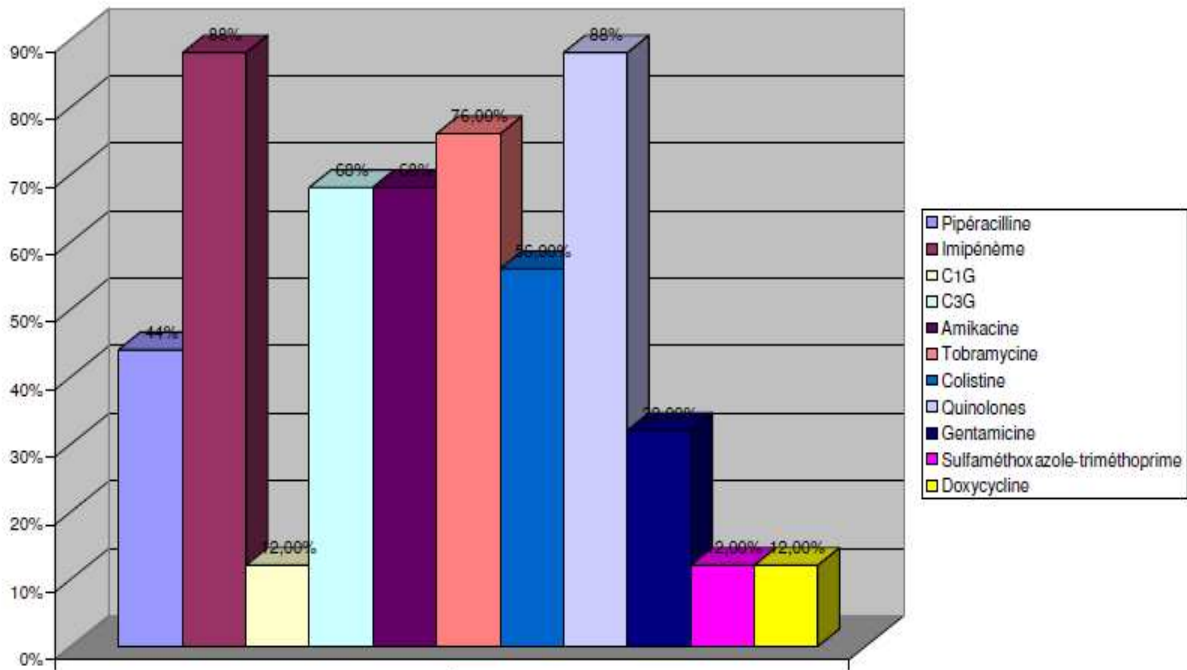
Histogramme n°6: Profil de sensibilité d'*E.coli* au cours des 4 années (n=61)



Histogramme n°7: Profil de sensibilité de *K.pneumoniae* au cours des 4 années (n=52)



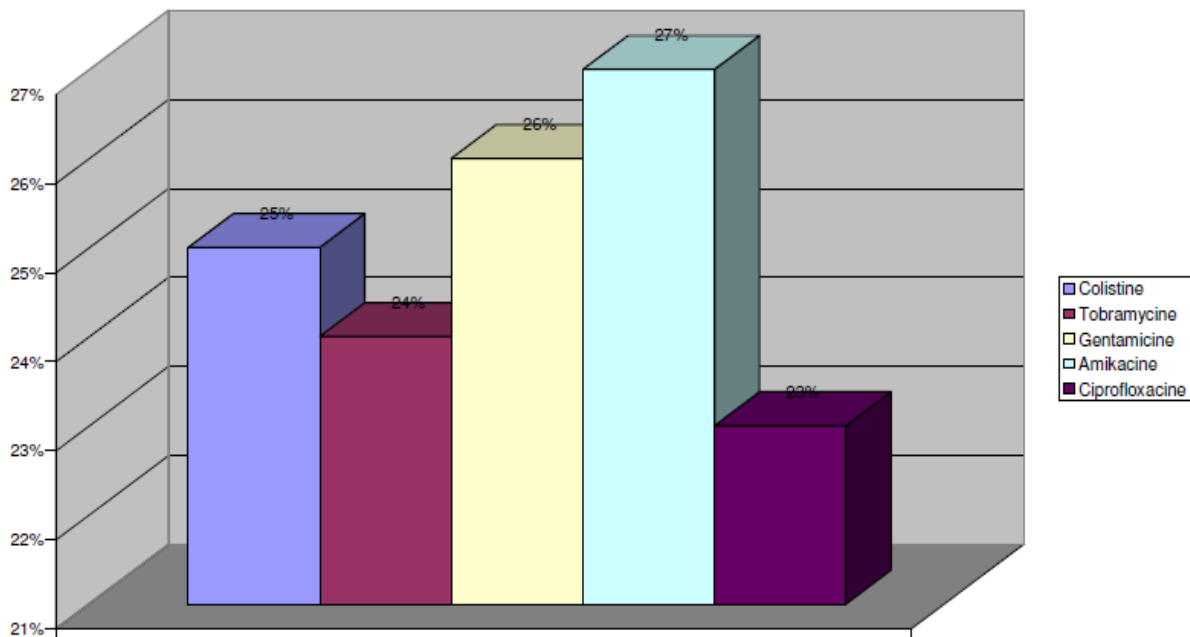
Histogramme n°8 : Profil de sensibilité de *S.aureus* au cours des 4 années (n=50)



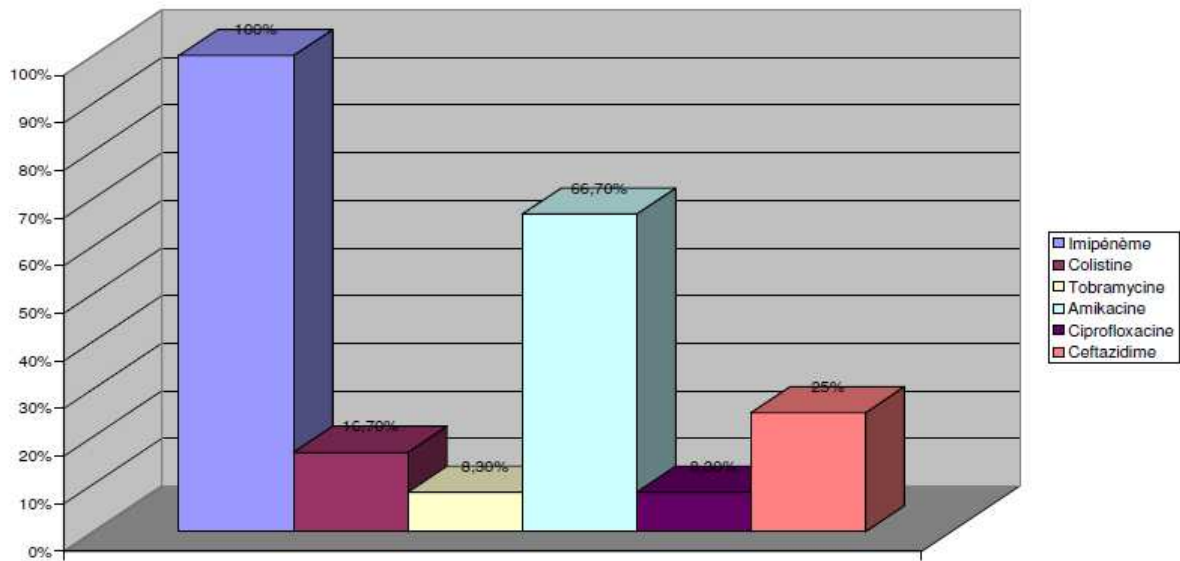
Histogramme n°9: Profil de sensibilité de *P.aeruginosa* au cours des 4 années

IV.2 Evolution au cours des années 2004 à 2007

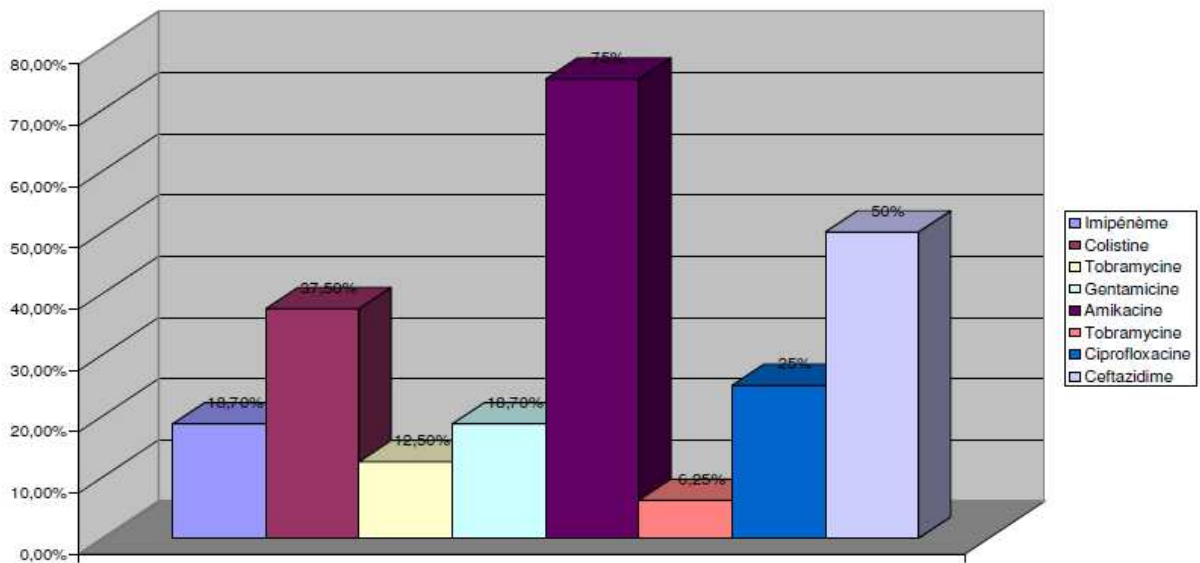
Compte tenu de son important effectif, seul le cas d'*A.baumannii*, a été analysé (voir **histogramme n° 10, 11,12 et 13**)



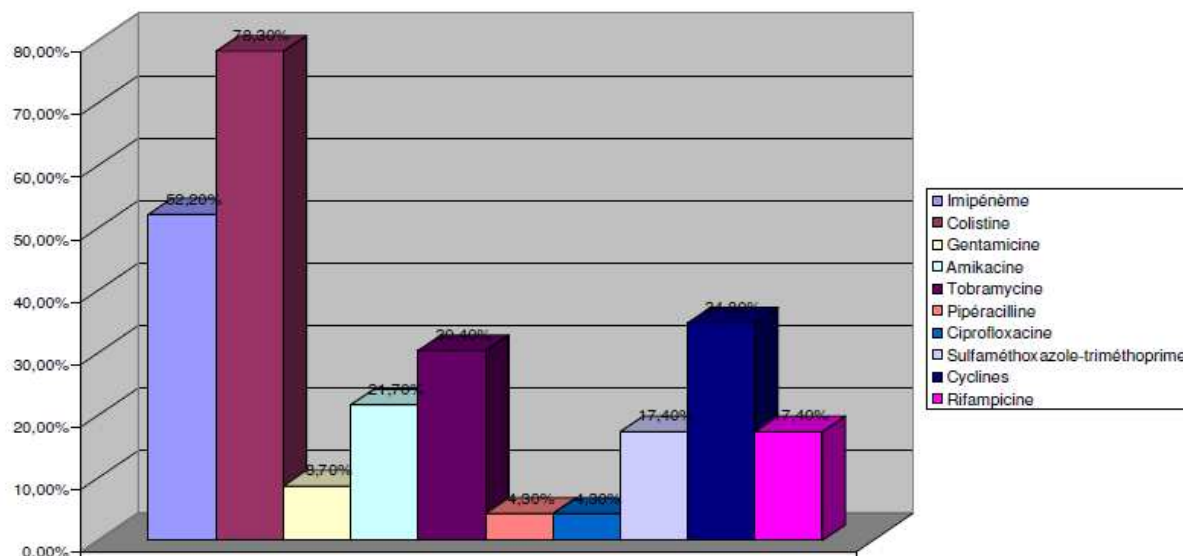
Histogramme n°10: Profil de sensibilité d'*A.baumannii* au cours de l'année 2004



Histogramme n°11: Profil de sensibilité d'A.baumannii au cours de l'année 2005



Histogramme n°12: Profil de sensibilité d'A.baumannii au cours de l'année 2006



Histogramme n°13: Profil de sensibilité d'A.baumannii au cours de l'année 2007

I V.3 Répartition des germes responsables d'IRN année 2010

Cette étude est faite à partir des prélèvements suivants : PDP, LBA issus des services de réanimation (A4, A1, RME).

