



République Algérienne Démocratique et Populaire

de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Larbi Tébessi -Tébessa-

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Biologie Appliquée

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

Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie

Filière: Sciences Biologiques

Option: Microbiologie appliquée à la santé et à l'environnement

Thème:

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER en micro biologie

Présente par : SALMANE ROMAISSA

***Recherche et Identification des SARM
isolées de divers prélèvements
hospitalières***

Devant le jury

Présidente

Finghour H

Université de TEBESSA

Rapporteur

Azizi N

Université de TEBESSA

Examineur

Zouaoui N

Université de TEBESSA

Année universitaire : 2017-2018

Table des matières

Remerciements

Dédicace

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

PARTIE THEORIQUE

Chapitre I: Généralité sur *S.aureus*

Introduction.....	1
I.1.Historique.....	2
I.2.Classifications.....	2
I. 3.Caractères d'identifications.....	3
I.3.1.Caractères phénotypiques et cultureux.....	3
I.3.2.Caractères moléculaires.....	4
I. 3.3.Caractères physiologiques.....	4
I. 4.Épidémiologie des infections à <i>S. aureus</i>	5
I. 4.1.Colonisation.....	5
I. 4.2. Transmission.....	5
I. 4.3.Répartition des staphylocoques.....	6
I. 5. <i>S.aureus</i> résistant à la meticilline.....	6
I. 6.Physiopathologie des infections à <i>S.aureus</i>	7
I. 6.1.Les facteurs de virulences du <i>S. aureus</i>	7
I. 6.1.1.Les protéines de surface ou facteurs d'adhérences.....	8
I.6.1.2.Les facteurs de virulence solubles.....	9

Table des matières

Chapitre II : les infections nosocomiales

II.1. Définition.....	10
II. 2. Épidémiologie.....	10
II. 3. Origine des germes.....	11
II.3.1 La flore saprophyte du malade lui-même.....	11
II.3.2. Le personnel (médical et paramédical).....	11
II. 3.3. L'environnement.....	11
II. 4. Mode de contamination.....	11
II. 4.1. Auto-infection.....	11
II. 4.2. Hétéro infection.....	11
II. 4.3. Xéno-infection.....	12
II.4.4. Exo-infection.....	12
II. 4.5. Patient réceptif.....	12
II. 5. Les services à risques.....	13

Chapitre III: les infections due aux SARM

III. 1. Infections suppuratives staphylococcique	15
III. 2. Infections toxiques staphylococciques.....	16
III.3. Principes du traitement des infections à S. aureus	17

PARTIE EXPERIMENTALE.

Matériels et méthodes

1. Objectif d'étude.....	18
2. Cadre de l'étude.....	18

Table des matières

3. Prélèvement.....	18
3.1. Prélèvement à partir des surfaces sèches.....	18
3.2. Prélèvement à partir des surfaces humides.....	18
4. Conditions de prélèvement.....	19
5. Isolement.....	20
6. Purification et conservation.....	20
7. Identification.....	20
7.1. Examens macroscopiques.....	20
7.2. Examens microscopiques.....	22
7.2.1. Coloration de Gram	22
7.3. Recherche de la catalase.....	22
7.4. Recherche de la coagulase.....	23
8. Antibiogramme des souches isolées.....	24
9. Test de screening à l'Oxacilline	25

Résultat et discussion

1. Prélèvement.....	26
2. Isolement et identification.....	26
2.1. Examen macroscopique.....	26
2.1.1 Coloration de Gram.....	28
2.1.2. Catalase.....	28
2.1.3. Coagulase.....	28
2.2. Répartitions des espèces selon leur nature.....	29
2.3. Fréquence d'isolement de <i>S. aureus</i>	30
2.4. Sensibilité des souches aux antibiotiques.....	30
3. Répartition des souches SARM en fonction du prélèvement.....	33

Conclusion

Table des matières

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Abstract

ملخص

Remerciement

Nous tenons à remercier, tout d'abord, notre Dieu le tout puissant ALLAH qui nous a donné volonté et patience pour faire ce modeste travail.

*On tient à exprimer notre très grande considération et notre vive reconnaissance à Mme : **Azizi Nassima** pour sa patience, ses précieux conseils, le suivie et l'orientation dont nous avons pu bénéficier.*

Nous tenons également à remercier :

*On exprime nos profondes remerciement à **Mme : Finghour H** et à **Mr: Zouaoui N**, d'avoir accepté d'être parmi les membres du jury.*

Je remercie ainsi l'ensemble des enseignants qui ont contribué au cours de mes années universitaire, sans oublier toutes les personnes de département de Biologie.

Nos remerciements vont également à tous nos amis et collègues de promotion 2018.

Finalement, merci à tous ceux qui ont apporté leurs aides de près ou de loin pour réaliser ce travail.

Dédicace

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, que je dédie ce modeste travail :

*A ma mère **Fatima Zahra**: Tu m'as donné ton amour, ta tendresse et toute ton attention. Dans la difficulté tu as toujours été prompte à me venir en aide. Merci pour tes conseils et tes encouragements. Tu restes dans mes pensées et dans mon cœur.*

*A mon Père **AHMED** : Un homme éternel, beau et pur. Pour ta confiance, ton amour.*

A mon frère et ma sœur : Pour avoir fait ce que je suis aujourd'hui. Même si tu ne vous en êtes pas rendu compte, j'ai beaucoup appris de vous. Désolé d'avoir été si casse-pieds ! Vous êtes mon soutien dans la vie et je vous aime.

*À mon Fiancé **Hassan** : pour son affection, les sacrifices consentis tout au long de ce travail et pour son soutien.*

A tous les membres de ma famille : petits et grands Veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.

*A ma deuxième mère **Nabila** Qui remplace un petit peu la place de mamère.*

*Les êtres les plus proches à mon cœur : **Asma, khaoula, Halima, radja, bariza, ibtessem, assia ,chourouk** n'oubliez pas **Tarek**.*

A tous mes oncles et tantes : Merci pour vos encouragements et vos conseils.

A tous mes cousins et cousines : Merci pour vos encouragements.

*À mon amie **Imane shailia**: Pour l'amitié qui est la notre et pour tout l'amour que j'ai pour toi. Tu es restée dans mon cœur.*

*A mon groupe de travail dans la pharmacie : **ismahene ,souma, somaya, nour**.*

A toute la promotion de la microbiologie

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Classification selon Bergey's (1994)	02
02	Classification phylogénique	03
03	Taux d'infections dans les services hospitaliers	14
04	Protéines de surface impliquées dans l'adhésion	15
05	Toxi-infections staphylococciques et toxines impliquées	16
06	Classes et molécules anti-staphylococciques	17
07	dates et sites des prélèvements	19
08	Résultats de pré-identification par les techniques microbiologiques standards	29
09	fréquence d'isolement de <i>S.aureus</i>	30
10	résultat de sensibilité et résistance des staphylococcus aureus aux ATB	32

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Culture de <i>S. aureus</i> sur gélose au sang	04
02	Aspect morphologique du <i>S.aureus</i> en microscopie optique (A) (X1000) et en microscopie électronique (B) (X15000).	05
03	Pouvoir pathogène d'invasion tissulaire par <i>S.aureus</i>	07
04	Expression des facteurs de virulence du <i>S.aureus</i>	08
05	Transmission de l'infection hospitalière	13
06	Organigramme de l'identification de <i>Staphylococcus aureus</i>	21
07	Colonie de <i>S. aureus</i> sur milieu Chapman	26
08	Colonie de <i>S. epidermidis</i> sur milieu Chapman	27
09	Aspect des colonies de <i>Staphylococcus</i> isolées sur milieu gélose au sang.	27
10	coloration de Gram	28
11	Production de catalase	28
12	Résultat du test de coagulase libre	29
13	Répartition des <i>Staphylococcus</i> isolées selon leur nature (coagulase).	29
14	Effet des disques d'antibiotiques sur des souches <i>S.aureus</i> isolée	31
15	sensibilité et résistance des <i>staphylococcus aureus</i> aux ATB	32
16	Répartition des SARM par rapport aux prélèvements.	33

Liste d'abréviation

SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la méticilline
ATB	Antibiotique
SCN	Staphylocoques à coagulase négative
SCC	Staphylococcal cassette chromosome
SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méticilline
NaCl	Chlorure de sodium
MH	Muller Hinton
GN	Gélose nutritive
AK	Amikacine
AM	Ampicilline
E	Erythromycine
OX	Oxacilline
P	Pénicilline G
VA	Vancomycine
PI	Piramycine
RP	Pristinomycin
TI	Ticarcillin
CD	Clindamycin
PRL	Piperacillin
OF	Ofloxacin
pb	Paire de base

Introduction

S.aureus, est une bactérie ubiquiste que l'on trouve fréquemment sur la peau et les muqueuses de l'être humain. C'est l'un des principaux agents étiologiques des infections suppuratives superficielles et profondes ainsi que les syndromes liés à l'action des toxines.(**GAN et al,2002**).Durant les dix dernières années, il commence à poser un véritable problème pour la santé humaine à l'échelle mondial.(**B.J. Kopp et al, 2004**). Trois raisons expliquent les nouvelles préoccupations :

L'apparition de pandémies à *S.aureus*résistants à la méticilline (SARM) en milieu hospitalier, L'apparition de souches à sensibilité diminuée aux glycopeptideset L'émergence de souches de SARM en médecine communautaire.La dissémination de la résistance à la méticilline est largement rapportée à travers le monde, Cela a conduit à une augmentation de la prescription des glycopeptides.(**Burnichon N., Texier A ,2003**)

Une résistance à la teicoplanine a été retrouvée chez des souches de *S.aureus*et depuis 1997, une résistance intermédiaire à la vancomycine conduisant à des échecs thérapeutiques a été rapportée(**B.J. Kopp, et al ,2004**).

Au cours de notre travail, on a travaillé sur la recherche et l'identification des SARM à partir des divers prélèvements hospitaliers à fin d'étudier leurs résistances croisée avec les β -lactamines ainsi que leur sensibilité par rapport à d'autres familles d'ATB et la recherche de la production de β -lactamase chez *S.aureus*.(**A. Manzuret al , 2007**).

Le travail est divisé en 02 grand volets dont :

La première partie est la bibliographie, qui présente des généralités sur les SARM, les infections nosocomiales, les infections due aux SARM.Et la seconde partie est la partie pratique basé sur le matériel et méthodes utilisés dans ce travail, et la Présentation des résultats expérimentaux obtenus et enfin une discussion et conclusion.

1. Historique

Le *Staphylococcus aureus* est une bactérie retrouvée fréquemment sur la peau et dans les narines des êtres humains. Elle est responsable de plusieurs infections cutanées, ostéo-articulaires, des pneumonies bactériennes et des bactériémies. (S. Cosgrove, et al, 2003).

Avant l'arrivée des antibiotiques, les infections causées par le *S. aureus* étaient une cause fréquente de morbidité et de mortalité. Au début des années 1960 en Europe, le staphylocoque est devenu résistant aux pénicillines semi-synthétiques (la méthicilline, l'oxacilline et la nafcilline). Une résistance fréquente à plusieurs autres antibiotiques (multi-résistance) comme l'érythromycine, la tétracycline et la clindamycine a été observée. (S. Cosgrove, et al, 2003).

L'abréviation SARM est utilisée pour faire référence aux souches de *S. aureus* qui possèdent une résistance aux antibiotiques énumérés précédemment, dont la méthicilline. Depuis son apparition au Canada en 1981, le SARM a été reconnu comme un pathogène nosocomial d'envergure en raison de son importante propagation dans les centres hospitaliers (SARM-H). Bien que le SARM soit considéré d'abord et avant tout comme une infection nosocomiale, la littérature de la fin des années 1990 rapporte des infections à SARM acquises dans la communauté chez des patients qui n'ont aucun lien avec les milieux de soins, d'où l'expression SARM communautaire ou SARM acquis en communauté (SARM-AC). (S. Cosgrove, et al, 2003).