Au cours de l'année 2010, 1061 prélèvements ont été enregistrés, ECBE, KT, PDP, LBA y compris. Mais vu que nous nous intéressons aux infections respiratoires basses nosocomiales, nous prenons en compte que les PDP et LBA positifs qui sont au nombre 172 :

- 168 PDP
- 4 LBA

On peut ainsi faire la répartition suivant les âges puisque parmi les 172 prélèvements, 144 sont issus des services de réanimation A1 et A4 et 28 des services de réanimation mère enfant (RME).

services	Nbre de prélèvement	pourcentage
REA A1, A4	144	83,72%
RME	28	16,28%
total	172	100%

Tableau 13: répartition suivant les services

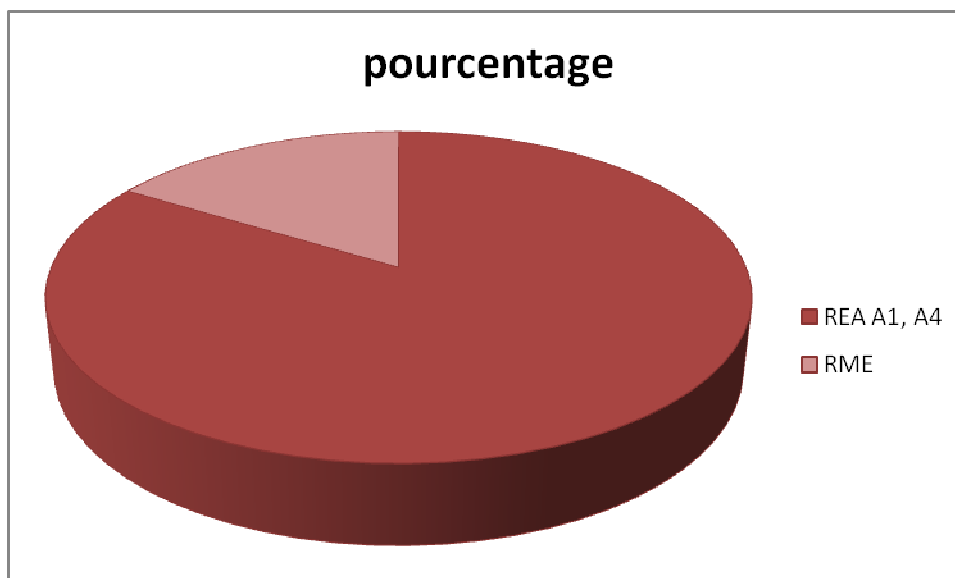
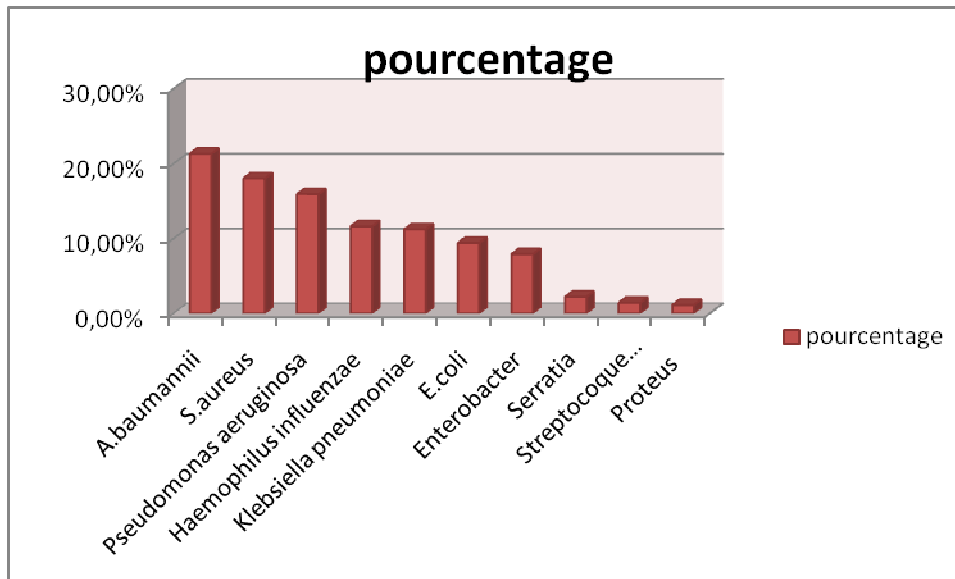


Fig. 9: répartition des IRBN suivant les services, année 2010

bactéries	nombre	pourcentage
A.baumannii	59	21,3%
S.aureus	50	18%
Pseudomonas aeruginosa	44	15,9%
Haemophilus influenzae	32	11,6%
Klebsiella pneumoniae	31	11,2%
E.coli	26	9,4%
Enterobacter	22	7,9%
Serratia	6	2,2%
Streptocoque pneumoniae	4	1,4%
Proteus	3	1,1%
total	277	100%

Tableau 14: la répartition des germes année 2010.



Histogramme n°14 : répartition des germes responsable d'IRB année2010

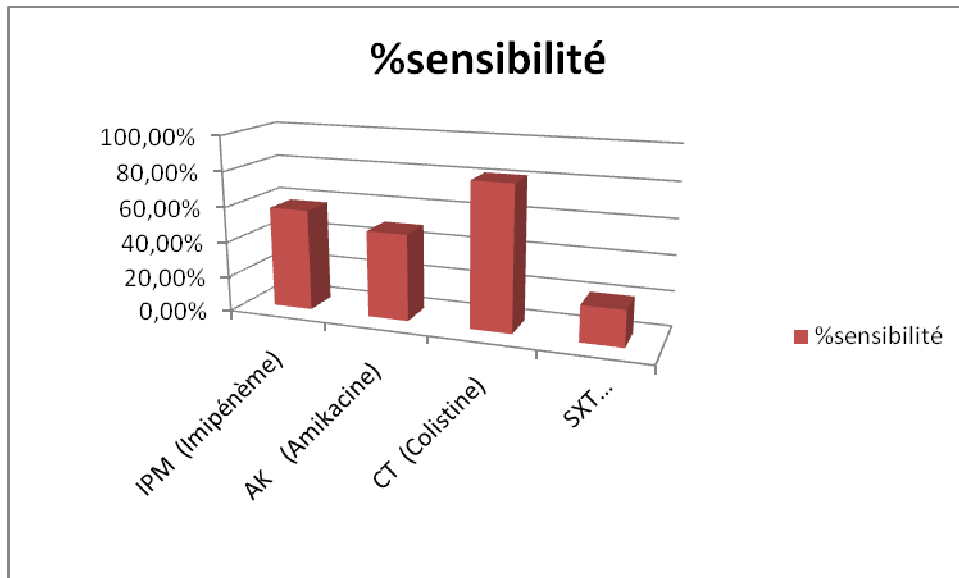
Cette répartition montre une prédominance d'*A.baumannii* avec 21,3%, suivi de *S.aureus* 18,1%, et de *Pseudomonas aeruginosa* 15,9%. on a remarqué l'apparition de *S.aureus* au second qui occupait la troisième place les années allant de 2004 à 2007, de même *H.influenzae* occupe la place de *Klebsiella pneumoniae* alors qu'il ne figurait pas parmi les six groupes de bactéries recensées de 2004 à 2007.

IV.4 Profil de sensibilité des germes au cours de l'année 2010

Nous allons analyser le profil de sensibilité de *A.baumannii*, *S.aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *H.influenzae*.

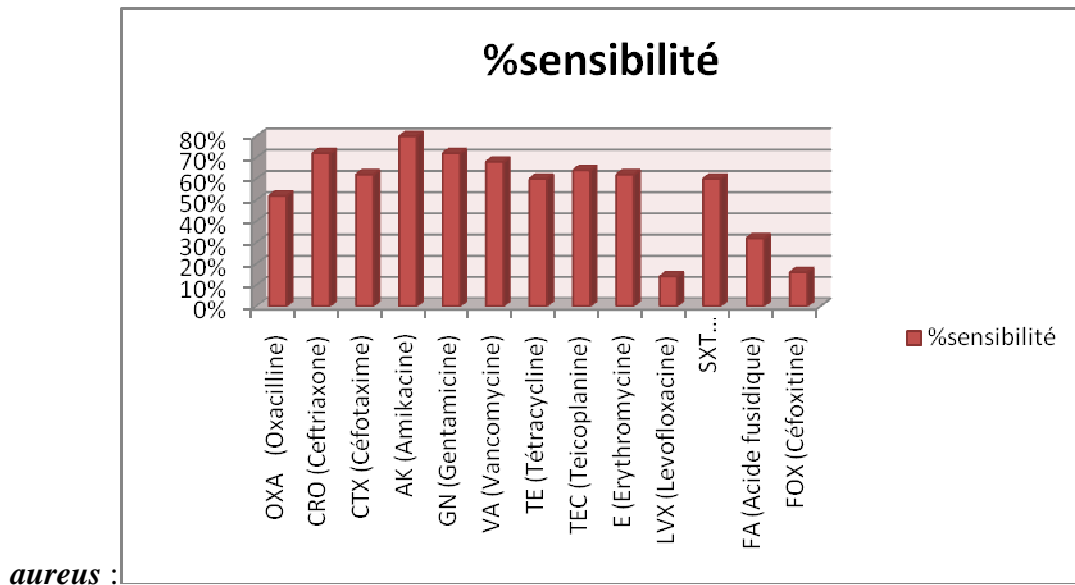
❖ Profil de sensibilité d'*A.baumannii*

ATB étudiés	%sensibilité
IMP (Imipénème)	57,63%
AK (Amikacine)	49,15%
CT (Colistine)	81,36%
SXT (Sulfaméthoxazole+Trimethoprime)	20,43%

Tableau 15 : pourcentage de sensibilité d'*A.baumannii***Histogramme n° 15: profil de sensibilité d'*A.baumannii***

Le profil d'*A.baumannii* montre de façon général une sensibilité pour les 4 ATB étudiées, néanmoins on remarque parfois pour certaines souches une sensibilité à d'autres ATB comme la CIP (Ciprofloxacine), NOR(Norfloxacine), LVX (Lévofoxacine) qui sont des quinolones, TIC (Ticarcilline), PIP (Pipéracilline), AZT (Aztréonam), qui sont des Bétalactamines, et aminosides la TOB (Tobramycine) etc., mais cela ne représente que sur 5% des souches recensées.

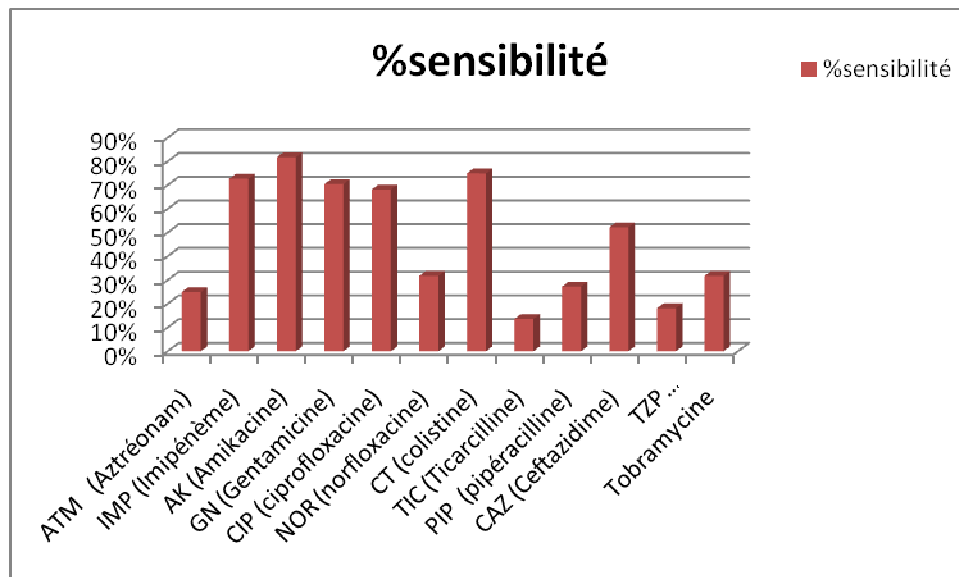
❖ Profil de sensibilité de *Staphylocoque*



Histogramme n° 16: profil de sensibilité de *S.aureus*

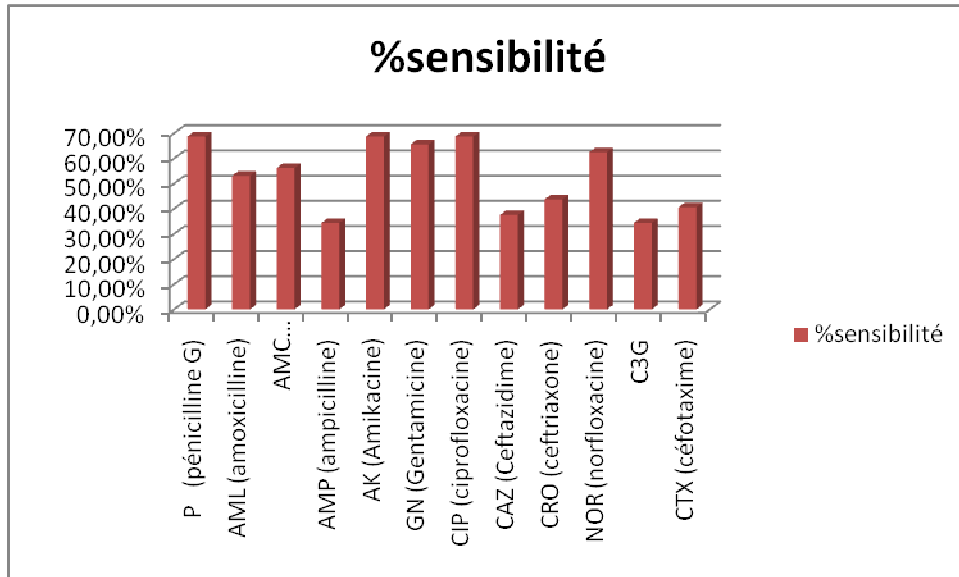
En plus de la sensibilité aux différents ATB cités ci-dessus, on remarque chez les *S.aureus* une sensibilité vis-à-vis des quinolones comme la CIP (ciprofloxacine), NOR (norfloxacine), OFX (ofloxacine), des macrolides tels que Lincomycine, SP (Spiramycine) et très rarement (0,5%) sensible aux Bétalactamines tels que l'AMC, AML, Pénicilline G et aux C1G et C3G.

❖ Profil de sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa*:



Histogramme n° 17: profil de sensibilité de *P.aeruginosa*

❖ **Profil de sensibilité d'*Haemophilus influenzae*:**



Histogramme n° 18: profil de sensibilité d'*H.influenzae*

TROISIEME PARTIE :

RESULTATS ET

DISCUSSION

I-MATERIEL D'ETUDE

I.1- CADRE D'ETUDE

Ce travail a été réalisé à l'unité de bactériologie du laboratoire central d'analyse médicale du Centre Hospitalier Universitaire Hassan II de Fez. Cette étude s'est déroulée sur 4mois (de janvier en avril 2011) et s'est effectuée sur 37 prélèvements constitués de PDP et de fibroaspiration (FA) issus des services de réanimation (A1, A4, Réa Mère Enfant).

La conduite de l'examen bactériologique des prélèvements se fait comme suite :

- ❖ Premier jour : les examens macroscopique, microscopique (coloration Gram et la cytologie) et l'ensemencement des prélèvements sont réalisés.
A travers ces examens on a une idée sur la positivité du prélèvement afin de prévenir le service concerné sur le germe en question pour que le clinicien commence sa thérapie.
- ❖ Deuxième jour : on effectue un examen macroscopique de l'aspect de la culture, le dénombrement, l'isolement des colonies suspectes. Ceci sera suivi de l'identification des souches potentiellement responsables de l'infection en cours, et enfin l'antibiogramme sur les souches pathogènes.
- ❖ Troisième jour : on fait une lecture de l'antibiogramme.

I.2- MATERIEL

I.2.1.- Prélèvements

Les prélèvements retenus dans cette étude sont les PDP, FA et les LBA car sont caractéristiques des infections respiratoires basses nosocomiales. Ces prélèvements sont transportés immédiatement au laboratoire pour les analyses.

I.2.1.1- Examen direct

Il regroupe les examens macroscopique et microscopique. L'examen macroscopique consiste à apprécier l'aspect du prélèvement qui peut être muqueux, muco-purulent, purulent, hématique ou salivaire.

L'examen microscopique consiste à réaliser un examen après coloration au Gram pour déterminer la flore microbienne et faire une cytologie (dénombrement des cellules bronchiques, polynucléaires etc.)

a) Coloration Gram : Réaliser un frottis et le fixer à la flamme

- Verser le Violet de Gentiane sur la lame ; laisser en contact 1 minute
- Jeter le colorant et finir de la chasser par la solution de Lugol ; laisser agir le Lugol 1 min
- Jeter le Lugol et faire couler de l'alcool sur la préparation ; rincer immédiatement à l'eau
- Recouvrir la préparation de Safranine, laisser agir environ 1 min, laver abondamment.
- Sécher au dessus de la flamme d'un bec Bunsen.

Résultats : A l'issue de cette coloration, on peut distinguer : Des bactéries colorées en violet foncé ; elles ont gardé le violet, elles sont dites 'Gram positif' ; Des bactéries colorées en rose ou rouge pâle ; elles ont perdu le violet, elles sont dites 'gram négatif'.

- b) Examen à l'état frais : C'est l'examen microscopique de bactéries vivantes, entre lame et lamelle. Il permet de détecter la présence ou non de bactéries, d'apprécier leur mobilité (ou immobilité) et leur morphologie.

Les examens directs permettent d'avoir une idée sur le type de germe responsable de l'infection et aussi sur positivité du prélèvement (négatif ou positif) afin d'en informer les services concernés pour débiter le traitement en attendant les résultats des l'antibiogramme après 48H.

I.2.2.- Culture bactérienne

A partir des prélèvements reçus des dilutions 10^{-1} à 10^{-4} sont réalisées, seules les dilutions 10^{-2} à 10^{-4} serontensemencées respectivement dans les milieux PVX (gélose au chocolat), COS (gélose au sang), PVX. Par contre dans les milieux EMB, Chapman, on ensemence directement sans réaliser des dilutions.

I.2.2.1- Milieux de cultures utilisées

a) Gélose au sang (milieu COS)

Ce sont des milieux d'isolement qui facilitent la croissance des micro-organismes exigeants, des bactéries Gram (+) et de toutes les espèces rencontrées dans les prélèvements cliniques. Ces milieux contiennent des mélanges de peptones particulièrement adaptés à la culture des micro-organismes exigeants (streptocoques, staphylocoques...). La présence de sang permet l'expression de l'hémolyse qui est un critère de base de l'orientation de l'identification bactérienne. Exemple d'hémolyses caractéristiques *Streptococcus pneumoniae* : hémolyse- α ,

avec une coloration verdâtre autour de la colonie. Streptococcus pyogènes : hémolyse- β , avec une zone d'éclaircissement autour de la colonie ou sous la colonie

b) Gélose au chocolat PolyViteX (milieu PVX) :

La gélose Chocolat PolyViteX est un milieu d'isolement plus particulièrement destiné à la croissance des souches exigeantes appartenant aux genres Neisseria, Haemophilus, Streptococcus pneumoniae. Ce milieu est composé d'une base nutritive enrichie en facteurs X (hémine) et V (NAD) apportés par l'hémoglobine et le PolyViteX. Ce milieu peut être utilisé pour le repiquage des souches bactériennes afin d'obtenir des cultures pure.

c) Milieu EMB

La gélose Eosine bleu de méthylène est un milieu d'isolement sélectif destiné à la recherche des entérobactéries. Elle permet de différencier les germes fermentant le lactose et/ou le saccharose des germes non fermentatifs. La gélose Eosine bleu de méthylène est utilisée pour la mise en évidence des entérobactéries dans les selles, les urines ou autres prélèvements biologiques. Les germes lactose (+) et/ou saccharose (+) donnent des colonies violet foncé par acidification du milieu avec présence éventuelle d'un reflet métallique. Les germes non fermentatifs donnent des colonies incolores ou légèrement rosées. La présence de 2 colorants inhibe la croissance des bactéries Gram (+)

d) Milieu CHAPMAN

La gélose Chapman est un milieu destiné à l'isolement sélectif des staphylocoques à partir de prélèvements d'origine humaine. Les micro-organismes fermentant le mannitol donnent des colonies jaunes. Ce caractère est un critère d'orientation pour l'identification de Staphylococcus aureus. La teneur élevée en chlorure de sodium du milieu limite le développement de certains germes autres que Staphylococcus.

e) Milieu Mueller Hinton (MH)

La gélose Mueller Hinton est un milieu destiné à la réalisation d'antibiogrammes par diffusion. La composition de la gélose Mueller Hinton permet la croissance des bactéries non exigeantes (entérobactéries, bacilles Gram (-) non fermentant, staphylocoques et entérocoques) rencontrées en pathologie, tout en garantissant un minimum d'interférence des composants de la formule sur le résultat de l'antibiogramme. Sa concentration en ions divalents est ajustée afin d'assurer une meilleure précision pour déterminer la sensibilité des

Pseudomonas aux aminosides et aux tétracyclines. Sa faible teneur en thymine – thymidine (éléments inhibiteurs de l'activité des sulfamides) diminue les phénomènes de repousse autour des disques et permet une meilleure détermination des diamètres d'inhibition.

I.2.2.2- Antibiotiques utilisés

Les antibiotiques sont placés dans des distributeurs qui seront utilisés suivant le type de germes mis en évidence. Ainsi on distingue quatre distributeurs :

- Les distributeurs **DI** (constitué de **Bétalactamines**) et **DII** (constitué **d'Aminosides+Quinolones+divers**) sont utilisés pour les entérobactéries (*E.coli*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Serratia*, *Proteus*)
- Les distributeurs **DII** et **DIV** (constitué **Bétalactamines+divers**) pour les BGN non fermentaires (*P.aeruginosa*, *A.baumannii*)
- Les distributeurs **DI**, **DII**, **DIII** (constitué de **Bétalactamines+Glycopeptides+Macrolides+Tétracycline+divers**) pour les *staphylocoques*
- *Pneumocoque* : P, AMP, AML, AMC, OXA, CRO, CTX, GN500, OP (Optochine), My, VA, TEC, E, Spiramycine (SP), LVX, SXT.
- *Haemophilus influenzae* : P, AMP, AMC, AML, KF, CRO, CAZ, CTX, AK, GN, E, LVX, ac.nalidixique.

Distributeur 1	Distributeur 2
- Ampicilline AMP	- Amikacine AK
- Amoxicilline AML	- Kanamycine K
- Céfixime CFM	- Gentamycine GM
- Céfalotine KF	- Ciprofloxacine CIP
- Céfotaxime CTX	- Norfloxacine NOR
- Ceftriaxone CRO	- Colistine CT
- Ceftazidime CAZ	- Triméthoprime/sulfaméthoxazole SXT
- Imipénème IMP	- Tazocilline
Amoxicilline/ac. Clavulanique au centre	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Acide nalidixique au centre NAL ➤ Remplacer la tige de Gentamycine

AMC	par celle de Genta 500 si Streptocoque ou Entérocoque
-----	---

Tableau 15 : liste des ATB utilisés

Distributeur 3		Distributeur 4	
- Pénicilline G	P	- Ceftazidime	CAZ
- Céfoxitine	FOX	- Imipénème	IMP
- Oxacilline	OXA	- Aztréonam	ATM
- Vancomycine	VA	- Pipéracilline	PIP
- Teicoplamine	TEC	- Ticarcilline	TIC
- Erythromicyne	E	- Pipéracilline/tazobactam	TZP
- Acide fusidique	FA	- Ticarcilline/ac. Clavulanique	CLA
- Tétracycline	TET	- Fosfomycine	FOS
➤ Optochine au centre si <i>Streptococcus pneumoniae</i>			

Tableau 15 : liste des ATB utilisés (suite)

II. METHODE

Après 24h de culture sur les différents milieux cités ci-dessus, on effectue une identification biochimique des bactéries suspectes, un réisolement et un antibiogramme manuel ou automatique grâce à l'automate de phœnix qui permet une identification et un antibiogramme rapide. A la suite de leur mise en culture, les bactéries sont identifiées par les techniques suivantes : test biochimiques classiques, système API 20 E, API 20NE, API NH, système Slidex, système automatique : phœnix, en plus d'un logiciel apiweb servant à identifier les germes grâce aux résultats des galeries api.

II.1- IDENTIFICATION

➤ ENTEROBACTERIES

Les entérocoques à identifier sont *K.pneumoniae*, *E.coli*, *Enterobacter* (*cloacae* et *oxycytoca*), *Serratia*, *Proteus*.

II.1.1- Galeries classiques

Les identifications sont basées sur les caractères biochimiques suivants : utilisation du lactose, citrate, urée-indole, H₂S, mobilité etc. Ces test biochimiques permettent de vérifier si la bactérie a un métabolisme oxydatif ou fermentatif, s'il ya formation d'un acide suite à l'utilisation d'un hydrate de carbone (ex : glucose), si un composé particulier est utilisé comme seule source de carbone (ex : citrate), si un acide aminé peut être transformé (ex : tryptophane), si une enzyme particulière est présente (ex : oxydase, catalase) etc.