2. Classifications

Tableau 01 : Classification selon Bergey's (1994) (Ross J. et al, 1990).

Embranchement	<i>Firmicutes</i>
Groupe 17	Cocci Gram+.
Ex-famille	<i>Micrococcaceae</i>
Famille	<i>Micrococcaceae</i>

Tableau 02 : Classification phylogénique(Ross J.Iet al, 1990).

Domaine	Bacteria ou Eubacteria
Phylum XIII	Firmicutes
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Bacillales</i>
Famille	Staphylococcaceae
Genre	Staphylococcus
Espèce	<i>Staphylococcus aureus</i>

3. Les Caractères d'identifications

3.1. Caractères phénotypiques et cultureux: La coloration de Gram, la morphologie des colonies sur milieux gélosés et différents tests biochimiques permettent d'identifier le genre *Staphylococcus* et l'espèce *S. aureus*. Les Staphylocoques sont des cocci à Gram positif, isolés ou groupés en amas, immobiles, non sporulés, parfois encapsulés, catalase-positif et oxydase-négatif. La production d'une coagulase, d'un pigment caroténoïde jaune doré et la présence d'une protéine A de paroi caractérisent *Staphylococcus aureus*. Les autres espèces sont regroupées sous le terme de staphylocoques à coagulase négative (SCN), dont le représentant principal est *S. epidermidis*.(Dinges MM, Orwin PM ;2000).



Figure 01: Culture de *S. aureus* sur gélose au sang. (Baba T. et al,2002).

- 3.2. Caractères moléculaires:** Le Staphylocoque doré possède un génome porté par un chromosome circulaire formé d'environ 2800 paires de bases et des éléments extra chromosomiques qui sont les prophages et les transposons, son contenu en GC est de 33 %. Ce plasmide comporte environ 20 000 à 25 000 pb(15). Il a déjà été séquencé pour 6 souches de *S.aureus*.(LOWY .FD,1998).
- 3.3. Caractères physiologiques:**Le *S. aureus* est une bactérie aéro-anaérobie facultative, elle est cultivée sur les Milieux ordinaires (Gélose nutritive, bouillon nutritif...), sur gélose au sang et le milieu sélectif Chapman. C'est une bactérie mésophile tolérée (37°C), neutrophile (pH 7) et halophile (fortes concentrations de NaCl).Elle est aussi relativement résistante aux inhibiteurs bactériens comme le cristal violet et le tellurite de potassium. En bouillon ordinaire, la culture est rapide et les staphylocoques se multiplient en quelques heures, formant un trouble homogène ou un dépôt.(Wertheim HF, Melles DC, 2005).

4. Épidémiologie des infections à *S. aureus*

4.1. Colonisation: Les Staphylocoques sont présents dans l'environnement (air, sol, eau, aliments, mobilier, matériels) et vivent à l'état commensal sur la peau et les muqueuses des organismes humains et animaux. Le réservoir de *S.aureus* est essentiellement humain; on peut l'isoler des zones chaudes et humides de l'organisme telles que les fosses nasales, l'oropharynx, les creux axillaires, le périnée et le tube digestif. Environ 20 % des individus l'hébergent de façon permanente (porteurs sains), 30 % de façon intermittente et 50 % ne sont pas porteurs. Les Facteurs de risque de colonisation par *S.aureus* sont : l'âge avancé, Sexe masculin, Alcoolisme, Pathologie pulmonaire chronique, Néoplasie, Diabète, Insuffisance rénale terminale et dialyse. (FOSTER TJ, HOOK M , 1998).

4.2. Transmission: La transmission des staphylocoques s'effectue essentiellement par contact direct à partir de sujets colonisés ou de lésions staphylococciques ouvertes, cutanées ou muqueuses. La transmission indirecte est plus rare (objets divers, vêtements, literie, etc.) et elle est, exceptionnellement aéroportée. Les toxi-infections alimentaires collectives sont des épidémies concernant des sujets ont consommé le même repas (restaurant, cantine), contenant des aliments souillés par du personnel porteur de staphylocoques et dont les conditions de conservation ont permis la multiplication. (Wolff.M , 2002).

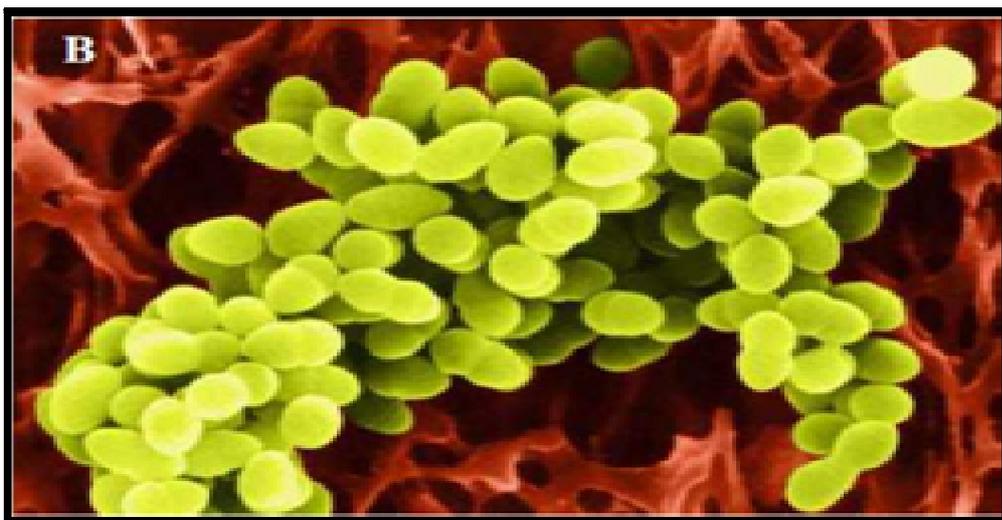


Figure 02 : Aspect morphologique du *S.aureus* en microscopie électronique (B) (X15000)(StephenH,et al ,2006).

4.3. Répartition des staphylocoques: la majorité des infections à staphylocoques observées en ville sont liées à *S.aureus*. Les staphylocoques à coagulase négative (SCN) sont exceptionnellement responsables d'infections communautaires spontanées. On peut cependant citer de rares infections urinaires à *S. saprophyticus* chez la femme jeune, est à l'origine de cystites et d'exceptionnelles pyélonéphrites. Les SCN peuvent néanmoins être responsables d'infections nosocomiales (5 % des infections nosocomiales), favorisées par un terrain immunodéprimé (diabète, virus de L'immunodéficience humaine [VIH], etc.), et surtout par la présence de matériel étranger (prothèses ostéoarticulaires, valvulaires, vasculaires, cathéters, sondes urinaires, etc.).(StephenH,et al ,2006) .

5. *S.aureus* résistant à la méticilline

Les SARM ont une sensibilité très faible à l'ensemble des β -lactamines et sont fréquemment résistants à d'autres familles d'antibiotiques du fait de différents mécanismes génétiques de résistance souvent associés. Les SARM initialement décrits en milieu hospitalier au début des années 1960 ont plus tard été identifiés en ville, en particulier à l'occasion d'infections concernant des patients « à risque » de portage de SARM, comme ceux ayant été hospitalisés récemment.(StephenH,et al ,2006) .

Les *S.aureus* résistant à la méticilline (SARM) sont ceux ayant acquis une résistance chromosomique par le gène *mecA*, qui code pour une protéine de liaison à la pénicilline (PBP2a) ayant une affinité diminuée vis-à-vis des β -lactamines. Le gène *mecA* fait partie d'un matériel génétique mobile appelé staphylococcal cassette chromosome (SCC) *mec*, susceptible d'être transmis horizontalement d'une bactérie à une autre au sein d'une même espèce, mais aussi d'une espèce à une autre.(StephenH,et al ,2006) .

6. Physiopathologie des infections à *S.aureus*

6.1. Les facteurs de virulences du *S. aureus*: *S.aureus* colonise la peau et les muqueuses en adhérant aux cellules et aux composants de la matrice extracellulaire (**figure3**). Il exerce ensuite son pouvoir pathogène qui est du, à la synthèse de multiples facteurs de virulence. Elle se lie aux sites de lésions où s'accumulent les plaquettes et les fibrines (PFT). Après phagocytose par les cellules endothéliales, *S.aureus* secrète des enzymes protéolytiques qui vont faciliter la diffusion dans les tissus adjacents et le relargage de *S.aureus* dans le système vasculaire. Après phagocytose, les cellules endothéliales expriment des récepteurs Fc et des molécules d'adhésion et relarguent de l'IL-1, IL-6 et IL-8. Les leucocytes adhèrent aux cellules endothéliales, les macrophages et monocytes relarguent de l'IL-1, IL-6, IL-8 et TNF-alpha après phagocytose de *S.aureus*. (**LOWY FD ,1998**).

Les facteurs de virulence sont de deux types : les protéines de surface et les facteurs de virulence solubles :

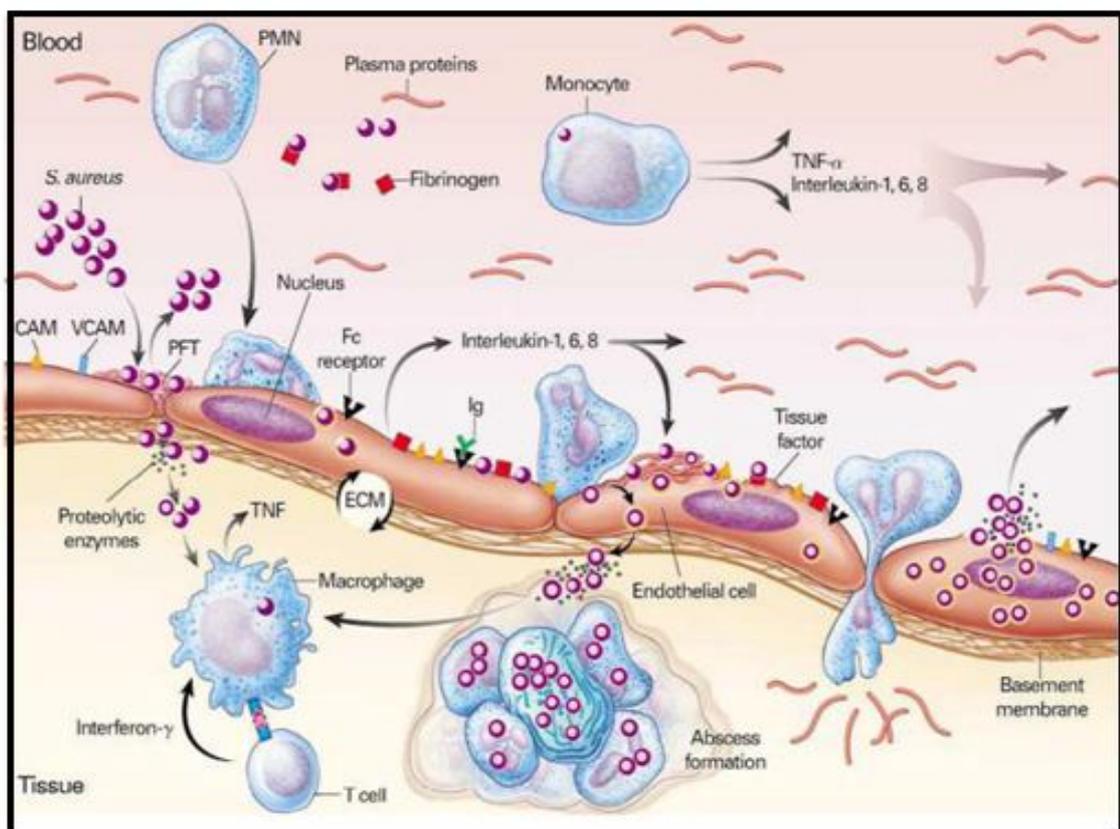


Figure 03 : Pouvoir pathogène d'invasion tissulaire par *S.aureus*(**LOWY. FD ,1998**).