II.1.2- Galeries API 20^E

II.1.2.1- Principe

La galerie API 20 E, commercialisée par la société bioMérieux, est un système miniaturisé, prêt à l'emploi et standardisé. La galerie comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Au-dessous de chaque tube, un sigle indique la nature du test. Les tubes sont ensemencés avec une suspension bactérienne effectuée en eau physiologique. Les réactions produites au cours de la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (voir ci-dessous le tableau de lecture).

Un fond et un couvercle complètent la galerie sensu stricto et permettent de constituer une boîte d'incubation.

La galerie API 20 E permet d'effectuer les tests suivants : ONPG, ADH, LDC, ODC, citrate de Simmons (CIT), production d'hydrogène sulfuré par réduction du thiosulfate (H₂S), synthèse d'une uréase (URE), recherche d'une tryptophane désaminase (TDA), recherche du pouvoir indologène (IND), production d'acétoïne (VP), synthèse d'une gélatinase (GEL), recherche de l'acidification de neuf « glucides » : glucose (GLU), mannitol (MAN), inositol (INO), sorbitol (SOR), rhamnose (RHA), saccharose (SAC), mélibiose (MEL), amygdaline (AMY), et arabinose (ARA). La galerie permet également la recherche de la nitrate réductase qui se fait dans le microtube « GLU ».

II.1.2.2 Technique

Placer de l'eau dans les alvéoles présents dans le fond de la boîte afin de créer une atmosphère humide. Retirer la galerie de son emballage et la placer dans le fond de la boîte. Prélever à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée une colonie parfaitement isolée. Dissocier soigneusement la colonie dans une ampoule de « suspension Medium ». À l'aide d'une pipette munie d'une poire remplir les microtubes de la galerie. Au sein des microtubes, le fabriquant distingue deux parties, le tube et la cupule. Selon les tests, la suspension bactérienne doit être placée uniquement dans le tube ou dans le tube et la cupule. Lorsque le sigle du test est encadré, ce qui est le cas des tests CIT, VP et GEL, la suspension doit remplir le tube et la cupule. Lorsque le sigle du test est souligné (ADH, LDC, ODC, URE, H₂S), la suspension doit remplir uniquement le tube. Après ensemencement complet de la galerie, la cupule sera secondairement remplie d'huile de paraffine.

Lorsque le sigle du test n'est ni encadré ni souligné (ONPG, TDA, IND, GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA), la suspension doit remplir uniquement le tube.

II.1.2.3 Lecture

Sortir la boîte de l'étuve et noter sur la fiche de lecture les résultats obtenus pour les tests à lecture spontanée (voir ci-dessous le tableau de lecture).

Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs (voir ci-dessous le tableau de lecture) :

TDA : ajouter une goutte du réactif TDA

IND : ajouter une goutte du réactif de James

VP : ajouter une goutte du réactif VP 1 et une goutte du réactif VP 2

Nitrate réductase : après avoir noté le résultat obtenu pour l'acidification du glucose, ajouter une goutte du réactif NIT 1 et une goutte du réactif NIT 2. Si aucune coloration rouge n'est obtenue (attendre deux à trois minutes), ajouter une petite quantité de poudre de zinc.

Noter les résultats sur la fiche de lecture.

Calculer le profil numérique.

Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupe de trois (chaque groupe de trois tests est séparé du groupe voisin par un trait vertical). Chaque test donnant une réaction négative

prend la valeur 0. Lorsqu'un test est positif, il prend la valeur 1, 2 ou 4 selon sa position au sein d'un groupe de trois : si le premier test d'un groupe de trois est positif il est noté 1, si le deuxième test est positif il est noté 2 et si le dernier test d'un groupe de trois est positif il est noté 4. Le 21^{ème} test mentionné sur la fiche de résultat (OX), correspond à l'oxydase (test réalisé avant l'ensemencement de la galerie).

Pour chaque groupe de trois, additionner les chiffres correspondants. On obtient un nombre à sept chiffres qui constitue le profil numérique de la souche étudiée.

La recherche du profil numérique dans le « Catalogue analytique » commercialisé par le fabricant permet d'identifier la bactérie.

Tests*	Réactions	Composants actifs	Ajout de réactifs	Résultats	
				Négatif	Positif
ONPG	Bêta-galactosidase	2-nitrophényl-bêta-D-galactopyranoside	Non	Incolore	Jaune
ADH	Arginine dihydrolase	L-arginine	Non	Jaune	Orange ou rouge
LDC	Lysine décarboxylase	L-lysine	Non	Jaune	Orange ou rouge
ODC	Ornithine décarboxylase	L-ornithine	Non	Jaune	Orange ou rouge
CIT	Assimilation du citrate	Citrate trisodique	Non	Vert pâle ou jaune	Bleu-vert ou bleu
H2S	Thiosulfate réductase	Thiosulfate de sodium	Non	Incolore ou grisâtre	Dépôt noir
URE	Uréase	Urée	Non	Jaune	Orange ou rouge violacé
TDA	Tryptophane désaminase	L-tryptophane	TDA	Jaune	marron ou brun foncé
IND	Production d'indole	L-tryptophane	James	Incolore ou jaune	Rose ou rouge
VP	Production d'acétoïne	Pyruvate de sodium	VP1 VP2	Incolore	Rose ou rouge
GEL	Gélatinase	Gélatine de bœuf	Non	Non diffusion du charbon	Diffusion du charbon
GLU	Glucose	D-glucose	Non	Bleu ou bleu	Jaune

Tableau 16 : lecture de la galerie Api 20^E

				vert	
MAN	Mannitol	D-mannitol	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
INO	Inositol	Inositol	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
SOR	Sorbitol	D-sorbitol	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
RHA	Rhamnose	L-rhamnose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
SAC	Saccharose	D-saccharose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
MEL	Mélibiose	D-mélibiose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Amygdaline	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
ARA	Arabinose	L-arabinose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune

Tableau17 : lecture de la galerie API 20^E

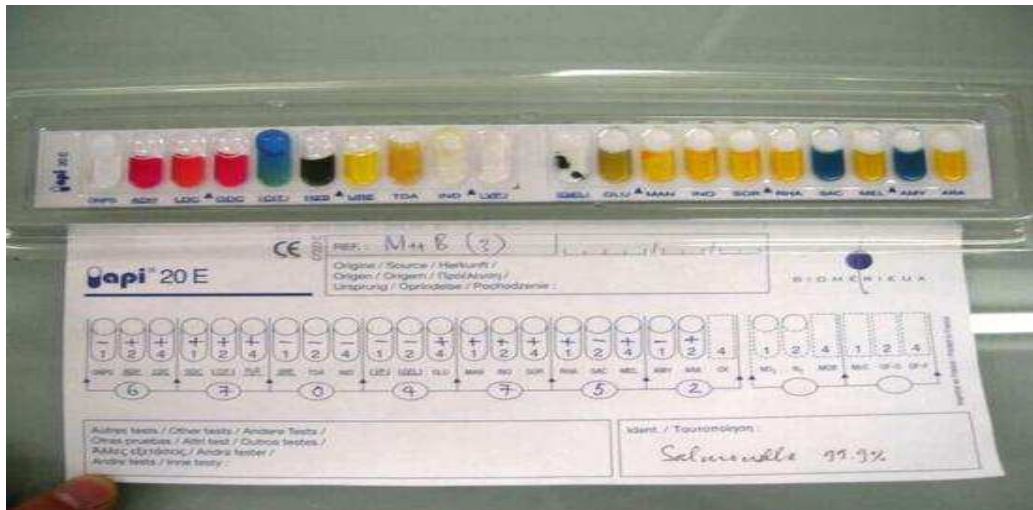


Fig.10 : galerie api 20^E

➤ NON ENTEROBACTERIES

II.1.3- Identification Pseudomonas aeruginosa, A.baumannii

(Galeries API 20NE)

Un test oxydase est réalisé au préalable : certaines espèces de bacilles à Gram négatif non entérobactéries qui sont oxydase négative (*S. maltophilia*, *Acinetobacter*...) sont parfaitement identifiées avec API 20 NE. On s'aidera du contexte clinique ou bactériologique pour utiliser cette galerie.

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : **la phénylène diamine oxydase** des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : **le N diméthyl paraphénylène diamine**. Ce dernier peut être sous deux formes : soit en solution, soit sous forme d'un disque pré-imprégné.

- Si la colonie prend une teinte rose, violette. Le germe possède une oxydase : le test est positif.

- Si la colonie reste incolore, le germe ne possède pas d'oxydase, le test est négatif

II.1.3.1- Principe de La galerie API 20 NE

La galerie API 20 NE se compose d'une galerie constituée de 20 microtubes contenant milieux et substrats sous forme déshydratée. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification

II.1.3.2- Technique

- Préparation de la galerie :

Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

- Préparation de l'inoculum :

Faire une suspension bactérienne, dans une ampoule de NaCl 0,85% Medium ou dans un tube d'eau distillée stérile, de turbidité égale à celle de l'étalon 0,5 Mcfarland.

- Inoculation de la galerie :

Remplir les tubes (et non les cupules) des tests NO₃ à PNPg avec la suspension précédente. Eviter la formation de bulles.

Transférer 200 µl (4 à 8 gouttes) de la suspension précédente, dans une ampoule AUX Medium. Homogénéiser.

Remplir les tubes et cupules des tests GLU à PAC.

Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests GLU, ADH, URE. Incuber 24 heures à 30°C.

II.1.3.3-Lecture

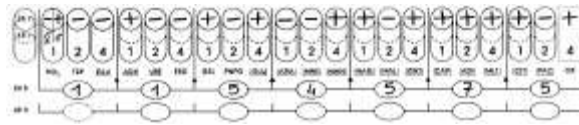
Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.

Réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs : voir tableau de résultats.

Identification :

- Avec le tableau d'identification : Comparer les réactions notées sur la fiche de résultats avec celle du tableau ;
- Avec le catalogue analytique : Les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1,2 ou 4) est indiquée pour chacun. Additionner à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs. On obtient un nombre 7 chiffres qui sert de code d'identification.
- Avec un logiciel d'identification apiweb.

Exemple de code attribué : 1 154 575 Pseudomonas aeruginosa



Tests	Substrat	Enzymes/Réactions	Résultats				
			Négatif	Positif			
NO ₃	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 mn				
		Réduction des nitrates en azote	Incolore	Rose-rouge			
TRP	Tryptophane	Formation d'indole	ZN / 5 mn				
			Rose	Incolore			
GLU	Glucose	Fermentation	TRP / 3-5 mn				
			Incolore	Goutte rouge			
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Bleu à vert	Jaune			
URE	Urée	Uréase	Jaune	Orange/rose/rouge			
ESC	Esculine	Hydrolyse	Jaune	Orange/rose/rouge			
GEL	Gélatine	Hydrolyse	Jaune	Gris/marron/noir			
PNPG	p-nitro-phényl-βD-galactopyranoside	B-galactosidase	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment noir			
GLU	Glucose	Assimilation	Incolore	Jaune			
ARA	Arabinose						
MNE	Mannose						
MAN	Mannitol						
NAG	N-acétyl-glucosamine						
MAL	Maltose						
GNT	Gluconate						
CAP	Caprate						
ADI	Adipate						
MLT	Malate						
CIT	Citate						
PAC	Phényl-acétate						
Ox	Tetraméthyl-p-phenylène diamine				Cytochrome oxydase	Transparence	Trouble
						Incolore	Violet

Tableau17 : lecture galerie API 20NE

II.1.4- Identification H.influenzae (Galerie API NH)

II.1.3.1- Principe

La galerie API NH se compose d'une galerie constituée de 10 microtubes contenant les substrats déshydratés pour réaliser 12 tests d'identification ainsi que la recherche d'une pénicillinase. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Après incubation, la lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

II.1.3.2- Technique

- Préparation de la galerie : Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.
- Préparation de l'inoculum : Faire une suspension bactérienne, dans une ampoule NaCl 0,85% Medium, d'opacité supérieure à celle de l'étalon 4 de Mcfarland.
- Inoculation de la galerie : Répartir la suspension précédente uniquement dans les tubes en évitant de faire des bulles.

Remplir uniquement la partie tube des sept premiers microtubes.

Remplir tube et cupule des trois derniers microtubes.

Recouvrir les sept premiers tests d'huile de paraffine. Incuber 2 heures à 37°C.

II.1.3.3- Lecture

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.

Réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs : voir tableau de résultats.