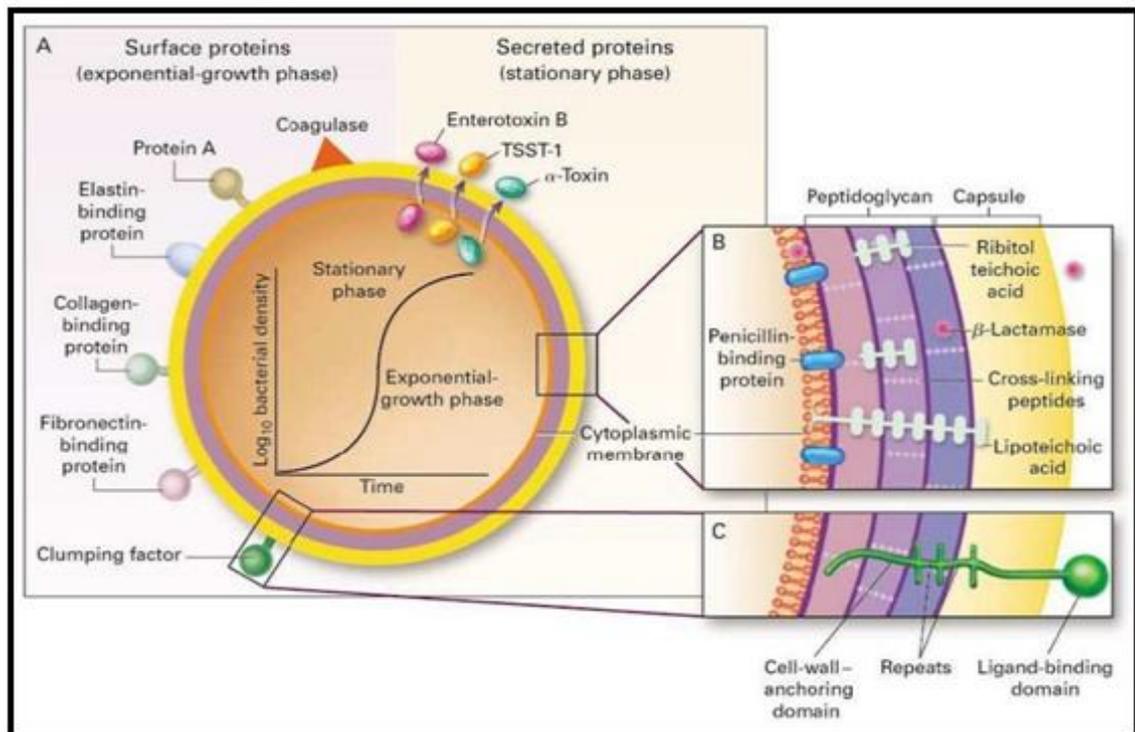


Figure 04 : Expression des facteurs de virulence du *S.aureus*(LOWY .FD ,1998).

6.1.1. Les protéines de surface ou facteurs d'adhérences: Elles sont en majorité ancrées aux Peptidoglycanes de la paroi bactérienne, et vont permettre la fixation de *S.aureus* aux cellules. Cinq groupes de protéines de surface ont été caractérisés au niveau moléculaire. (El Kouir, D. P , 2003) .

- Spa (protéine A)
- Cna (protéine de liaison au collagène),
- FnBP (protéine de liaison à la fibronectine),
- Clf (protéine de liaison au fibrinogène)
- EbpS (protéine de liaison à l'élastine).

a- La Protéine A (Spa pour *staphylococcal protein A*): Classiquement connue pour être une protéine liant le fragment Fc des immunoglobulines G (IgG). C'est un facteur primordial à l'établissement des infections endo-vasculaires.(TASSEAU F. et BARON D ,1989).

b- La protéine de liaison au collagène de type I, II et IV:Cette adhésine joue un rôle très important dans les infections ostéo-articulaires. (TASSEAU F. et BARON D ,1989).

- c- **La protéine de liaison à la fibronectine:** Cette protéine contribue à l'adhérence de *S. aureus* aux caillots plasmatiques mais aussi aux biomatériaux ayant un contact prolongé avec le sang. Elle joue un rôle très important dans l'initialisation des infections sur corps étrangers. (Boden, MK, Flock , 1989).

 - d- **Les protéines de liaison au fibrinogène: Clumping factor (ClfA, ClfB):** est un récepteur pour le fibrinogène qui provoque l'agrégation des bactéries en présence de plasma. Cette adhésine joue un rôle dans les infections des plaies et les infections sur corps étranger. (Boden, MK, Flock ,1989).

 - e- **La protéine de liaison à l'élastine (EbpS):** une protéine transmembranaire de 25 kDa associée à la surface cellulaire. Elle se lie à la région N terminale de l'élastine qui est une région toujours libre. (Boden, MK, Flock ,1989).
- 6.1.2. Les facteurs de virulence solubles:** pratiquement toutes les souches de *S. aureus* sont capables de sécréter, au cours de la phase stationnaire de croissance, un groupe d'enzymes et d'exotoxines, comprenant quatre hémolysines (alpha, bêta, gamma et delta), des nucléases, des protéases, des lipases, une hyaluronidase et une collagénase. En plus de ces protéines, certaines souches produisent une ou plusieurs exotoxines qui ciblent spécifiquement les molécules d'adhésion cellulaires et le système immunitaire hôte. (Boden, MK, Flock , 1989).

1. Définition

Les infections nosocomiales (du grec: **sos**:maladie et **komeion**: prendre garde) sont produites par des agents pathogènes infectieux qui se développent au milieu hospitalier et qui sont acquises par les patients lors de leur passage dans ces institutions. Les infections nosocomiales peuvent affecter, non seulement les patients mais également les infirmières, les médecins, les gardes-malade, les visiteurs, les commerçants, des livreurs, des gardiens et quiconque à des contacts avec l'hôpital. La plupart des infections nosocomiales deviennent cliniquement manifestes lorsque les patients sont encore hospitalisés. **(BHAKDI S, 1981)**.

2. Épidémiologie

Les 5 principaux sites des infections nosocomiales représentent 70% de l'ensemble des infections nosocomiales avec par ordre d'importance: les infections urinaires (35%), les infections respiratoires basses (12%), les infections du site opératoire (11%), les bactériémies (6%) et les infections par cathéter (4%). **(H. Wisplinghoft, 2010)**.

Les principaux micro-organismes responsables sont les bacilles Gram négatif (53%) et les cocci Gram positif (33%) : *Escherichia Coli* (21%), *Staphylococcus aureus* (16%), *Pseudomonas aeruginosa* (11%), *Enterococcus spp* (8%). Ces quatre espèces représentent 56% des microorganismes retrouvés dans les infections nosocomiales. **(Wertheim HF, 2005)**.

- ❖ les conséquences des infections nosocomiales sont nombreuses :
 - ✓ La mortalité et la morbidité.
 - ✓ Augmentation de la durée de séjour hospitalier,
 - ✓ La désaffection des populations pour les hôpitaux où surviennent de nombreuses infections nosocomiales.
 - ✓ La sélection des germes multi-résistants.
- ❖ Les conséquences médico-légales : La responsabilité médico-légale en ce qui concerne les infections nosocomiales n'est engagée que lorsqu'il peut être démontré que le médecin ou le personnel soignant a été négligent dans l'adhésion aux soins appropriés standards et que l'infection est le résultat d'une défaillance des procédures de références.

3. Origine des germes

3.1. La flore saprophyte du malade lui-même: Elle subit au cours des premiers jours de l'hospitalisation des modifications qualitatives. Les bacilles Gram négatif et plus accessoirement les levures (candida) remplacent les cocci Gram positif ou les anaérobies. Ces flores saprophytes modifiées colonisent les sites préférentiels chez le malade entraînant une infection de l'appareil urinaire, des plaies opératoires, ou du parenchyme pulmonaire...(H. Wisplinghoft, 2010).

3.2. Le personnel (médical et paramédical): La contamination peut se faire par le biais du personnel soignant qui transmet les germes d'un patient à l'autre avec ses instruments ou ses mains souillées.(Wertheim HF, 2005).

3.3. L'environnement: Il est moins déterminant dans le cadre de programme de prophylaxie que les deux précédentes origines. Il peut être contaminé par le personnel ou par le patient. Il comprend les divers appareillages d'assistance respiratoire et de monitoring par voie intra vasculaire, les lavabos, les instruments (stéthoscope, tensiomètre ...), les liquides et les tubulures, la nourriture et l'air ambiant.(Wertheim HF, 2005).

4. Mode de contamination

4.1. Auto-infection: C'est lorsque le malade s'infecte soit par ses propres germes in situ soit à partir de l'environnement immédiat (surface de la peau, vêtement, lit). Ces infections sont dues généralement aux germes saprophytes qui deviennent pathogènes à la suite d'une antibiothérapie itérative ou d'un traitement immunosuppresseur.(Wertheim HF, 2005).

4.2. Hétéro infection: On parle d'hétéro-infection lorsqu'un agent infectieux est transporté d'un malade à un autre provoquant une infection dite croisée ou hétéro-infection. L'agent infectieux est rarement transmis par contact direct ou par voie aérienne. Le plus souvent le vecteur est le personnel soignant par ses mains ou ses instruments de travail.(BHAKDI S, 1981).

4.3. Xéno-infection:Ce sont des infections qui sévissent sous forme endémique ou épidémique dans la population extrahospitalière. Les agents infectieux sont importés à l'hôpital par les malades, le personnel soignant, ou les visiteurs qui sont atteints ou qui sont en phase d'incubation. Ils se transmettent par voie aérienne, par contact direct ou indirect et trouvent à l'hôpital des victimes particulièrement réceptives et des conditions de transmission facilitées.. (**Wertheim HF, 2005**).

4.4.Exo-infection: Cette infection est liée à des avaries techniques (stérilisation inefficace, filtre à air non stérile, eau polluée). Les matériaux à usage paramédical ou domestique sont utilisés auprès des malades ; ils sont susceptibles d'être contaminés et peuvent provoquer des infections nosocomiales souvent épidémiques.. (**Wertheim HF, 2005**).

4.5. Patient réceptif:Certaines pathologies entraînent une légère immunodépression, les malades à risque sont: les brûlés, les grabataires avec des escarres étendues, les polytraumatisés et les porteurs de dispositifs invasifs (assistance respiratoire, sonde urinaire, cathéters divers), les insuffisants respiratoires, les vieillards et surtout les nouveaux nés prématurés. Ils sont donc exposés à une infection nosocomiale.(**Wertheim HF, 2005**).