Tests	Substrat	Résultats	
		Négatif	Positif
PEN	Pénicillinase	Bleu	Jaune/vert
GLU	Glucose	Rouge/orange	Jaune/orange
FRU	Fructose		
MAL	Maltose		
SAC	Saccharose		
ODC	Ornithine décarboxylase	Jaune/vert/gris	Bleu
URE	Uréase	Jaune	Rose/violet
LIP	Lipase	Incolore/gris	Bleu
PAL	Phosphatase alcaline	Incolore	Jaune
βGAL	Beta Galactosidase	Incolore	Jaune
ProA	Proline Arylamidase	ZYM B / 3 mn	
GGT	Gamma glutamyl transférase	Jaune/orange	Orange
IND	Indole	James / 3 mn	
		Incolore	Rose

Tableau 18 : lecture de la galerie Api NH



Fig. 11 : lecture de la galerie Api HN

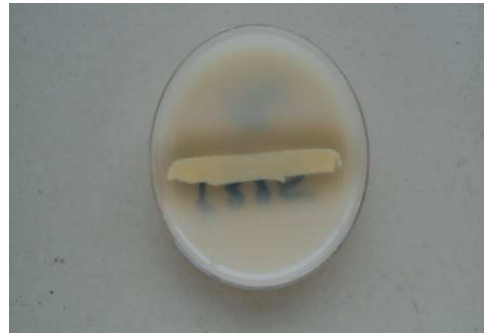
➤ COCCI GRAM POSITIF : *S.aureus* et *S.pneumoniae*

II.1.5- Identification de *staphylocoque aureus*

L'identification de *S.aureus* se fait par différents tests à savoir :

- **Test Dnase** : Certaines bactéries sont capables d'hydrolyser l'ADN (Acide DésoxyRibonucléique) grâce à une enzyme : l'ADNase. La recherche de l'ADNase consiste après culture de la souche à étudier sur un milieu solide contenant de l'ADN. Après 24h la révélation avec HCl, on observe un halot transparente autour de la culture bactérienne.

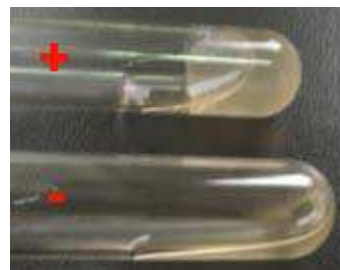
Fig.12 : Test Dnase



positif

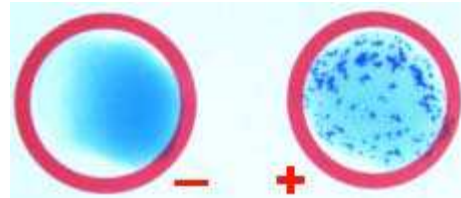
- **Test catalase** : La catalase est un caractère quasi-constant chez les staphylocoques. La mise en évidence de la catalase permet de distinguer parmi les cocci à Gram positif les staphylocoques (cat+) et les streptocoques (cat-). Il s'agit de mettre en contact une colonie de la bactérie à étudier en présence d'eau oxygénée (à 10 volumes). Une effervescence (dû à un dégagement de dioxygène) signe la présence d'une catalase.
- **Test coagulase** : Le test mettant en évidence l'aptitude des bactéries à coaguler le plasma est le principal test caractérisant *S. aureus*. Le test de détection consiste à incuber pendant 4 heures à 37°C un mélange de plasma de lapin et de la souche à tester. L'apparition d'un caillot est observée en inclinant le tube à 90°C. Le test de la coagulase permet l'identification de 99% des souches de *S. aureus* mais certaines souches ne produisent pas de coagulase. L'identification de l'espèce est dans ce cas réalisée par d'autres tests.

Fig.13 : Test coagulase



- **Tests d'agglutination (Slidex) :** Plusieurs tests d'agglutination détectant un ou plusieurs antigènes ou récepteurs de surface (récepteur pour le fibrinogène, protéine A, antigènes capsulaires) sont commercialisés. En pratique, il est recommandé d'utiliser deux tests pour l'identification de *S. aureus* : la détection de la coagulase et un test d'agglutination.

Fig.14 : Tes d'agglutination (Slidex)



- **Identification biochimique :** La détermination de l'espèce peut être réalisée à l'aide de galeries biochimiques d'identification Api staphe. Ces systèmes utilisent des tests d'acidification ou d'assimilation des sucres et des tests enzymatiques.

II.1.6- Identification *streptocoque pneumoniae*

La distinction se fait par ensemencement du milieu Bile-Esculine, les Entérocoques (+) et les streptocoques (-).

Le caractère hémolytique et le groupage des colonies de streptocoques nous permettent de différencier *S.pneumoniae* (**Alpha-hémolytique** : hémolyse incomplète, **nom groupable**) des autres streptocoques.

-groupage : SLIDEX STREPTO PLUS est un test d'agglutination pour l'identification des streptocoques des groupes A, B, C, D, F et G selon la classification de Lancefield. C'est un test rapide d'agglutination direct sur colonies après une simple extraction enzymatique. Ce produit utilise des microparticules de latex bleues sensibilisées par des anticorps spécifiques dirigés contre les antigènes de groupe.

II.2- Identification et antibiogramme automatique (phœnix)

L'automatisation de l'antibiogramme a commencé il y a une trentaine d'années. Les bénéfices perçus sont surtout :

- * la productivité ;
- * la rapidité des résultats ;
- * la grande standardisation du test :

- les réactifs sont préparés industriellement ;
- la lecture et interprétation sont automatisées

Ils utilisent des micro-galeries constituées de plusieurs cupules dans lesquelles sont placés plusieurs ATB. L'automatisation de l'antibiogramme nécessite la pureté de la souche et la standardisation de l'inoculum ;

- seule la préparation de l'inoculum est manuelle et aidée par un instrument de mesure :

A partir des cultures de 24h, on réalise les inocula à partir de la solution physiologique contenu dans le kit, et de quelques colonies de la bactérie suspecte. On mesure ainsi le D.O pouvant aller de 0,25 à 0,5. Chaque tablette de phœnix est constituée de deux partie l'une à gauche sert à l'identification de la bactérie l'autre à droite pour l'antibiogramme (voir photo ci-dessous). Les inocula sont versés dans la tablette tout en évitant la contamination et la formation de bulles d'air, enfin on place les tablettes dans automate sans oublier de marquer le numéro et le type de prélèvement.



Fig. 15 : préparation de l'inoculum et réalisation du phœnix

II.3- Utilisation de logiciel d'identification apiweb

Ce logiciel nous permet d'identifier la bactérie grâce aux résultats des galeries Api. Il suffit de faire entrer les résultats (+ ou -) de chaque test biochimique (exemple ONPG+, ADH- ...) pour qu'on ait l'identification exacte de la bactérie.

II.4- Antibiogramme manuel ou standard

La technique des disques consiste à utiliser des disques de papier imprégnés de différents antibiotiques à tester. Les disques sont déposés à la surface d'une gélose(MH) uniformément ensemencé avec une suspension de la bactérie à étudier.

On observe autour des disques une zone circulaire indemne de colonies : zone d'inhibition.

En pratique, on réalise à partir de l'isolement (souche pure) un ensemencement en tapis soit par écouvillonnage ou par inondation. On dispose ensuite les disques d'antibiotiques et on place à l'incubateur. Au bout de 24 h, on lit les différents diamètres d'inhibition et on peut conclure en comparant ceux-ci aux abaques de lecture de la CASFM.

La culture bactérienne s'arrête lorsqu'elle rencontre une concentration égale à sa CMI. La mesure du diamètre d'inhibition reflète donc la valeur de la CMI de l'antibiotique.



Fig. : Antibiogramme en méthode des disques

III. RESULTATS

Notre étude s'est portée sur 37 prélèvements constitués de PDP et de fibroaspiration (FA) issus des services de réanimation (A1, A4, Réa Mère Enfant).

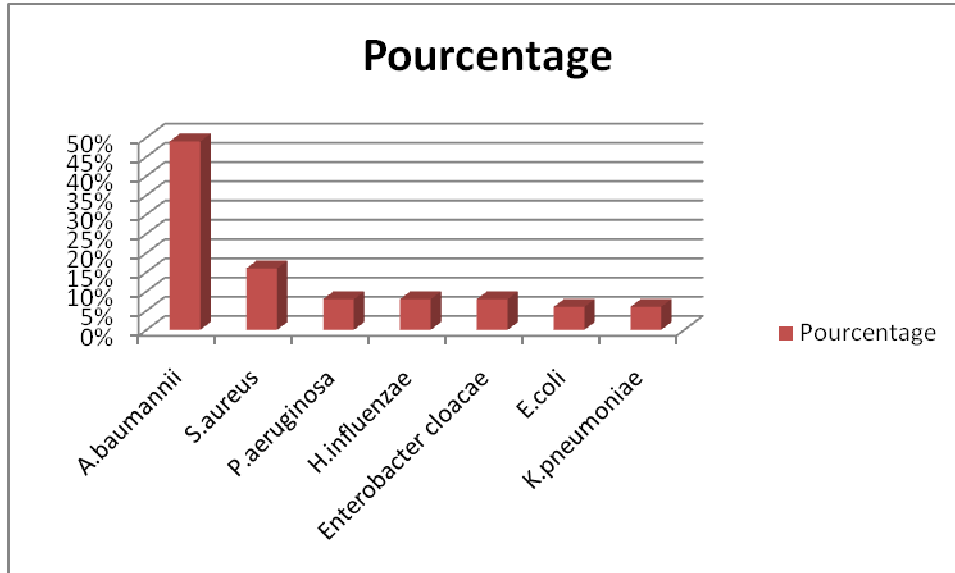
III.1- souches bactériennes isolées

Les souches bactériennes isolées ainsi que leur répartition sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Bactéries	Nombre	Pourcentage
<i>A.baumannii</i>	25	49%
<i>S.aureus</i>	8	16%
<i>P.aeruginosa</i>	4	8%
<i>H.influenzae</i>	4	8%
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	8%
<i>E.coli</i>	3	6%
<i>K.pneumoniae</i>	3	6%

Total	51	100%
-------	----	------

Tableau 19 : répartition des germes isolés



Histogramme n°19 : répartition des germes isolés

L'*A.baumannii* prend la première place face aux *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *H.influenzae* et les autres, elle a su garder sa place au cours de ses deux dernières années si l'on se réfère aux études rétrospectives faites ci-dessus.

III.2- Identification des bactéries

Les identifications par les différentes méthodes (automatique ou standard) ont donné de bons résultats et surtout le phoenix car il identifie la bactérie avec des probabilités d'identification allant jusqu'à 99,99%. Nous avons aussi pris en compte les résultats des galeries API pour les différentes bactéries isolées.

III. 3-Résultat des profils de sensibilité des souches bactériennes isolées

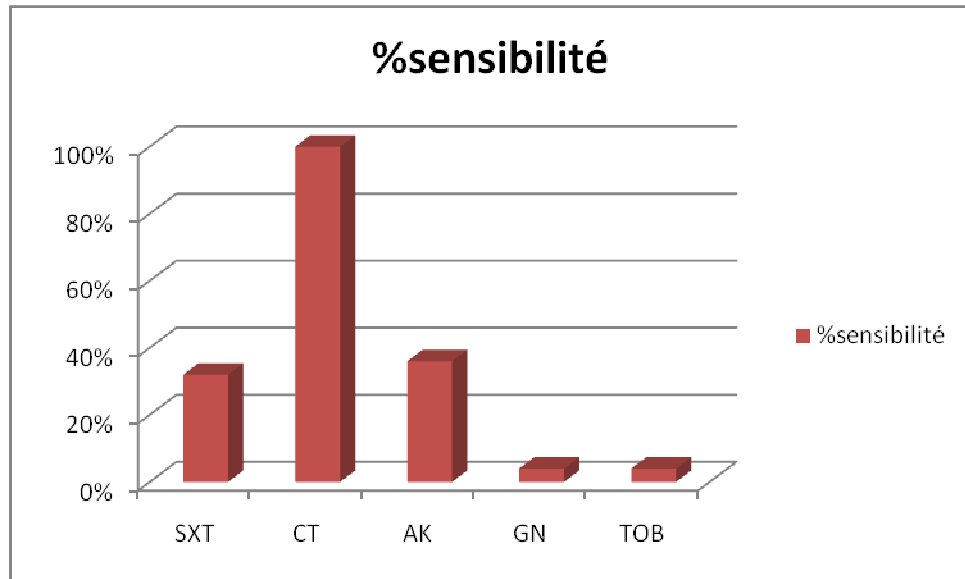
Pour déterminer le profil de sensibilité aux ATB, on mesure le diamètre d'inhibition puis on se réfère au tableau ci-dessous :

Antibiotiques	Diamètres critiques (mm)	Diamètres critiques (mm)
	S	R
PENICILLINES		
Pénicilline G	≥ 29	< 18
Ampicilline	≥ 21	< 16