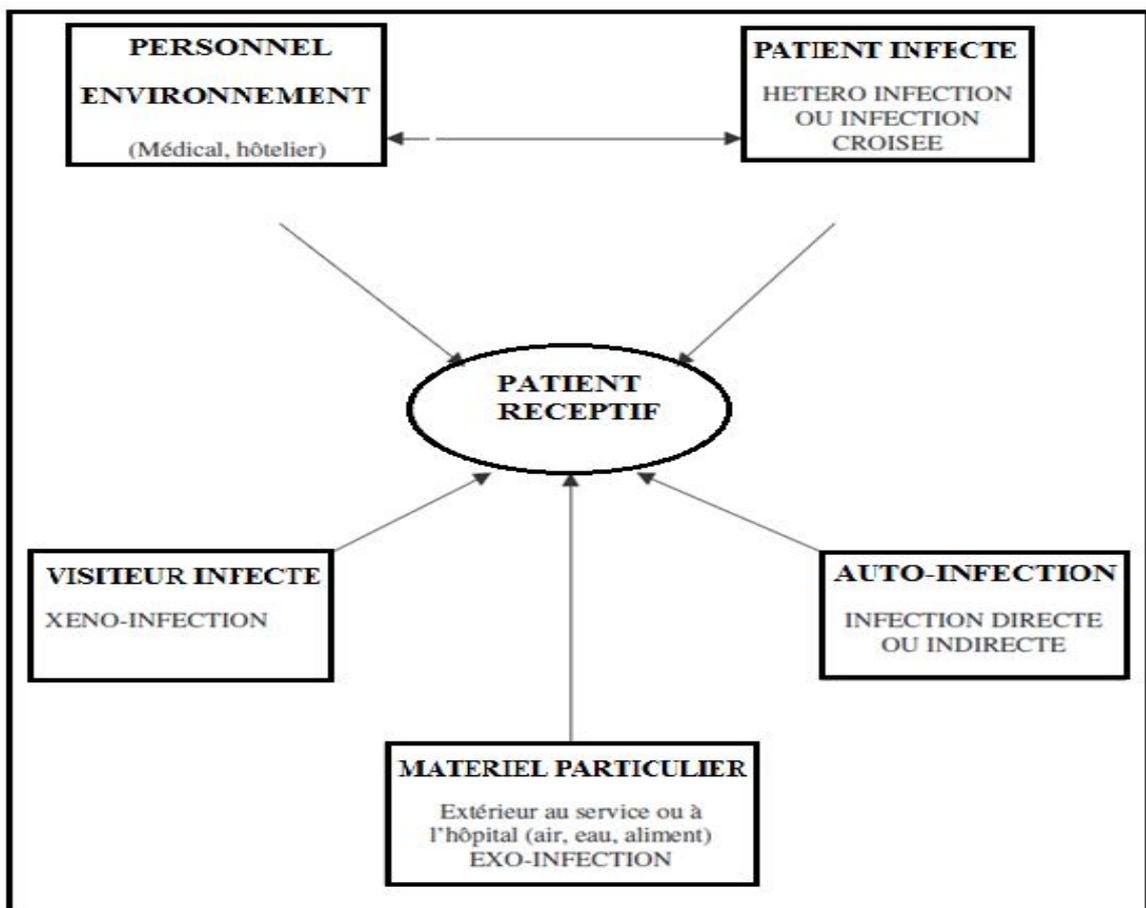


Figure 05: Transmission de l'infection hospitalière.(Cosgrove SE,2003).

5. Les services à risques

Les taux d'infections nosocomiales sont variables selon le recrutement des services et, pour un hôpital donné, du niveau technique de ses activités. On constate une plus importante proportion d'infections nosocomiales dans les centres hospitaliers universitaires que dans les centres hospitaliers généraux, en raison de leur activité médico-chirurgicale spécifique, notamment en termes de greffes, de chimiothérapies lourdes ou de traitements de grands brûlés. Toutes structures confondues, les services à risques, sont, par ordre décroissant H. Wisplinghoft, T. Bischoft, S.M. Tallent, H. Seifert 2004 : (Cosgrove SE, 2003).

Tableau 03 : Taux d'infections dans les services hospitaliers.(Wisplinghoff H,2003).

Service	Taux d'infection (%)
Réanimation	28,1%
Chirurgie	7.4%
Médecine	7.2%
Gynécologie-obstétrique	2.7%
Pédiatrie	1.4%

On peut classer les infections à staphylocoques dorés en deux groupes :

1. Les infections suppuratives qui dépendent de la prolifération du germe. Le staphylocoque est présent dans le site infectieux et le patient guérit de l'infection.

Les infections dites toxiques où une toxine sécrétée par le staphylocoque est responsable des symptômes. (S. Cosgrove, G et al,2003).

1. Infections suppuratives staphylococciques

Les infections suppuratives sont caractérisées par plusieurs phases : la prolifération bactérienne, l'invasion, la destruction tissulaire, la réponse inflammatoire locale et parfois systémique. Les facteurs de virulence impliqués sont les protéines de surface qui initialisent la colonisation des tissus de l'hôte et les facteurs qui inhibent la phagocytose par les leucocytes. (NFV, 2004).

S. aureus se fixe aux cellules et au collagène de la matrice extracellulaire par des protéines de surface appelées adhésines : protéine A (Spa), protéine de liaison au collagène (Sna), protéine de liaison à la fibronectine (FnBP), protéine de liaison au fibrinogène (Clfa), protéine de liaison à l'élastine (EbpS). Les adhésines ont des récepteurs spécifiques différents ce qui pourrait expliquer les différentes formes cliniques des infections à *S. aureus*. (Tableau 04).

La résistance à la phagocytose passe par la formation de biofilm et l'intégration intracellulaire de *S. aureus*, en particulier dans les cellules endothéliales. (S. Cosgrove, G et al,2003).

Tableau 04: Protéines de surface impliquées dans l'adhésion

Protéines	Sites de liaison	Pathogénie
Spa	Facteur Von Willebrand Epithélium voies aériennes	Infections intravasculaires pneumonies
Cna	Collagène	Infections ostéoarticulaires
FnBP	Fibronectine	Infections sur corp étranger
Clfa	Fibrinogène	Plaie, infections sur corp étranger
EbhA-EbhB		Endocardites

2. Infections toxiques staphylococciques: Les infections toxiques staphylococciques regroupent :

- ❖ Le choc toxique staphylococcique
- ❖ La maladie exfoliante généralisée,
- ❖ Les toxi-infections alimentaires,
- ❖ La pneumonie nécrosante
- ❖ La particularité des toxines produites lors du choc toxique staphylococcique est d'être des super-antigènes qui vont entraîner une activation poly-clonale non spécifique des lymphocytes T.(Desenclos J.C ; 2011).

Ces derniers vont libérer brutalement et massivement des cytokines pro-inflammatoires responsables des signes de choc. On retrouve la toxine TSST-1 dans 20% des souches de *S. aureus*. La toxine de Panton et Valentine individualisée dans la pneumonie nécrosante n'est pas un super-antigène mais détruit les polynucléaires et entraîne une nécrose du tissu pulmonaire et des muqueuses de voies aériennes. (GL. Cartolano et al, 2004).

Tableau 05 : Toxi-infections staphylococciques et toxines impliquées

Infections	Toxines
Choc toxique staphylococcique	Toxine du choc toxique staphylococcique I(TSST-1) Entérotoxines staphylococciques Get I(SEG et SEI)
Malade exfoliante généralisée	Exfoliatines Aet B(ETAet ETB)
Toxi-infection alimentaires	Entérotoxines staphylococciques Aet M(SEA et SEM)
Pneumonie nécrosante	Leucocidine de Panton-Valentine (LPV)

3. Principes du traitement des infections à S. aureus :

L'antibiothérapie des infections à SARM repose sur les pénicillines M associées ou non à un aminoside. Par voie orale, les pénicillines M ont une mauvaise biodisponibilité et une demi-vie trop courte. En cas d'allergie aux pénicillines, les alternatives sont les fluoro-quinolones, les synergistines et les lincosamides. Les échecs de traitement sont liés à la virulence du germe, aux Co-morbidités, à la présence de matériel étranger, à des foyers secondaires profonds ou à des posologies insuffisantes. (Hougardy N, 2006).

Le traitement de référence des infections à SARM repose sur les glycopeptides (vancomycine, téicoplanine) associés ou non à un autre anti-staphylococcique actif sur les SARM (tableau 05). L'émergence de souches GISA pourrait expliquer certains échecs thérapeutiques ou une réponse tardive aux glycopeptides. L'antibiothérapie d'une infection grave à GISA n'est pas codifiée. Elle nécessite des posologies élevées de glycopeptides associées à la rifampicine ou la β cotrimoxazole ou le recours à de nouvelles molécules comme le linezolid ou la quinupristinedalfopristin(Université de Paris , 2012).

Tableau 06 : Classes et molécules anti-staphylococciques,

Classes	Molécules
<p>Majeures</p> <p>β-lactamines anti-staphylococciques</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pénicilline M • Céphalosporines • Glycopeptides 	<ul style="list-style-type: none"> • Oxacilline, Cloxacilline • Céfazoline, céfamandole • Vancomycine*, Teicoplanine*
<p>Mineures</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aminosides • Rifampicine • Fluoroquinolones • Acide Fucidique • Fosfomycine • Lincosamides • Synergistines • Sulfamides 	<ul style="list-style-type: none"> • Gentamicine*, Tobramicine, Netilmicine • Rifampicine* • Ofloxacine, Ciprofloxacine • Acide fucidique* • Fosfomycine* • Clindamycine* • Pristinamycine* • Trimethoprime-sulfaméthoxazole*

*Actif sur les SARM selon antibiogramme.

- 1. L'objectif d'étude:** Dans le but d'étudier les infections nosocomiales dans un établissement public dans la wilaya de Tébessa, Nous avons fixé les objectifs suivant :
 - L'isolement et l'identification des SARM à partir des prélèvements hospitaliers
 - La résistance des souches de *S.aureus* à la méthicilline.
- 2. Cadre d'étude:** Notre prélèvement est réalisée au niveau de l'établissement public hospitalier **khaldiabdaziz** dans une période de 03 mois : de février à avril 2018 pour la recherche de souche de SARM. Les prélèvements ont été effectués au niveau de différents services.

3. Prélèvement

3.1. Prélèvement à partir des surfaces sèche

Frotter les surfaces sèches avec des écouvillons stériles préalablement humidifiées avec l'eau physiologique stérile puis introduire dans des tubes contenant du bouillon nutritif 5 ml.

3.1. Prélèvement à partir des surfaces humides

Frotter directement la surface avec l'écouvillon puis introduire ce dernier dans un tube contenant du bouillon nutritif.

Tableau 07 :dates et sites des prélèvements

Date	Service	Nature de prélèvement	N° de prélèvement
21/02/2018 11H00	Gynécologie	Poche de sérum	01
		Réfrigérateur	02
		Table mangé	03
		Poubelle	04
		Lavabo de toilette	05
		Passe à porte	06
		Extincteur	07
		Chariot médicale mobile	08
21/02/2018 13H00	GHR	Lit	09
		Ampoule de la salle des patients	10
		Draps	11
		Sol	12
		Vachette de la porte des salles	13
		Pissette d'alcool	14
27/02/2018 08H30	Après allaitement	Plat cuisinier	16
		Lit de bébé	18
		Fenêtre	19
		Sol	20
		Table à manger	17
27/02/2018 11H30	Bloc poste opératoire	Haricot	21
		Réfrigérateur	22
		Lit de bébé	24
		Bottoms	23
		Siphon	25
		Paillasse de cuisine	26
		Chauffage	27
		Fenêtre	28
		termosse	29
		ciseau	30

3. Conditions de prélèvement

Les prélèvements sont effectués au laboratoire de l'université dans les délais plus brefs, les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 heures pour l'apparition de trouble en bouillons nutritifs.

4. Isolement

A partir du milieu d'enrichissement, ensemercer les boîtes de gélose (Chapman) par l'écouvillon imbibé dans le bouillon nutritif qui a frotté à la surface de Chapman, reprendre ensuite avec pipette pasteur en faisant des stries sur la deuxième partie.

- Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures.
- Afin de confirmer la pureté des souches, nous avons effectué des repiquages successifs en alternant milieu liquide (bouillon BHIB) et milieu gélosé sélectif Chapman..(**Ross Jet al,1990**).

5. Purification et conservation

Pour obtention une culture des colonies pures et identiques, sur le plan macroscopique et morphologique (même couleur, taille, aspect...) et aussi même aspect microscopiques (formes des cellules identiques et type de Gram).

Après incubation et à partir des colonies isolées sur le différent milieu, procéder directement à la coloration de Gram et le test de catalase.

Repiquer les colonies suspectes sur bouillon nutritive et incubé à 37°C pendant 24 heures. puis conserver au réfrigérateur à -4° C. (**E. Cosgrove et al, 2005**).

6. Identification

L'identification comporte une série des étapes, se succédant le plus souvent dans un ordre déterminé ; les souches isolées ont été identifiées par des techniques microbiologiques standards (la coloration de Gram, catalase et test de coagulase).

Les résultats obtenus au cours de chaque étape permettent l'orientation des démarches ultérieures. (**S. Cosgrove et al ,2003**).

6.1.Examens macroscopiques

Sur le milieu de Chapman, les colonies jaunes entourées d'une zone jaune, mannitol+ sont des *S. aureus*, *S. saprophyticus*....

Les colonies entourées d'une zone rouge ou pourpre, mannitol- sont des *S.epidermidis*, *S. hominis*.(**S. Cosgrove et al ,2003**).

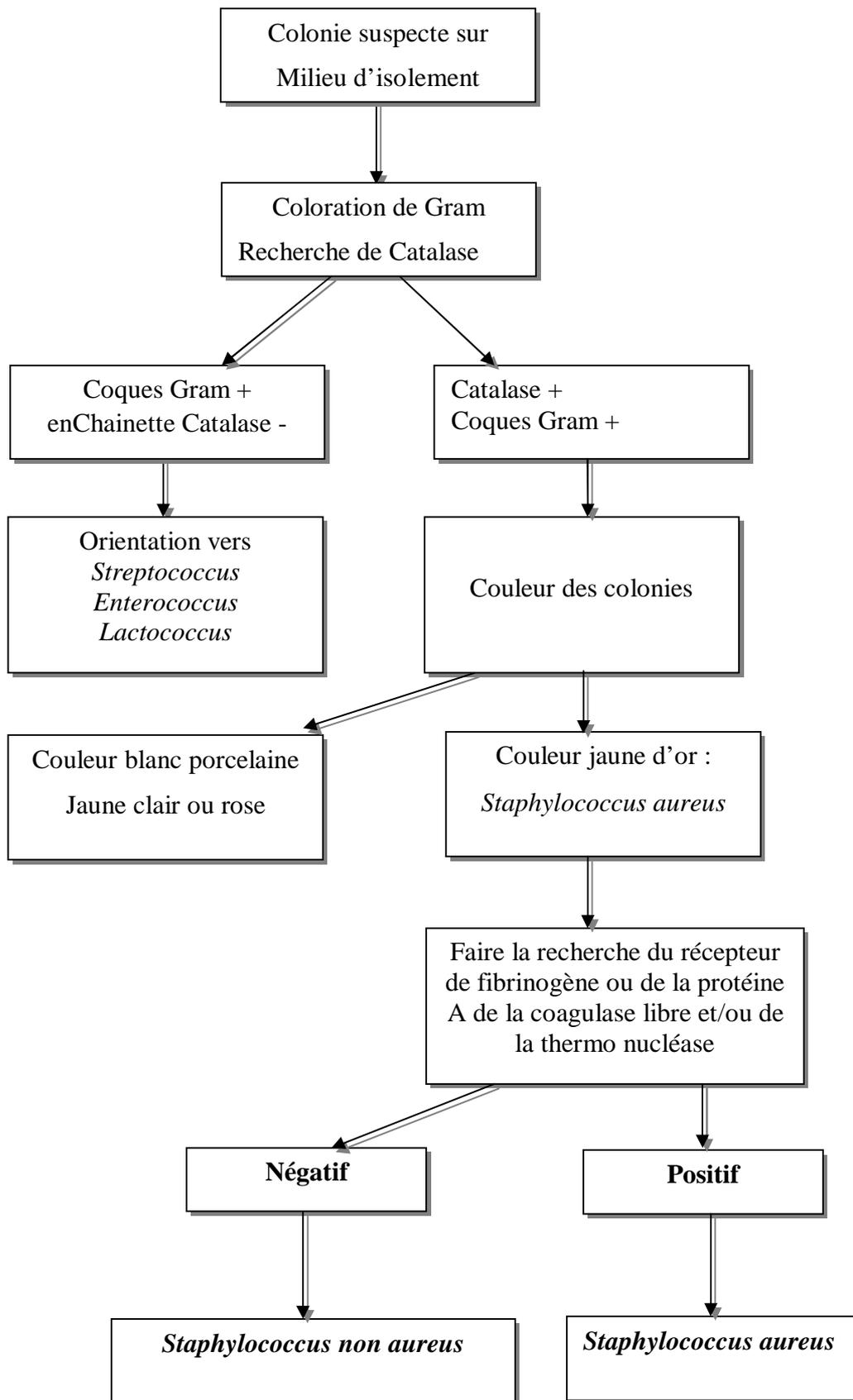


Figure 06 : Organigramme de l'identification de *Staphylococcus aureus*.

6.2. Examens microscopiques

6.2.1. Coloration de Gram

a- Principe: Le principe de la coloration de Gram repose sur les différences de composition chimique de la paroi des bactéries (1 à 2.5 % des lipides chez les bactéries à Gram positif, 10 à 22% chez les Gram négatif). (Tortora J, et al, 2003).

b- Technique

- On dépose sur une lame propre une goutte d'une suspension bactérienne;
- Faire sécher la lame par passage sur la flamme du bec benzène (fait un frotti);
- Déposer la lame sur le support au-dessus de L'évier;
- Poser des gouttes du colorant violet de Gentiane sur le frotti, laisser agir pendant 1 minute, puis rincer la lame parfaitement par l'eau;
- Recouvrir la lame une autre fois par le lugol et laisser agir une minute puis rincer à l'eau;
- Tenir la lame inclinée et faire couler pendant 30 secondes de l'alcool à 95° jusqu'à écoulement incolore, rincer immédiatement à l'eau;
- Recolorer avec de la fuchsine pendant 1 minutes ; rincer à l'eau et égoutter ;
- Égoutter entre 2 morceaux de papier buvard et laisser sécher;
- Observez avec une goutte d'huile à immersion à l'objectif X 100

c- Observation sous microscope

Sous microscope on peut observer deux types de colorant, celui de couleur rose représente les bactéries de Gram négatives et qui sont de couleur violet sont de Gram positive. Mais on observe des cellules bactériennes de différentes formes (bacille, coccobacille, cocci, diplocoques, ...).

6.3. Recherche de la catalase

a. Principe:

Cette enzyme est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire qui peuvent détruire les peroxydes H_2O_2 dont l'accumulation a un effet létal pour les bactéries.

La catalase a la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) avec dégagement d' O_2) sous forme gazeuse selon la réaction suivante. (Madian M, et al, 2007).

b. Technique

A partir d'un milieu solide et aérobie, prélever une quantité suffisante de culture et la mettre en suspension dans une goutte d'eau oxygénée déposée sur une lame.

c. Lecture

La présence de catalase est marquée par la formation immédiate des bulles d'O₂.

6.4. Recherche de la coagulase

a. Principe

La propriété de *Staphylococcus aureus* de provoquer la coagulation d'un plasma recueilli sur anticoagulant est un critère important de son identification. Elle est due à la sécrétion d'une enzyme thermostable ; la staphylocoagulase ou coagulase. La staphylocoagulase agit en liaison avec la prothrombine et en absence de calcium.

Parmi les *staphylococcus*, pratiquement seul *Staphylococcus aureus* elle possède, certaines souches de *S. aureus* peuvent en être dépourvues (10 à 15 % en milieu hospitalier), la perte de la coagulase étant souvent reliée à un traitement antibiotique.

Dans l'organisme, l'action de la coagulase est à l'origine de microcaillots de fibrine à l'intérieur desquels les bactéries peuvent proliférer à l'abri des défenses de l'organisme.

La recherche de la coagulase de *Staphylococcus* est compliquée par la présence d'un récepteur au fibrinogène provoquant l'agglutination de la souche placée dans un plasma oxalaté (on parle de coagulase « liée »). (Madian M, et al, 2007).

b. Technique

- ✓ Réaliser une culture en bouillon BHIB.
- ✓ Étuver 24h à 37°C.
- ✓ Mettre dans un tube à hémolyse 4 gouttes de bouillon agité et 4 gouttes de plasma de lapin oxalaté.
- ✓ Placer le tube au bain d'eau à 37°C durant 2 à 24h.

c. Lecture:

- ✓ Observer toutes les heures.
- ✓ Une coagulation pourra être observée par une prise en masse du liquide.

7. Antibiogramme des souches isolées

a. Principe

L'antibiogramme a été réalisé par la technique de diffusion sur milieu gélosé selon les normes préconisées par le Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI).

Les disques d'antibiotiques utilisés (Sanofi Diagnostique Pasteur, France) : Pénicilline (10 UI) ; Imipenème (10µg) ; Oxacilline (1µg) ; Céfazoline (30µg) ; Streptomycine (30µg) ; Gentamicine (10µg) ; Tobramycine (10µg), Erythromycine (15µg) ; Clindamycine (2µg) ; Fosfomycine (50µg) ; Rifampicine (15µg) ; Clindamycine (2µg); et Vancomycine (30µg) ; (Gillet Y, et al , 2002).

b. Technique

- ✓ Repiquer une colonie à partir d'une culture pure développée de 18 heures sur un milieu d'isolement dans 10 ml de bouillon Cœur Cerveau (BHIB).
- ✓ Incuber à 37° C pendant 6 à 7 heures sous agitation.
- ✓ Grâce à un colorimètre, mesurer la densité optique de l'inoculum et ajuster en ajoutant la culture s'il est très faible ou de l'eau physiologique stérile s'il est très fort, la densité optique doit être entre 0.08 et 0.1 à 625 nm équivalente à 108 UFC /ml (0,5 Mc Farland).
- ✓ Dans les 15 minutes suivant l'ajustement de la turbidité de l'inoculum, tremper un écouvillon dans cette suspension.
- ✓ Presser fermement contre la paroi intérieure du tube juste au-dessus du niveau du liquide, tourner l'écouvillon pour enlever le liquide excédentaire.
- ✓ Étaler à trois reprises sur la surface entière de la gélose, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application afin d'obtenir une distribution égale de l'inoculum.
- ✓ Appliquer les disques d'antibiotiques sur les boîtes de Pétri dès que possible à moins de 15 minutes après l'ensemencement à l'aide d'une pince stérile.
- ✓ Incuber les boîtes à 37°c pendant 18 heures

c. Lecture et interprétation

Mesurer avec précision les diamètres de chaque zone d'inhibition en mm, et classer la bactérie dans l'une des catégories : sensible, intermédiaire ou résistante.

8. Test de screening à l'Oxacilline

Le dépistage du *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline a été réalisé sur milieu Mueller Hinton additionné de 4% de NaCl et contenant une concentration finale d'Oxacilline de 6µg/ml. (Tortora J., et al, 2003).

a. **Technique:** Préparation de la solution d'oxacilline:

- Diluer 6mg d'oxacilline (poudre injectable d'un flacon de 1g) dans 10 ml d'eau distillée stérile, puis faire une solution au 1/10ème.
- Mettre 2ml de cette solution dans une boîte de Pétri de 90 mm de diamètre, ajouter 18 ml de gélose Muller Hinton additionnée de 4% de NaCl, mélanger en faisant des mouvements rotatoires.

b. **Inoculum:** à partir d'une culture pure de 24 h sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.

- Décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 MacFarland, ou à une DO de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm.
- L'ensemencement se fait par spots, en appliquant verticalement sur la gélose l'extrémité d'un écouvillon trempé dans la suspension bactérienne.
- Incuber 24 h à 37°C.

c. **Lecture**

La culture de plus d'une colonie de la souche test suffit pour indiquer une résistance à l'oxacilline, impliquant une résistance à toutes les β-lactamines.