Amoxicilline	≥ 23	< 16
Amoxicilline/ac. clavulanique	≥ 23	< 16
Ticarcilline	≥ 24	< 22
Pipéracilline	≥ 22	< 18
CARBAPENEMES		
Imipénème	≥ 24	< 17
MONOBACTAME		
Aztréonam	≥ 23	< 21
CEPHALOSPORINES (Voie parentérale)		
Céfotaxime	≥ 26	< 23
Ceftriaxone	≥ 26	< 23
Ceftazidime	≥ 21	< 19
AMINOSIDES		
Gentamicine :		
- streptocoques ,entérocoques	≥ 17	< 11
- autres bactéries	≥ 18	< 16
Tobramycine	≥ 18	< 16
Amikacine	≥ 17	< 15
TETRACYCLINES		
Tétracycline	≥ 19	< 17
Doxycycline	≥ 19	< 17
MACROLIDES		
Erythromycine	≥ 22	< 17
LINCOSAMIDES		
Lincomycine	≥ 21	< 17
LINCOSAMIDES		
Lincomycine	≥ 21	< 17
GLYCOPEPTIDES		
Teicoplanine	≥ 17	-
Vancomycine	≥ 17	-
POLYPEPTIDES		
Colistine	≥ 15	< 15
SULFAMIDES-TRIMETHOPRIME		
Triméthoprim/sulfaméthoxazole	≥ 16	< 10
FLUOROQUINOLONES		
Ciprofloxacine	≥ 25	< 22
Lévofloxacine	≥ 20	< 17
Norfloxacine	≥ 25	< 22
Ofloxacine	≥ 25	< 22

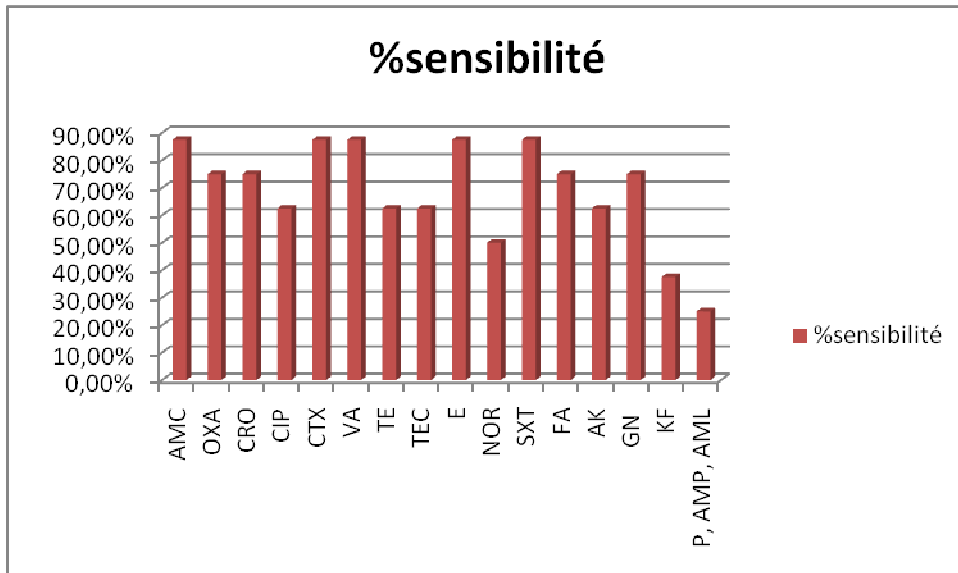
Tableau 20 : diamètre critiques d'inhibition selon CSAFM 2009

❖ **Profil de sensibilité d'*A.baumannii***



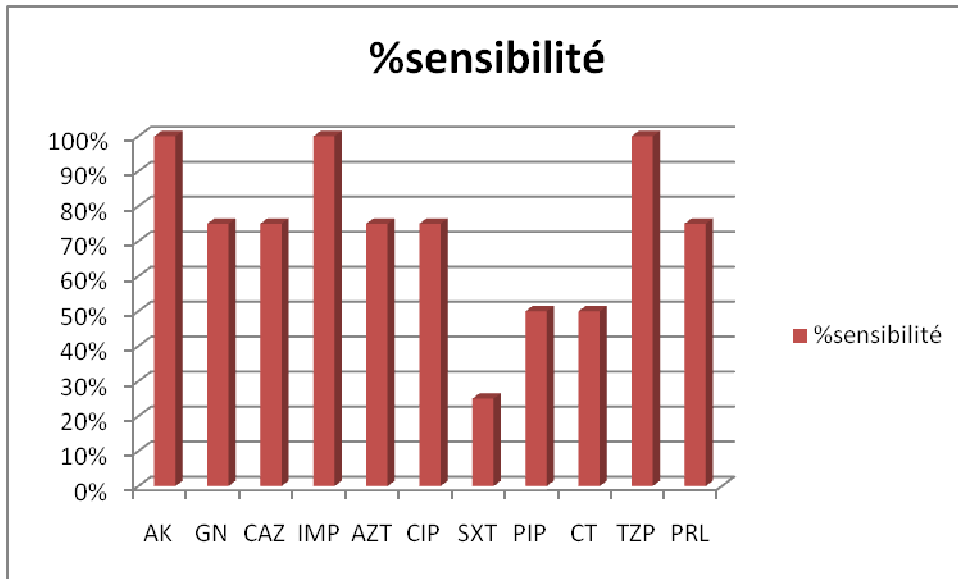
Histogramme n°20 : Profil de sensibilité d'*A.baumannii*

❖ **Profil de sensibilité de *S.aureus***



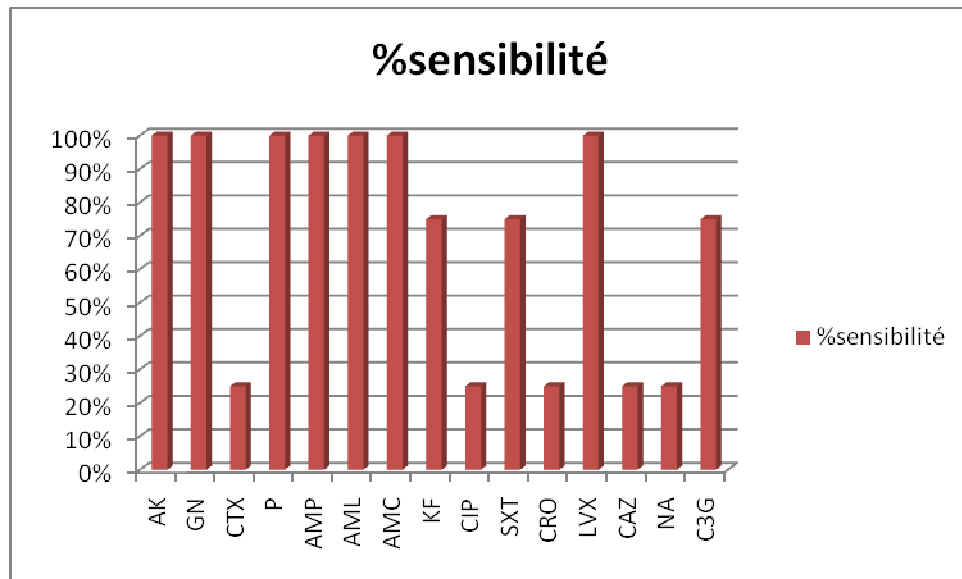
Histogramme n°21 : Profil de sensibilité d'*S.aureus*

❖ Profil de sensibilité de *P.aeruginosa*



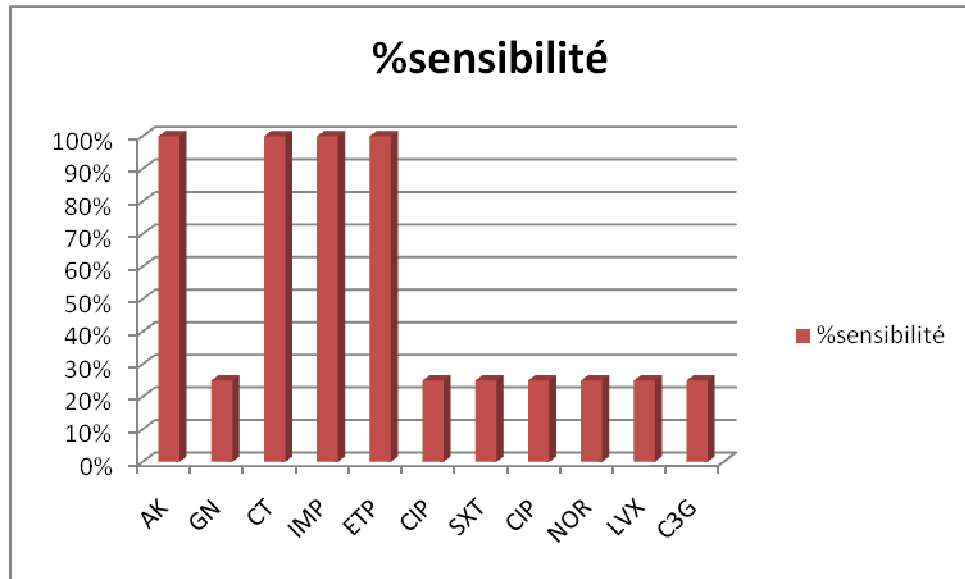
Histogramme n°22 : Profil de sensibilité de *P.aeruginosa*

❖ Profil de sensibilité d'*H.influenzae*



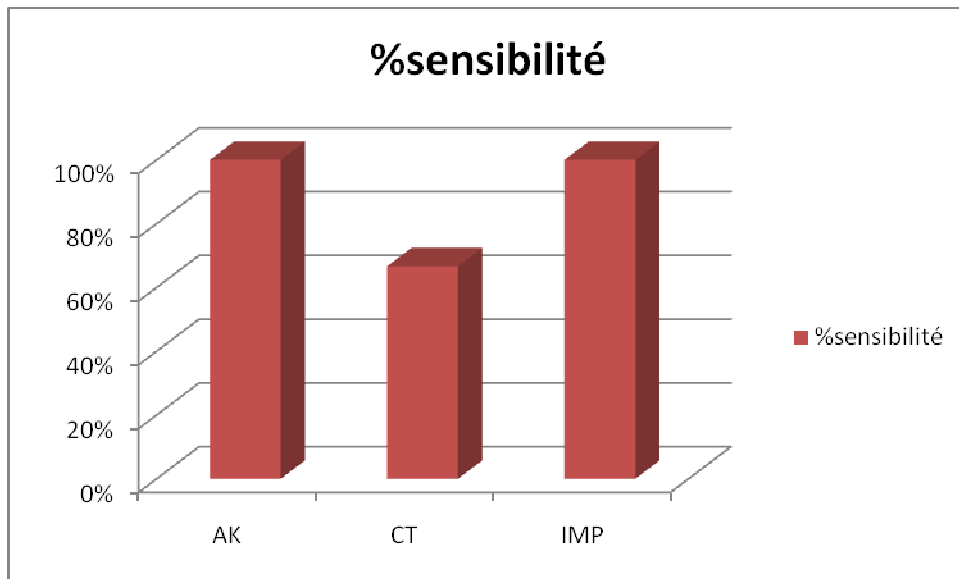
Histogramme n°23 : Profil de sensibilité d'*H.influenzae*

❖ **Profil de sensibilité d'*Enterobacter cloacae***



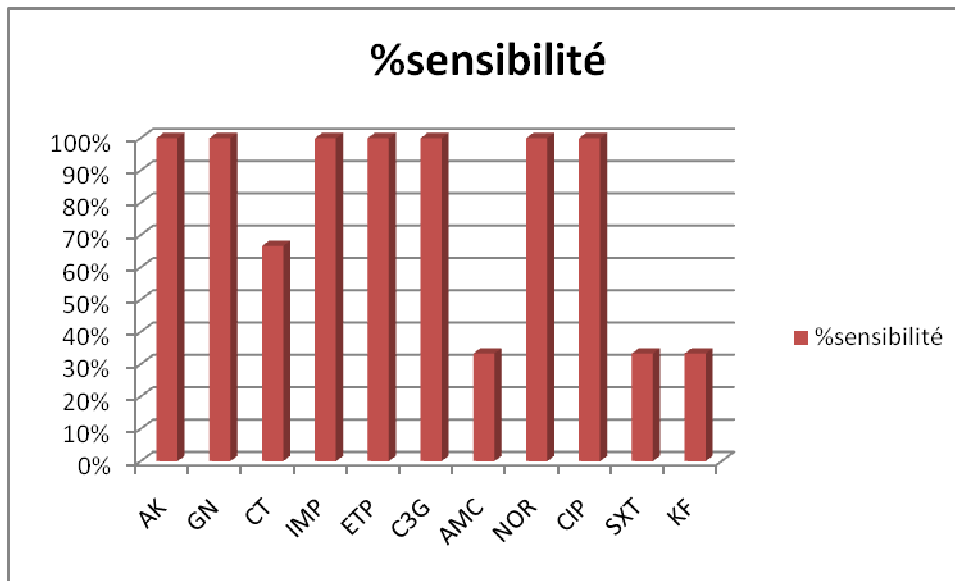
Histogramme n°24 : Profil de sensibilité d'*Enterobacter cloacae*

❖ **Profil de sensibilité d'*E.coli***



Histogramme n°25 : Profil de sensibilité d'*E.coli*

❖ Profil de sensibilité *K.pneumoniae*



Histogramme n°26 : Profil de sensibilité de *K.pneumoniae*

IV. DISCUSSION

IV.1- La répartition des germes isolés

Au cours des années allant de 2004 à 2007, on a observé la répartition suivante des germes par ordre décroissant *P.aeruginosa* ou *A.baumannii* en première place suivi de *S.aureus* toujours en troisième position au cours des quatre années d'études, vient alors *K.pneumoniae* et *E.coli* ou *Streptocoque pneumoniae*.