1. Prélèvement: Au cours de la période d'étude, 30 prélèvements hospitaliers à partir de l'établissement public hospitalier **khaldiabdaziz** ont été obtenus; dont 18 souches sont considérés positifs sur les milieux utilisés. L'étude pratique a été réalisée au niveau de laboratoire de microbiologie appliquée, Département de Biologie Appliquée, **Université Cheikh Larbi Tébessi / Tébessa**.

2. Isolement et identification: Un total de 18 isolats ont été isolés et purifiés sur milieu gélose nutritive (GN) et Chapman.

2.1 Examen macroscopique: Sur les deux milieux de cultures (Chapman, gélose au sang cuit), les colonies présentant l'aspect macroscopique caractéristique du genre *Staphylococcus* ont été prélevées. Le développement bactérien sur le milieu de Chapman ne constitue qu'une indication, d'autres bactéries (Entérocoques) peuvent y cultiver. Sur ce milieu, les colonies de *Staphylococcus* apparaissent souvent pigmentées et entourées d'une aréole jaune dans le cas où le mannitol est fermenté, sinon les colonies sont de couleur blanche. Ces colonies sont arrondies à bords réguliers de 1 mm de diamètre après 24 heures d'incubation à 37°C.



Figure 07 : Colonie de *S. aureus* sur milieu Chapman



Figure 08 : Colonie de *S. epidermidis* sur milieu Chapman

Sur gélose au sang cuit, les colonies ont une couleur blanche ou jaune pigmentée, d'un diamètre variant entre 1 à 3 mm de diamètre, après 24 heures d'incubation à 37°C.



Figure 09 : Aspect des colonies de *Staphylococcus* isolées sur milieu gélose au sang.

2.1.1. Coloration de Gram: La coloration différentielle pour les souches isolées met en évidence des cocci sphériques, en grappe de raisin, en paires, colorés en violet.

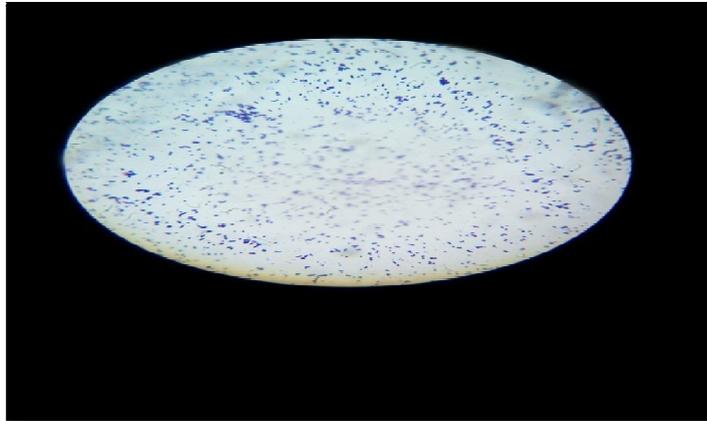


Figure 10 : coloration de Gram

2.1.2. Catalase: Le test de catalase montre une apparition des bulles avec dégagement de dioxygènes produits par une colonie mise en contact avec l'eau oxygénée.

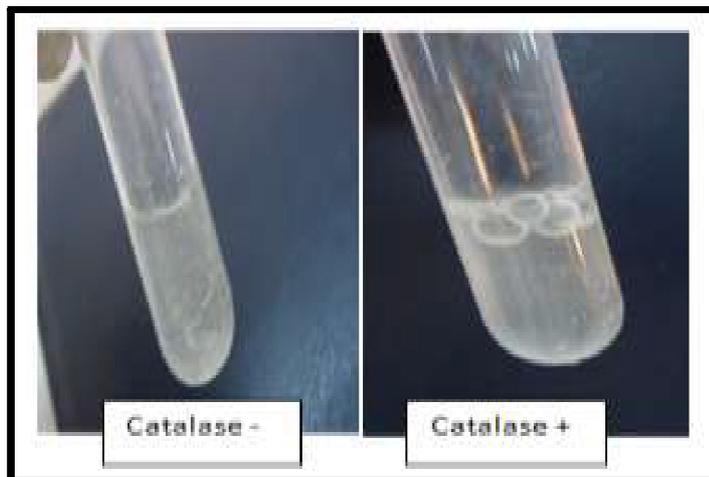


Figure 11 : Production de catalase

2.1.3. Coagulase: Les cocci à Gram positif, catalase positive, testés pour la production d'une coagulase, présentent un phénotype variable

09 souches à coagulase positive: *S. aureus*

01 souches à coagulase négative: autres espèces de staphylocoques.

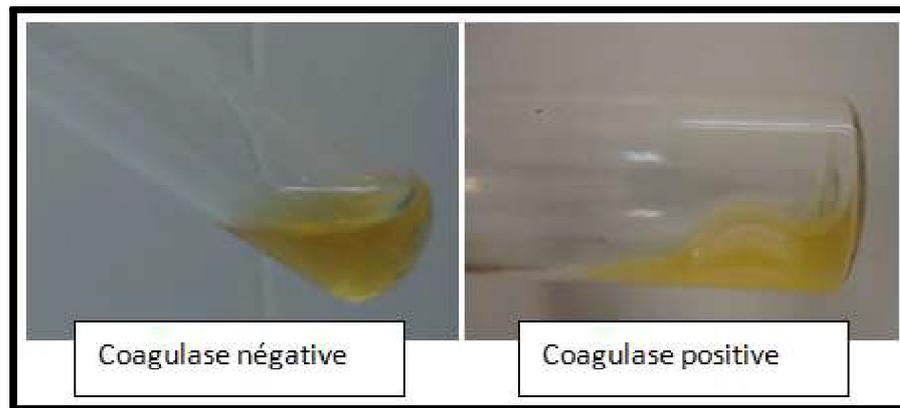


Figure 12 : Résultat du test de coagulase libre

Tableau 08 : Résultats de pré-identification par les techniques microbiologiques standards

Caractères principaux	Coloration de Gram	Test catalase	Test coagulase
10 souches	Cocci Gram positif, violette ou en grappes de raisin	Catalase positifs	9 souches: positive 1 souches: négative

Selon **David, 2010** divers enzymes peuvent être mises en évidence chez *S.aureus* telle que : la catalase qui existe chez tous les *micrococacceae*. Mais la présence d'une coagulase identifie en pratique courante l'espèce *aureus*, donc nos résultats corroborent à ceux obtenus dans les tests d'identifications biochimiques.

2.2. Répartitions des espèces selon leur nature:

L'identification des 10 souches de Staphylocoques a donné : 9 *S.aureus*, et 01 staphylocoque à coagulase négative.

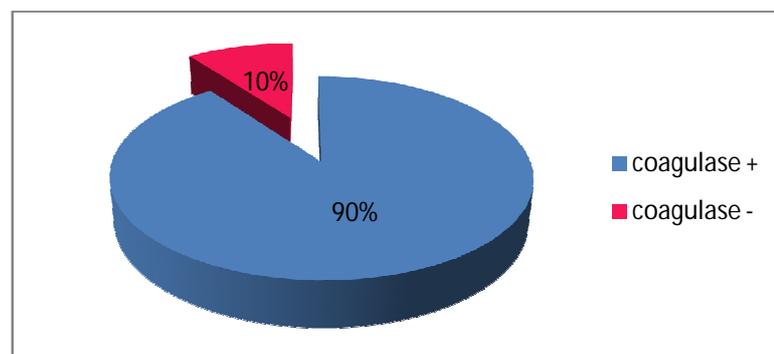


Figure 13: Répartition des Staphylococcus isolées selon leur nature (coagulase).

2.3. Fréquence d'isolement de *S. aureus*

Sur les 18 souches appartenant à la culture positive, 10 souches pures ont été identifiées à l'espèce *S.aureus* par la mise en évidence de la coagulase libre. Ce qui représente un taux de 50% sur l'ensemble des souches des Staphylocoques isolées (9/18), 90% sur la totalité des prélèvements qui sont catalase positifs (9/10) et 30% sur la totalité des prélèvements examinés (9/30) (Tableau 09).

Tableau 09: fréquence d'isolement de *S.aureus*

Echantillons	Culture positive	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>S.aureus</i>
30	18	10	9
% par rapport aux prélèvements	% par rapport aux cultures pures	% par rapport aux Staphylocoques isolées	
30%	50%	90%	

2.4. Sensibilité des souches aux antibiotiques

L'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques des espèces isolées à partir des prélèvements hospitalières de l'hôpital **khaldiabdazziz** à Tébessa, Sur 09 espèces identifiées, nous avons effectué des antibiogrammes, et les résultats obtenus sont les suivantes :

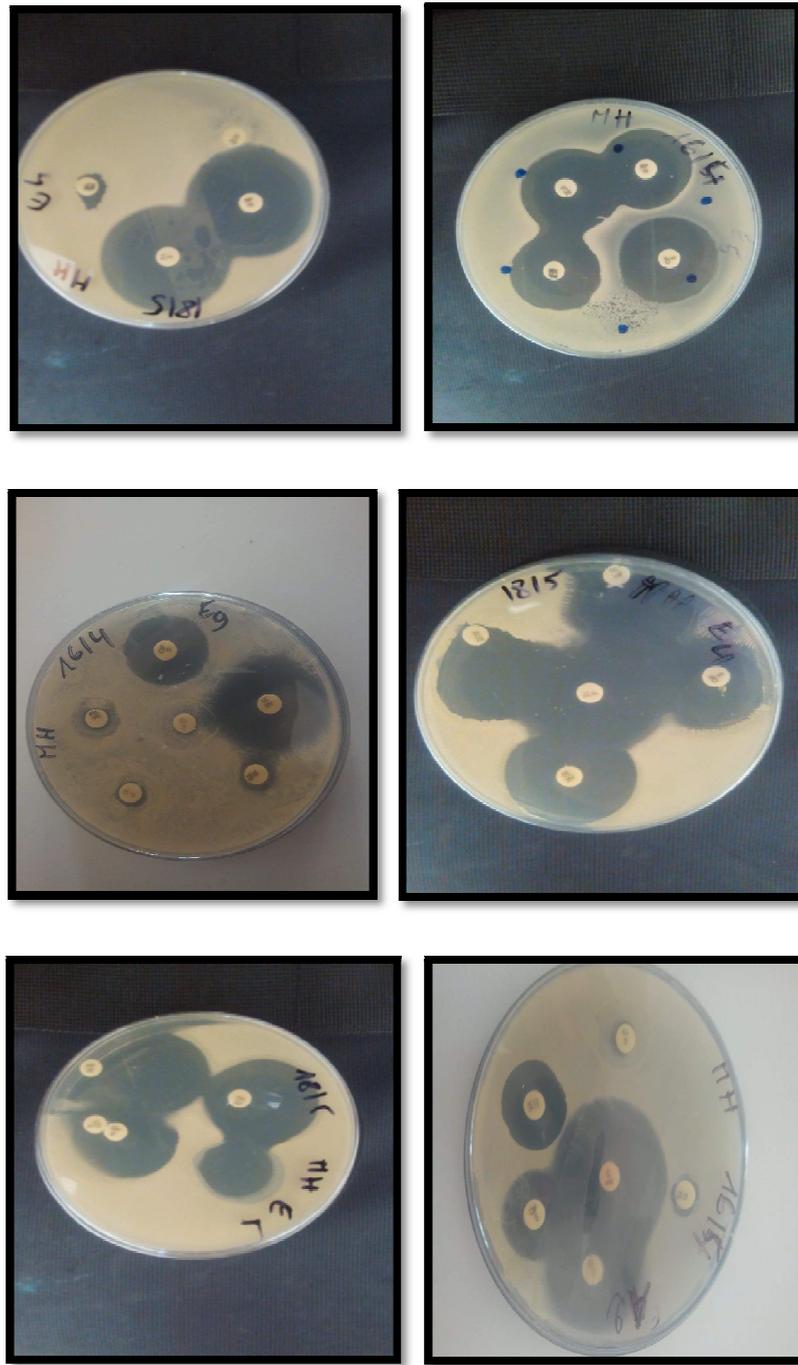


Figure 14 : Effet des disques d'antibiotiques sur des souches *S. aureus* isolées.

Tableau 10: résultat de sensibilité et résistance des *Staphylococcus aureus* aux ATB

ATB	Sensible		Intermédiaire		Résistant	
	N	%	N	%	N	%
Pénicillines (P)	4	44,44%	0	0,00%	5	55,56%
Ampicilline (AM)	1	11,11%	0	0,00%	8	88,89%
oxacillines (OX)	1	11,11%	1	11,11%	7	77,78%
Tétracycloles (TIC)	9	99,99%	0	0,00%	0	0,00%
Fluoroquinolones (FQ)	0	0,00%	0	0,00%	9	99,99%
Glycoamides (GA)	8	88,89%	1	11,11%	0	0,00%
Phénylcarbamoyles (PC)	9	99,99%	0	0,00%	0	0,00%
Streptozoles (S)	2	22,22%	2	22,22%	5	55,56%
Érythrocyclines (E)	6	66,67%	3	33,33%	0	0,00%
Vancomycines (V)	2	22,22%	0	0,00%	7	77,78%
Mitrocarbonyles (MA)	9	99,99%	0	0,00%	0	0,00%
Épigénésillines (EP)	4	44,44%	0	0,00%	5	55,56%
Ticarcillines (TC)	3	33,33%	0	0,00%	6	66,67%
Glycoamides (GT)	0	0,00%	0	0,00%	9	99,99%

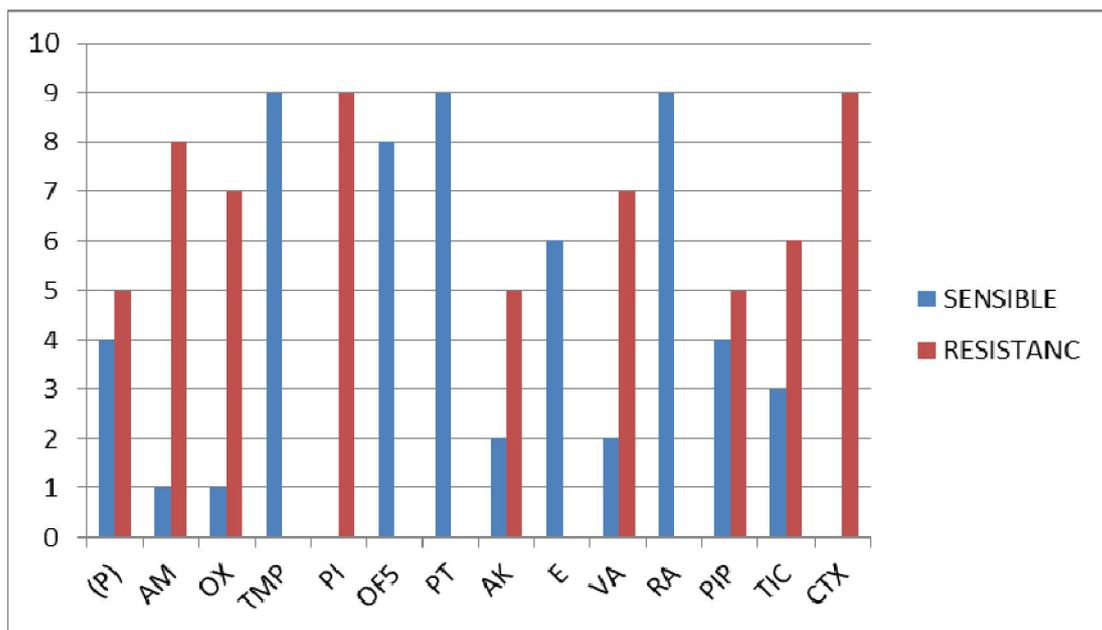


Figure 15: sensibilité et résistance des *Staphylococcus aureus* aux ATB

Les *S.aureus* présente une résistance élevée de (PI,CTX) à 100% et une résistance entre 80% et 70% pour (OX,VA,AM), on note également une moyenne résistance pour les (PIP,AK,TIC) de pourcentage 50% à 60% et aucune résistance à la (OF,RA,TMP,E,PT).

A l'opposé on peut constater que les souches sensibles à 100% (RA, TMP,PT), et une sensibilité de 80% pour (OF) et 60% à 40% pour (PIP,E) par contre une faible sensibilité à 30% -20% pour (TIC,AK,VA,AM).

En Europe 1990, selon les données du système européen de surveillance de la résistance aux ATB, le pourcentage moyen de SARM (ajusté sur la population) a diminué de façon significative au cours des quatre dernières années, témoignant d'une tendance à la baisse dans de nombreux pays européens. Bien que ce soit encourageant, le SARM reste un problème majeur de santé publique.

3. Répartition des souches SARM en fonction du prélèvement

Nos résultats montrent que les SARM sont présents dans 9 prélèvements hospitaliers, sur 30 échantillons et également que les infections à *S.aureus* sont résistantes à la méthiciline.

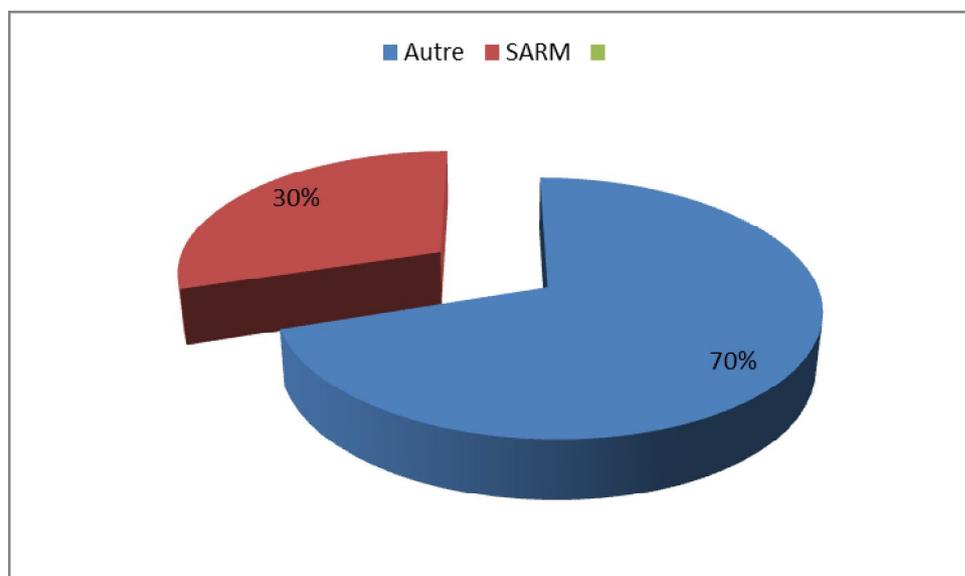


Figure 16 : Répartition des SARM par rapport aux prélèvements.

Conclusion

Les infections nosocomiales constituent un problème majeur de santé public, l'émergence de la multi résistance chez les bactéries limite le choix thérapeutique et entraîne une augmentation du taux de mortalité, une durée prolongée de séjour hospitalier et un coût élevé.

L'objectif de notre travail a été la recherche et l'identification des SARM isolées de divers prélèvements hospitaliers et leur résistance par rapport à différentes familles des ATB.

Ces souches ont été isolées de divers tissus hospitaliers, (sol, poubelle, Lit, pochette de sérum.....)

D'après l'analyse des résultats de l'antibiogramme de nos souches, nous avons trouvé que la plus part des souches sont sensibles à la plus part des antibiotiques, testé malgré la résistance aux antibiotiques devient plus élevé, la résistance des souches été observé pour certain antibiotique appartenant à la famille des β lactamines (méthicilline)

L'information et la formation de l'ensemble des professionnels de l'établissement en matière d'hygiène hospitalière doivent être assurées par un programme de lutte contre les infections nosocomiales, et enfin optimiser la surveillance de l'évolution de la résistance aux antibiotiques dans le temps afin de mieux appréhender le problème de la multi résistance pour pouvoir arrêter son émergence.

Dans notre étude la fréquence des SARM isolées reste relativement faible

Par rapport à ce qui a été rapporté par d'autres travaux. Cela n'empêche pas une surveillance régulière de l'état de sensibilité du *S.aureus* par les autorités sanitaires afin de limiter la diffusion des souches résistantes au sein des établissements hospitaliers.

Références bibliographiques

-A-

- ALFANDARI S. Infections nosocomiales. Épidémiologie, critères du diagnostic, prévention et principe du traitement. Impact internat : Maladies infectieuses. Dec 1997. N°4 : 161-168.
- A. Manzur , M. Vidal, M. Pujol, M. Cisnal, A. Hornero, C. Masuet , C. Pen, F. Gudiol, J. Ariza. Predictive factors of meticillin resistance among patients with *S.aureus* bloodstream infections at hospital admission. J Hosp Infect 2007;66: 135-41.
- ASTRAGNEAU P. Epidémiologie des infections nosocomiales. Rev Prat.1998 ; 48 : 1525-

-B-

- BERCHE P, GALLARD J. L, SIMONNET M. les infections nosocomiales d'origine bactérienne et leur prévention. Bactériologie des infections humaines de la biologie à la clinique. Paris : Flammarion, 1991 : 64-71.
- B.J. Kopp, D.E. Nix, E.P. Armstrong. Clinical and economic analysis of methicillin susceptible and -resistant *S.aureus* infections. Ann Pharmacother 2004;38: 1377-82.
- Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, et al. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. Lancet.2002; 359:1819-1827.-
- Boden, MK., Flock, JI. Fibrinogen-binding protein/*clumping factor* from *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. 1989; 57 (8), p2358-2363.
- Bhakdi S, Fussle R, Trantum-Jensen J. Staphylococcal alpha-toxin: oligomerization of hydrophilic monomers to form amphiphilic hexamers induced through contact with deoxycholate detergent micelles. Proc Natl Acad Sci USA 1981 ; 78 (9) : 5475-5479.
- Beaucaire G. Infections nosocomiales. Épidémiologie, critères du diagnostic, prévention et principe de traitement. Rev Prat, 1997, 47:201-209.

- Bouvet P J M Et Crimont Pad. Acinetobacter. In : Le MINOR L et VERON M, Edition. Bactériologie Médicale. Paris : Flammarion, 1989 ; 599-604.

-Brun Y, Bes M. *Staphylococcus*. In: Précis de bactériologie clinique (ed. Freyney J RF, Hansen W, Bollet C), (2000): 783-830. ESKA, Paris.

- Burnichon N., Texier A. (20 juin 2003). L'antibiogramme: la détermination des sensibilités aux antibiotiques

-C-

- S. Cosgrove, G. Sakoulas, E. Perencevich , M.J. Schwaber, A.W. Karchmer, Y.Carmeli. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *S.aureus* bacteremia: a meta-analysis. Clin Infect Dis 2003;36: 53-9.

- Canadian journal of infectious diseases in medicine and microbiology, Guidelines for the prevention and management of CA-MRSA: A perspective for Canadian health practitioner , Vol 17, suppl,C, September /October 2006.

- Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, et al. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. Clin Infect Dis (2003) 36: 53-59.

-D-

- Delarras C. Microbiologie pratique pour le laboratoire. Paris: Lavoisier ; 2007.

- Downer R, Roche F, Park Pw, MechamRp, Foster Tj. The elastin-binding protein of *S.aureus* (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein. J Biol Chem 2002 ; 277 (1) : 243-250.

- Desenclos J.C. L'avenir des infections transmises par les vecteurs en France. Med Mal inf. 2011 Juin;41,6:293-294.

- Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev (2000) 13: 16-34, table of contents.