Ce n'est qu'en 2010 et 2011 dans notre étude qu'on remarque l'arrivée d'*H.influenzae* et *Enterobacter cloacae* en quatrième position à la place de *K.pneumoniae*. Mais l'ordre *A.baumannii*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, est resté maintenu comme observé de 2004 à 2007 sauf que dans notre cas d'étude *A.baumannii* occupe la première place suivi de *S.aureus*, et *P.aeruginosa*. la remarque à faire c'est la place importante qu'occupe *A.baumannii* environ 49% dans les 37 prélèvements reçus ce qui équivaut à 1 *A.baumannii*/prélèvement. Ce résultat est à redouté car *A.baumannii* est un germe très résistant. Lors de l'étude du profil de sensibilité on remarque qu'il est sensible aux ATB suivants AK, CT, SXT à presque 90% par rapport aux autres ATB.

A.baumannii est un germe qui est présent dans l'environnement et commensal des muqueuses de l'homme. Depuis quelques années, ce germe est considéré comme un pathogène opportuniste responsable d'un taux croissant d'IN sévères. Plusieurs épidémies

dues à cette bactérie ont été répertoriées, touchant principalement les patients immunodéprimés, sous une antibiothérapie et exposés à des séjours prolongés. [49]

De nombreuses études ont rapportées la prédominance de ces infections dans les services de réanimation. La capacité de survie dans des conditions rudimentaires, la résistance naturelle et la grande diversité des plasmides confèrent à la bactérie un potentiel d'acquisition des résistances.

Une étude rétrospective a été réalisée de janvier 2003 à décembre 2005 au laboratoire de microbiologie du CHU Ibn Rochd à Casablanca. [49] Durant la période des études, 754 souches d'*A.baumannii* ont été répertoriées. Plus de la moitié des souches ont été isolées dans les services de réanimation (50,53%).

Les principaux facteurs de risque de l'infection à *A.baumannii*, retrouvés au niveau de ces services de réanimation sont:

- *L'antibiothérapie : 98%
- *La ventilation mécanique : 95%
- *L'âge avancé : 72%
- *Le séjour prolongé : 65%
- *Les traumatismes multiples : 47%

Dans notre cas d'étude les *S. aureus* occupe la deuxième place avec 15,69% dans l'ensemble des germes isolés. A noter que seul 1 *S. aureus* parmi 8 souches isolées est Méti R (SARM). Le SARM l'un des principaux germes responsables d'IN épidémiques au niveau international. Cette situation endémique est surtout préoccupante dans les unités de réanimation où la transmission interpatients est facilitée par de nombreux facteurs.

L'hospitalisation prolongée de certains de ces patients après leur séjour en réanimation fait jouer à ce service un rôle de plaque tournante dans la diffusion du SARM à l'hôpital. [50].

P.aeruginosa occupant la troisième place avec *H.influenzae* et *Enterobacter cloacae* est une bactérie nosocomiale qui cumule de nombreux mécanismes de résistance aux ATB. En milieu hospitalier, les conditions de réanimation des patients, soumis à des gestes invasifs multiples et dont les défenses immunitaires sont altérées, favorisent le déclenchement d'infections patentes à cette bactérie opportuniste, dont la mortalité est très élevée. Cette gravité est liée en grande partie à la résistance aux ATB de cette espèce, laissant au clinicien un choix limité d'ATB efficaces. [51]

Quand aux entérobactéries productrices de Bêtalactamases, trois d'entre eux ont été isolées à savoir *Enterobacter cloacae*, *K.pneumoniae* et *E.coli* mais ils occupent troisième et quatrième place après *H.influenzae*. Les ESBSE sont parmi les principales bactéries multirésistantes (BMR).

Sur le plan international, la maîtrise de la diffusion des BMR constitue depuis une dizaine d'années une priorité dans la politique de lutte contre les IN. En fait, il existe 2 grands mécanismes participant à la dissémination des BMR [52] :

- D'une part la sélection de germes résistants parmi les bactéries de la propre flore du patient sous la pression des ATB et la diffusion des gènes de résistance entre les bactéries par l'intermédiaire de terminants mobiles (plasmides, transposons).
- D'autre part la diffusion des BMR à partir des patients infectés ou colonisés (réservoir) et par l'intermédiaire des mains des différentes personnes impliquées dans les soins.

L'émergence d'*H.influenzae* dans les infections respiratoires basses doit faire l'objet d'une étude afin de déterminer les facteurs d'apparitions.

IV.2- sensibilité et résistance des germes isolés

- Profil de sensibilité et de résistance d'*A.baumannii*

Au cours des études rétrospectives réalisées de 2004 à 2007, on remarque une sensibilité très importante du germe à l'Amikacine, à la Colistine et à la Tobramycine à environ 75% et à 50% pour la Ceftazidime quant aux Gentamycine, Imipénème et à l'association (SXT) Sulfaméthoxazole+triméthoprim, est sensible qu'à 25%.

La sensibilité à la Colistine ne cesse d'augmenter jusqu'à 90% en 2010, suivent alors l'Amikacine et l'Imipénème à 50% et la SXT.

Dans notre étude, les résultats obtenus ne font que confirmer les études rétrospectives et aussi les études bibliographiques. L'*A.baumannii* devient de plus en plus sensible à la Colistine à 90% ou plus, sa sensibilité à l'Amikacine et à la SXT est restée toujours maintenue à environ 50%. Mais on note que sa sensibilité à la Gentamycine et à la Tobramycine diminue au fil des années, la sensibilité d'*A.baumannii* pour l'Imipénème a complètement disparue.

Pour les bêtalactamines le principal mécanisme de résistance est la production à un niveau élevé de la céphalosporinase naturelle par l'*A.baumannii*. Ceci explique que certaines souches soient alors résistantes aux C3G.

Les bêtalactamases à spectre large entraînent un phénomène de résistance *in vivo* en fait assez similaire à celui observé depuis plus de 20 ans chez les entérobactéries. Il s'agit d'une résistance à toutes les bêtalactamines sauf aux carbapénèmes.

Certaines souches d'*A.baumannii* peuvent être également résistantes aux carbapénèmes. Ce niveau de résistance est assez variable. Cependant, plusieurs études montrent une nette tendance à l'augmentation de la résistance aux carbapénèmes dans cette espèce bactérienne résultant de plusieurs mécanismes additionnels.

La résistance aux fluoroquinolones qui est fréquente dans cette bactérie et de prévalence croissante est le fait souvent d'une association de mécanismes de résistances comme ceci est souvent le cas chez les BGN.

- Profil de sensibilité et de résistance de *S.aureus*

De 2004 à 2007 *S.aureus* présente un profil de sensibilité assez important pour les quinolones, Amoxicilline+Ac.clavulanique (AMC), Pénicilline G et Gentamycine (GN) et aussi à l'acide fusidique (FA) et à la SXT. Par contre en 2010, la sensibilité à l'Amikacine (AK), à la Ceftriaxone (CRO), Gentamycine, Vancomycine (VA), Teicoplanine (TEC), Céfotaxime (CTX), SXT et la Tétracycline (TE) reste importante à noter puisque plusieurs ATB non recensés de 2004 à 2007 font leur apparition dans la sensibilité de *S.aureus*. En 2011, la remarque reste la même, *S.aureus* est toujours sensible aux ATB cités ci-dessus mais cette fois-ci la sensibilité à l'AMC est plus importante, survient alors une sensibilité à l'Oxacilline (OXA). On en déduit alors que *S.aureus* est un germe plutôt sensible aux glycopeptides et à certains bêtalactamines (AMC, OXA, CTX, CRO) et aminosides. Mais lorsque *S.aureus* devient Méti-R on peut observer le phénomène inverse, il peut devenir résistant aux ATB cités ci-dessus. La résistance à la méticilline traduit la présence d'une cible des bêtalactamines nouvelle et insensible à ces ATB : la protéine de liaison aux pénicillines PLP2a, codée par le gène *mec A*.

Bien qu'il existe une résistance croisée entre les bêtalactamines, certaines d'entre elles conservent une certaine affinité pour la PLP2a, ce qui explique que les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de certains ATB de cette famille soient plus basses que celles de l'oxacilline, l'association amoxicilline-acide clavulanique ou l'imipénème.

Au total, on continue à considérer que la résistance due à l'acquisition de PLP2a reste une résistance croisée entre les bêtalactamines. Il faut signaler que la sécrétion de pénicillinases est présente chez 70 à 90% des *S.aureus*. Lorsque le laboratoire de bactériologie signale une résistance à la pénicilline (sans résistance à la méticilline), celle-ci implique aussi une résistance à l'ampicilline, l'amoxicilline, la ticarcilline et à la pipéracilline. En revanche, les

pénicillines associées à un inhibiteur de pénicillinase (acide clavulanique, sulbactam ou tazobactam) ou les bêtalactamines insensibles aux pénicillinases (céphalosporines, imipénème) restent actives. Fait important en pratique, les C3G (céfotaxime, ceftriaxone) sont 10 fois moins actives que la méticilline sur le staphylocoque, ce qui rend leur utilisation illogique en dehors des cas d'infections mixtes.[53]

- Profil de sensibilité et de résistance de *P.aeruginosa*

Durant toutes les études réalisées ces dernières *P.aeruginosa* reste toujours sensible à l'Imipénème. En 2010 et 2011 la sensibilité à l'Amikacine, à l'Imipénème et à la Colistine reste frappante. Ensuite survient la sensibilité aux quinolones, Tobramycine, C3G, de 2004 à 2007. De nouvelles sensibilités sont remarquées face aux Piperacilline/tazobactam (TZP), Gentamycine (GN), Ceftazidime (CAZ) et la Ciprofloxacine (CIP).

P.aeruginosa est une bactérie nosocomiale qui cumule de nombreux mécanismes de résistance aux ATB. En milieu hospitalier, les conditions de réanimation des patients, soumis à des gestes invasifs multiples et dont les défenses immunitaires sont altérées, favorisent le déclenchement d'infections patentes à cette bactérie opportuniste, dont la mortalité est très élevée. Cette gravité est liée en grande partie à la résistance aux ATB de cette espèce, laissant au clinicien un choix limité d'ATB efficaces. [51]

Ce germe est naturellement résistant à de nombreux ATB par trois mécanismes principaux : la faible perméabilité pariétale, l'inactivation enzymatique et les systèmes de pompes à efflux actif.

Les différentes résistances notées ici sont celle à la Ticarcilline+tazobactam (TIM), à la Ticarcilline (TIC), SXT et parfois à la CIP.

- Profil de sensibilité et de résistance d'*H.influenzae*

Puisqu'il apparaît dans les premiers rangs des IRN qu'à partir de 2010, *H.influenzae* montre une sensibilité très importante à la Pénicilline G, l'Amikacine, l'AMC, l'AMP, l'AML et faible par rapport à la Norfloxacine, Levofloxacine, Céfaloine, SXT, et aux C3G.

Il est très résistant à l'Erythromycine (E) à 100% dans notre étude, et faiblement résistant à la SXT, lincomycine, vancomycine et à l'acide fusidique.

- Profil de sensibilité et de résistance des Entérobactéries (*E.coli*, *K.pneumoniae* et *Ent.cloacae*)

Les entérobactéries sont en général sensibles à certaines Bêtalactamines, quinolones mais la sensibilité au Colistine (CT), Levofloxacine et au SXT sont faibles.

Ceci se confirme avec les souches d'E.coli testées ces dernières années, elles sont sensibles à l'IMP à 95%, l'AK à 90% et à la CT à 60% environ. K.pneumoniae est aussi sensible au AK, GN, IMP, ERT, C3G, et aux quinolones (CIP, NOR) et faiblement sensible à la Colistine. Quand à l'Enterobacter cloacae présente le même profil que K.pneumoniae. La résistance aux Pénicilline A à savoir AMP, AML et AMC, au Céfalotine pour Enterobacter cloacae. Mais lorsque ces entérobactéries deviennent résistances aux Bêtalactamines, on les appelle entérobactéries BLSE.

Les EBLSE sont parmi les principales bactéries multirésistantes (BMR). Les bêtalactamases ont une structure proche des enzymes impliquées dans la synthèse du peptidoglycane de la bactérie. Le mode d'action des bêtalactamines sur une bactérie sensible consiste à entraîner une erreur des peptidases aboutissant à un défaut de synthèse du peptidoglycane, ce qui provoque la mort bactérienne. Pour éviter que les peptidases ne se « trompent », la bactérie synthétise une bêtalactamase qui va hydrolyser le cycle bêtalactame. Son ouverture va empêcher sa reconnaissance par la peptidase et donc la synthèse du peptidoglycane est possible : la multiplication bactérienne n'est alors pas affectée. De très nombreuses bêtalactamases ont été identifiées dans presque toutes les souches bactériennes et certaines de ces enzymes montrent des capacités d'adaptation remarquables à de nombreux substrats. [54]

V. CONCLUSION

Les infections respiratoires nosocomiales constituent un problème majeur de la santé publique, surtout au niveau des services de réanimation vu que ces services hébergent des malades « fragiles » : âgés, immunodéprimés, présentant des défaillances viscérales... Cette étude nous a permis de recenser les germes responsables des infections respiratoires nosocomiales au sein des services de réanimation afin d'en étudier les profils de sensibilité aux différents ATB utilisés dans ces services. Grace aux études rétrospectives réalisées on observe leur évolution dans les infections, ceci pourra être le point de départ pour de nouvelles perspectives de recherches génétiques sur les mécanismes d'adaptation de ces bactéries. De nouvelles perspectives peuvent être citées à savoir la mise en œuvre de nouvelles techniques de diagnostique ou d'identification rapide comme les nouvelles

techniques de biotechnologie microbiennes : identification rapide grâce aux méthodes de la PCR.

Des enquêtes de prévalence doivent être menées, malgré certaines limites, elles ont l'avantage de produire des données épidémiologiques et permettent de mesurer le risque infectieux nosocomial que ce soit au niveau d'un établissement ou à une plus grande échelle. La répétition de ces enquêtes de prévalence à intervalle régulier, permet de mesurer les tendances séculaires et d'évaluer ainsi l'impact global d'une politique de prévention, à condition de prendre en compte les indicateurs de risque des patients.

VI. BIBLIOGRAPHIE

1. ALGARET X., MORITIER E.

Maladies infectieuses
Ed ESM 1994 243 1-19

2. MEDECINE TROPICALE

www.medicinetropicale.free.fr/cours/infrespi.htm

3. NAUCIEL C.

Bactériologie médicale
Ed. Masson Paris 5 275 : 83-233

4. CHOUAID C.-

Pathologie infectieuse et parasitaire.
Dans : HOUSSET B.
Abrégé de Pneumologie, 1999, 6 : 168-177.

5. BROWN P. D., LERNER S. A.-

Community-acquired pneumonia.

Lancet, 1998, 352:1295-1302.

6. CHIDIAC C.-

Révision de la IV^e conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse de la société de pathologie infectieuse de langue française (SPILF)

Méd. Mal. Infect., 2001, 31 : 269-301.

7. DENIS F., DABERNATH, MONTEIL H. AVRIL J. L.

Bactériologie clinique

Edition marketing, Paris, 1998; 144-145.

8. FARMER *Enterobacteriaceae*: Introduction and identification

In : Manual of clinical Microbiology, P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Tenover, Tenover F.C. and R.H. Tenover (eds)

7th ed. American Society for Microbiology, Washington DC, 1999:442-458.

9. PERRIERE G. Application d'une présentation par objet des connaissances de modélisation certains aspects de l'expression des gènes chez *E. coli* UCBL.

Thèse Université de Lyon I, France. (1992) : 14, 77.

10. Article de Wikipedia *Entérobacteriaceae* :

« <http://fr.wikipedia.org/wiki/Enterobacteriaceae> ».

11. AVRIL. J. MONTEIL. H, DOBERNAT.H, DENIS. F.

Bactériologie clinique.

Edition ELLIPSE: 171, 172, 175, 208, 294, 295

12. DRAME B.

Microméthode d'identification et d'étude de la sensibilité des entérobactéries : Intérêts thérapeutiques.

Thèse Pharm., Dakar, 2001 ; n° 86.

13. BAKHOUM I. Contrôle qualité et validation de différentes microméthodes d'identification bactérienne. *Thèse Pharm., 2004.N°8*

14. BOSSERT I. D., YOUNG L.Y.

Anaerobic oxidation of paracresol by a denitrifying bacterium.

Applied and environmental Microbiology 1986, 52 (5) : 1117-1122.

15.DRAME B.

Microméthode d'identification et d'étude de la sensibilité des entérobactéries : Intérêts thérapeutiques. *Thèse Pharm., Dakar, 2001 ; n° 86.*

16.LE MINOR L., VERON N. Bactériologie Médicale

Flam Med. Science, Paris, 1989 : 318-333 ; 773-823

17.NDOYE R.

Algorithme d'identification des Entérobactéries et des bacilles gram négatifs non fermentaires. *Thèse Pharm., 2004 ; n° 83*

18.BAKHOUM I. Contrôle qualité et validation de différentes microméthodes d'identification bactérienne.

19.DRAME B. Microméthode d'identification et d'étude de la sensibilité des entérobactéries : Intérêts thérapeutiques.

Thèse Pharm., Dakar, 2001 ; n° 86.

20.FERRON A. Bactériologie médicale

Editions C. et R. 1984;(3, 14, 15):3-2- 15-6.

21.PILET C., BOURDON J. L., TOMA B., MARCHAL N.,

BALBASTRE C. Les entérobactéries Bactériologie médicale et vétérinaire : Systématique bactérienne. *Doins Paris 2é édition 1979 : 109-187.*

22.LE MINOR L., VERON M. Bactériologie Médicale

Flam. Méd. Science, Paris, 1984 : 392 – 394.

23.1API 20 E

Système d'identification des entérobactéries
Bio Mérieux S. A. France, 2002.

24.BAKHOUM I. Contrôle qualité et validation de différentes microméthodes d'identification bactérienne.

25.FARMER Biochemical identification of new species and bio group of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens

J. clin. Microbiol 1985, 21 : 46-76

- 26. JANDA J. M. and ABBOTT S. L** Historical perspectives on the family Enterobacteriaceae
Lippin Cott Raven Publishers, Philadelphia 1998, 1-7.
- 27. LE MINOR L., VERON M.** Bactériologie Médicale
Flam. Méd. Science, Paris, 1984 : 392 – 394.
- 28. Association des Enseignants de Microbiologie et d'Immunologie des Facultés de Pharmacie Françaises (AEMIP)** Microbiologie générale et santé *Editions ESKA 2003 :155 – 162*
- 29. LE MINOR L., VERON M.** Bactériologie Médicale
Flam. Méd. Science, Paris, 1984 : 392 – 394.
- 30. FERRON A.** Bactériologie médicale
Editions C. et R. 1984;(3, 14, 15):3-2- 15-
- 31. PERRIERE G.** Application d'une présentation par objet des connaissances de Modélisation certains aspects de l'expression des gènes chez *E. coli* UCBL. *Thèse Université de Lyon I, France. (1992) : 14, 77.*
- 32. AVRIL. J.L., DABERNAT H., DENIS F., MONTEIL H.**
Bactériologie Clinique *Ellipses, 3é édition, France, 2000: 114.*
- 33. LE MINOR L., VERON N.** Bactériologie Médicale
Flam Med. Science, Paris, 1989 : 318-333 ; 773-82
- 34. FERRON A.** Bactériologie médicale
- 35. Association des Enseignants de Microbiologie et d'Immunologie des Facultés de Pharmacie Françaises (AEMIP)** Microbiologie générale et santé *Editions ESKA 2003 :155 – 162*
- 36. FERRON A.**
Bactériologie médicale
Editions C. et R. 1984;(3, 14, 15):3-2- 15-6.
- 37. BERCHE P.**
Haemophilus influenzae et espèces bactériennes apparentés.
In LE MINOR L., VERON M.
Bactériologie Médicale, Paris Flammarion Méd : Science, 1982 : 347-353.

38. BINGER E., LAMBERT-ZECHVOSKY N., PROUX M.C., BINGEN-BIDOIS M.

Détermination des biotypes du genre *Haemophilus* et étude de la sensibilité à l'ampicilline en pratique hospitalière
Etude de 500 souches.
Ann. Biol. Clin. 1982 ; 40 : 597-662.

39. KILIAN M. A taxonomie study of *Haemophilus influenzae* with the proposal of a new species. *J. Gen. Microbiol.* 1976; 33: 9-62.

40. FLEURETTE J.

Staphylocoques et Microcoques dans le Minor L. VERON
Bactériologie médicale 2e tirage, 1984 ; 30 : 509-526.

41. Pr Avril J.L. – Pr MONTEIL H.

Bactériol. Clinique
3e édition, 2000 [1, 2] : 6-39.

42. FERRON A. Bactériologie médicale

Editions C. et R. 1984, (3,14,15) : 32-166.

43. MARCHAL N., BOUDON J. L., RICHARD C. L.

Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. *DOINS Editeurs*, 1987.

44. Horaud T, Le Bouguéneq C.

Streptococcaceae. In : Le Minor L, Veron M, eds. Bactériologie médicale 2ème ed. Paris : Médecine-Sciences Flammarion, 1990:795-834.

45. Albert B, William JH, Kenneth LH, Henry DI, Shadomy HJ.

Manual of clinical microbiology.
5th edition, ASM 1991:243-244.

46. J.-P. Stahl.

Epidémiologie, contrôle et traitements des résistances aux antibiotiques :
comprendu
du 45e congrès ICAAC, Washington 2005.
Méd Mal Infect 36 ; 2006 : 290-296.

47. D. Guillemot et R. Leclerq.

Impact de l'exposition des populations sur le risque de résistance bactérienne.
Méd Mal Infect 35 ; 2005 : 212-220.

48. A. Andremont.

Comment définir le potentiel de sélection de la résistance bactérienne aux antibiotiques ?

Méd Mal Infect 35 ; 2005 : 207-211.

49. M.Lahsoune, H.Boutayeb, K.Zerouali, H.Belabbes, N.El mdaghri.
Prévalence et état de sensibilité aux antibiotiques d'*A.baumannii* dans un CHU marocain.

Méd Mal Infect 37 ; 2007 : 828-831.

50. X.Forceville, F.Faibis, P.Lahilaire et al.
Diminution des infections à SARM en réanimation à Meaux, sous renforcement de l'isolement spécifique.

51. Y.Rio, P.Pina, F.Jurin et al.
Sensibilité de *P.aeruginosa* aux antibiotiques, isolés chez des malades de soins intensifs français en 1998. Phénotype de résistance aux bêtalactamines. Etude ESCRIM.

Pathol Biol 2002 ; 50 : 12-17.

52. M.Eveillard, M.Biando, . B.Canarelli et al.
Diffusion des entérobactéries productrices de bêtalactamase élargi et évolution de

leur incidence sur une période de 16 mois dans un CHU.

Pathol Biol, 2001 ; 49 : 515-521.

53. R.Leclerq.
Résistance des staphylocoques aux antibiotiques.

Ann Fr d'Anesth Réa 2002 ; 21 : 375-383..

54. Jean-Philippe Lavigne, Albert Sotto, Corinne Merle, Jacques Jourdan, Claude- James Soussy et Danielle Sirot.
Résistance enzymatique d'*E.coli* aux bêtalactamines et prévalence en clinique.
Pathol Biol 2002 ; 50 : 388-393.

55. J.-D.Cavallo, R.Fabre, F.Jehl, C.Rapp et E.Garrabé.
Bêtalactamines. EMC-Maladies infectieuses 1 ; 2004 : 129-202.

56. B.Sclemmer. Antibiotiques.
Extrait de : Réanimation médicale. Edition Masson : 922-933.

57. O.Mimoz, A.Edouard.
Place des aminosides dans le traitement des infections nosocomiales.
Questions pour un champion en réanimation-MAPAR 1997 : 649-655.

58. R.Gauzit, A.Lepape, Y.M.Guillou et al.
Utilisation des glycopeptides en réanimation : résultats d'une enquête de pratique. Réanimation 2002 ; 11 suppl.2 : 19-23.

59. M.L.Joly-Guillou.
Le point sur les Staphylocoques dorés de moindre sensibilité aux glycopeptides en réanimation. Réanimation 13 ; 2004 : 185-189.

60. A.. Gérard et J.Larche.

Place des glycopeptides en réanimation.
Méd Mal Infect 34 ; 2004 : 97-98.

61. M.Chaara et J.Mateo.

Les pneumonies aiguës communautaires graves.
Médecine d'urgence 2000.42e congrès national d'anesthésie et de réanimation.
Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS et SFAR.