-E-

- El Kour, D. P. (2003). Infections à staphylocoques : aspects cliniques et bactériologiques. *EMC, maladies infectieuses*, [8-007-A-10].

-F-

-Foster Tj, Mcdevitt D. Surface-associated proteins of *S.aureus*: their possible roles in virulence. *FEMS Microbiol Lett* 1994 ; 118 (3) : 199-205.

-Foster Tj, Hook M. Surface protein adhesins of *S.aureus*. *Trends Microbiol* 1998 ; 6 (12) : 484-488.

-Freney J. Staphylocoque. In: Précis de bactériologie clinique. Paris Eska; 2000. p. 786-819.

24.FAGON JY. Pneumopathies nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*. *Med Mal Inf.*, 1998 ; 28 :159-66.

-G-

-GL. Cartolano, M. Cheron, D. Benabid, M. Leneveu, A. Boisivon. Methicillin-resistant *S.aureus* (MRSA) with reduced susceptibility to glycopeptides ((GISA) in 63 French hospitals. *Clin Infect Dis* 2004;10: 448-51.

-Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* (2002) 359: 753-759.

-GAN et JMADI.MARTINKO. Brok. biologie de micro-organisme (11 édition) pp :109-69

-H-

- Hanna Sikorska, Wanda Smoragiewicz. Role of probiotics in the prevention and treatment of methicillin-resistant *S.aureus* infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Volume Issue 6, December 2013, Pages 475-481.

- H. Wisplinghoft, T. Bischoft, S.M. Tallent, H.Seifert, R.P. Wenzel. Nosocomial Bloodstream Infection in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a prospective Nationwide Surveillance Study. *Clin Infect Dis* 2004 ; 39 : 309-18.+6+

- Hamza R. Epidémiologie des infections associées aux soins. Revue tunisienne d'infectiologie 2010 ; Vol 4 : 1-4.

- Holden MT, Feil EJ, Lindsay JA, et al. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;101:143-144.

-Hougardy N, Louahabi A, Goffinet P. Détection directe et rapide du portage de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline par extraction automatisée de l'acide nucléique et PCR en temps réel. PATBIO. 2006 Oct;54:477-481.

-k-

33. Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet. 2001;257:1225-1240.

-L-

-Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest (2003): 1265-1273.

-Lowy Fd. *S. aureus* infections. N Engl J Med 1998; 339 (8) : 520-532.

-Leclercq R., Courvalin P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. Antimicrob Agents Chemother. 1991; 35 : 1267-72.

-M-

-Madian M., Martinko J. (2007). Brock : biologie des microorganismes 11^e édition, Pearson. Paris. Page: 1047.

-N-

-NFV 08- 057- 1. Janvier 2004. Microbiologie des aliments. Méthode de routine pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces). Partie 3: Recherche et méthode NPP pour les faibles nombres

-P-

- Prescott L.M, Harley J.P, Klein D. Microbiologie. 2ème Edition Française. De BoeckUniversité. 2010.

-POPI. Maladies infectieuses. Paris : APPIT ,1999 :159-169.

-R-

- Ross J.I., Eady E.A., Cove J.H., Cunliffe W.J., Baumberg S., Wootton J.C. Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport supergene family. MolMicrobiol. 1990; 4 : 1207-14.

-S-

-S.E. Cosgrove, Y. Qi, K.S. Kaye, S. Harbarth, A.W. Karchmer, Y. Carmeli. The impact of methicillin resistance in *S.aureus* bacteremia on patient outcomes : mortality, length of stay, and hospital charges. Infect Control HospEpidemiol2005 ; 26 :166–74.

-S. Cosgrove, G. Sakoulas, E. Perencevich , M.J. Schwaber, A.W. Karchmer, Y. Carmeli. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin susceptible *S.aureus* bacteremia : a meta-analysis. Clin Infect Dis 2003 ; 36 : 539.

-Sakoulas G, Moellering Jr. RC. Increasing antibiotic resistance among methicillin resistant *S.aureus* strains. Clin Infect Dis 2008;46(suppl5):S360-S367.

-Switalski Im, PATTI JM, Butcher W, gristina AG, SpezialeP, hook M.A collagen receptor on *S.aureus* strains isolated from patients with septic arthritis mediates adhesion to cartilage. MolMicrobiol1993 ; 7 (1) : 99-107.

-Stephen H. Gillespie, Hawkey P, M2006. Principales and practice of clinical Bacteriology 2ème Edition. Wiley office ,England. pp.586

-T-

-Tasseau F. Et Baron D. Infections nosocomiales. In : BRUKER Get FASSIN D, eds. Santé publique. Paris : Ellipses, 1989 ; 478-79.

- Tortora J., et al. (2003). Introduction a la microbiologie, 2e, ERPI (Edition Du

Renouveau Pédagogique INC). Canada. Page: 338-344.

-U-

-Université de Paris V. OBSERVATION CLINIQUE B15-OBS 07 [en ligne], <http://desbiol.univ-paris5.fr/B15-obs07/index.html>, consulté en novembre 2012.

-W-

- Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, Van Leeuwen W, Van Belkum A, Verbrugh HA, et al. The role of nasal carriage in *S.aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 2005;5:751-62.

-Wisplinghoff H, Rosato AE, Enright MC, Noto M, Craig W, Archer GL. Related clones containing SCCmec type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3574-9.

-Wolff M. The management of treatment failures for staphylococcal infections. *Ann Fr Anesth Reanim* (2002) 21: 418-423.

-Wondrack L, Massa M, Yang B.V, Sutcliffe J. Clinical strain of *Staphylococcus aureus* inactivates and causes efflux of macrolides. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 992-8.

-<http://medstudenti.webs.com/microbiologija.htm>, consulté en novembre 2012.

<https://www.google.dz/search=infection+cutan%C3%A9e+infection++cuqs=chrom.1.69i57j59j0j7&sourceid=UTF-8>

Annexe 01

Compositions des milieux utilisés

1-Gélose nutritive (GN)

➤ Extrait de viande.....	1,0 g/l
➤ Extrait de levure	2,5 g /l
➤ Peptone	5,0 g /l
➤ Chlorure de sodium	5,0 g /l
➤ Agar.....	15,00g /l

Préparation

- Dissoudre 25 g de poudre de gélose nutritif dans un litre d'eau distillée
- Auto-claver à 121 °C pendant 15 minutes
- Repartir dans des tubes stériles
- PH final 7,4± 0,2

2-milieu Chapman

Peptone.....	10,0g/l
Extrait de viande bœuf.....	1,0g/l
Chlorure de sodium.....	75,0g/l
Mannitol.....	10,0g/l
Rouge de phénol.....	0,025g/l
Agar.....	15,0g/l

Préparation

- Mettre en suspension 111,0 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution
- Repartir le milieu dans des flacons
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes

3- Gélose Mueller- Hinton (MH)

Infusion de viande de bœuf	300 ml/l
Peptone de caséine	17,5g /l
Amidon de maïs.....	1,5 g /l
Agar	17,0 g /l

Préparation

- Pour préparer ce milieu il faut peser 38g de poudre et la mélanger dans 1L d'eau
- Faire une homogénéiser puis chauffer en agitant. Il faut porter à ébullition pendant environ une minute
- Ensuite on stérilisé la gélose a l'autoclave durant 15 minutes à 121,1°C
- pH = 7,4

4- Bouillon nutritif

Extrait de viande.....	1,0g/l
Extrait de levure.....	2,5g/l
Peptone.....	5,0g/l
Chlorure de sodium.....	5,0g/l

Préparation

- Dissoudre 25 g de poudre de gélose nutritif dans un litre d'eau distillée
- Auto-claver a 121 C° pendant 15 minutes
- Repartir dans des tubes stériles
- PH final 7,4 ±0,2

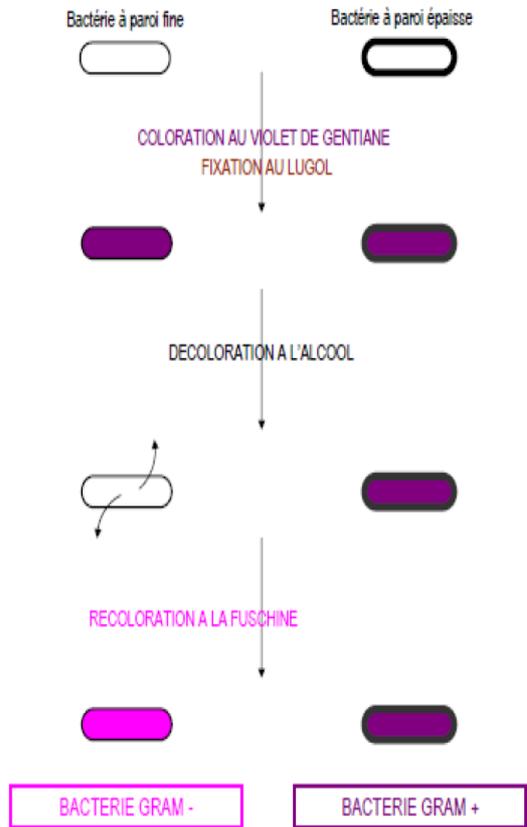
Annexe 02

Les réactifs et les produits chimiques

Réactifs et colorants	Compositions
Eau oxygénée (H ₂ O ₂)	Solution de peroxyde d'hydrogène a 10 volumes, soit 0,95 mol.dm ³
Fuchsine	Fuchsine basique.....10g Phénol..... 50g Ethanol a 0,95.....100 cm ³ Eau distillée..... 1dm ³
Lugol	-Iode..... 1 g -Iodure de potassium2g -Eau distillée qsp..... 1dm ³
Violet de gentiane	-phénol.....2.0g -violet de gentiane.....1.0g -éthanol à 90°10ml -eau distillée.....100ml

Annexe 03

Coloration de Gram



Nom et prénom :

SelmaneRomaissa

Année de soutenance : 2018

Titre : Recherche et Identification des SARM isolées de divers prélèvements hospitalières

Résumé :

L'analyse de 30 échantillons issus des prélèvements hospitaliers dont l'objectif est d'isoler, identifier les SARM et tester leurs résistances et sensibilités aux antibiotiques, a montré la présence de 09 SARM avec un pourcentage de 30%.

L'isolement et l'identification des souches de *S. aureus* ont été fondés sur les méthodes conventionnelles. La résistance à la méthicilline de ces souches a été détectée par la méthode de diffusion en milieu gélosé de Mueller-Hinton accompagné d'un dépistage à l'oxacilline (6µg/ml). Nous avons également étudié la résistance de ces souches à diverses familles d'antibiotiques.

Mots clés : SARM, prélèvements hospitaliers, Antibiotiques.

Abstract

The analysis of 30 samples from hospital specimens; the objective of which is to isolate, identify MRSA and test their resistance and sensitivities to antibiotics, showed the presence of 09 MRSA with a percentage of 30% isolation and identification of *S. aureus* strains were based on conventional methods. Methicillin resistance of these strains was detected by the Mueller-Hinton agar diffusion method accompanied by oxacillin screening (6 µg/ml). We have also studied the resistance of these strains to various families of antibiotics.

Key Words : MRSA, Hospital specimens, Antibiotics.

ملخص

تحليل 30 عينة من عينات المستشفى و الهدف منها هو عزل و تحديد SARM و إختبار مقاومتها و حساسيتها

للمضادات الحيوية أظهر وجود 9 SARM بنسبة 30%.

إتمدت العزلة و تحديد سلالات *S.aureus* على الطرق التقليدية تم الكشف عن مقاومة *méthicilline* من هذه

السلالات من خلال Gélose Mueller-Hinton ترافقه فحص *oxacilline* (6µg/ml). لقد درسنا أيضا مقاومة

هذه السلالات للعديد من المضادات الحيوية.

كلمات مفتاحية: عينات استشفائية، مضاد حيوي، SARM.