

**République Algérienne Démocratique et  
Populaire**

**Ministère de l'enseignement supérieur  
et de la recherche scientifique**

**Université IBN KHALDOUN- Tiaret-  
Faculté des sciences vétérinaires  
Département des sciences vétérinaires**

**MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES**

**En vue de l'obtention du diplôme de docteur en  
Médecine Vétérinaire sous le thème suivant**

---

**L'ANTIBIORESISTANCE DES S-AUREUS D'ORIGINE  
DE LAIT MAMMITEAUX DES VACHES DANS LA  
REGION DE TIARET**

---

**Présentées par :  
BOUCHACHIA FATIHA  
BOUZID HAFIDA**

**Encadré par :  
Dr : BOURABEH.A**

**ANNEE UNIVERSITAIRE : 2010-2011**

# **SOMMAIRE**

**REMERCIEMENT**

**DÉDICACES**

**LISTE DES TABLEAUX**

**LISTE DES FIGURES**

**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

## **ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES**

**INTRODUCTION**

**CHAPITRE I : PURIFICATION ET IDENTIFICATION DE S- AUREUS**

<b>I- CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES</b>	<b>01</b>
<b>I.1- CARACTÈRES CULTURAUX</b>	<b>01</b>
<b>I.1.1- EN GÉLOSE NUTRITIVE</b>	<b>01</b>
<b>I .1.2- EN GÉLOSE AU SANG</b>	<b>01</b>
<b>I.1.3- EN BOUILLON NUTRITIVE</b>	<b>01</b>
<b>I.1.4- MILIEU DE CHAPMAN</b>	<b>01</b>
<b>I.2- EXAMEN MACROSCOPIQUE</b>	<b>01</b>
<b>I.3- EXAMEN MICROSCOPIQUE</b>	<b>02</b>
<b>II -CARACTÈRES BIOCHIMIQUES</b>	<b>02</b>
<b>II.1- L'API SYSTÈME 20 E (OU L'API STAPH)</b>	<b>02</b>
<b>II.2- TEST DE CATALASE</b>	<b>02</b>
<b>II.3-TEST DE CITRATE</b>	<b>03</b>

<b>II.4-TEST DE H<sub>2</sub>S<sub>8</sub></b>	<b>03</b>
<b>II.5-TEST DE TOLÉRANCE À 7,5 % DU NA CL</b>	<b>03</b>
<b>II.6-TEST DE MANNITOL MOBILITÉ</b>	<b>03</b>
<b>II.7-RECHERCHE DE TYPE D'HÉMOLYSINE</b>	<b>04</b>
<b>III-POUVOIR PATHOGÈNE</b>	<b>04</b>
<b>III.1-LA RENCONTRE</b>	<b>04</b>
<b>III.2-CONTAGIOSITÉ ET MODE DE TRANSMISSION</b>	<b>04</b>
<b>III.2.1-TRANSMISSION DIRECT</b>	<b>04</b>
<b>III.2.2-TRANSMISSION INDIRECT</b>	<b>04</b>
<b>III.3-FACTEURS DE VIRULENCE</b>	<b>04</b>
<b>III.3.1- CONSTITUANTS DE LA PAROI</b>	<b>04</b>
<b>III.3.1.1- CAPSULE</b>	<b>05</b>
<b>III.3.1.2- MURINE</b>	<b>05</b>
<b>III.3.1.3- LA PROTÉINE A</b>	<b>05</b>
<b>III.3.2- LES ENZYMES</b>	<b>05</b>
<b>III.3.2.1- COAGULASSE</b>	<b>05</b>
<b>III.3.2.2- CATALASE</b>	<b>05</b>
<b>III.3.2.3- HYALURONIDASE</b>	<b>06</b>
<b>III.3.2.4- LA B- LACTAMES</b>	<b>06</b>
<b>III.3.1- LES TOXINES</b>	<b>06</b>
<b>III.3.1.1- CYTOLYSINES</b>	<b>06</b>
<b>a- STAPHYLOLYSIUE (HÉMOLYSINE)</b>	<b>06</b>
<b>b- LEUCOCIDIVE (PANTOUM ET VALENTINE)</b>	<b>06</b>

<b>III.3.1.2- LES ENTEROTOXINES</b>	<b>06</b>
<b>a- LES ENTÉROTOXINE B</b>	<b>07</b>
<b>b- LES ALPHA-TOXINES</b>	<b>07</b>
<b>III.3.1.3-TSST-1(TOXINE RESPONSABLE DU CHOC TOXINE)</b>	<b>07</b>
<b>a-CHOC</b>	<b>07</b>
<b>b- SUPER ANTIGÈNE</b>	<b>08</b>
<b>III.4- LES INFECTIONS STAPHYLOCOQUES</b>	<b>08</b>
<b>III.4.1- LES INFECTIONS CAUSÉES PAR LES STAPHYLOCOQUES LUI MÊME</b>	<b>08</b>
<b>III.4.1.1- INFECTION DE LA PEAU ET DES TISSUS MOUS</b>	<b>08</b>
<b>a- FURONCLES (GROS BOUTON)</b>	<b>08</b>
<b>b- IMPÉTIGO</b>	<b>08</b>
<b>c- LA BACTÉRIÉMIES À STAPHYLOCOQUE</b>	<b>08</b>
<b>III.4.1.3- ENDOCARDITES</b>	<b>09</b>
<b>III.4.1.4- MUSCLES ET SQUELETTE</b>	<b>09</b>
<b>a-OSTÉOMYÉLITE ET MYOSITES INFECTIEUSE</b>	<b>09</b>
<b>III.4.1.5- STAPHYLOCOCCIES VISCÉRALES</b>	<b>09</b>
<b>III.4.1.6-TRACTUS URO-GÉNITALE</b>	<b>09</b>
<b>III.4.1.7- DES INFECTIONS DE TRACTUS SYSTÈME NERVEUX CENTRAL</b>	<b>09</b>
<b>III.4.2- LES INFECTIONS CAUSÉES PAR LES TOXINES DU STAPHYLOCOQUE</b>	<b>09</b>
<b>III.4.2.1-SYNDROME DU CHOC TOXIQUE</b>	<b>10</b>
<b>III.4.2.2-INTOXICATIONS ALIMENTAIRES</b>	<b>10</b>
<b>III.4.2.3-SYNDROME DE LYELL</b>	<b>11</b>
<b>IV- DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE</b>	<b>11</b>

<b>IV.1-BACTÉRIOLOGIQUE</b>	<b>11</b>
<b>IV.1.1- ISOLEMENT</b>	<b>11</b>
<b>IV.1.2- IDENTIFICATION</b>	<b>11</b>
<b>IV.1.3- ANTIBIOGRAMME</b>	<b>11</b>
<b>IV.1.3.1- LES CONDITIONS DE L'ANTIBIOGRAMME</b>	<b>11</b>
<b>a- MILIEU DE CULTURE</b>	<b>12</b>
<b>b- BACTÉRIE</b>	<b>12</b>
<b>c- ANTIBIOTIQUE</b>	<b>12</b>
<b>IV.1.3.2-LA LECTURE</b>	<b>13</b>
<b>IV.2- SÉROLOGIQUES</b>	<b>13</b>
<b>IV.3- TYPAGE ANTIGÉNIQUE ET ÉTUDE LYTOTYPIQUE</b>	<b>13</b>
<b>IV.4- PCR</b>	<b>13</b>
<b>CHAPITRE II : STAPH ET LES ANTIBIOTIQUES</b>	
<b>I- LA RÉSISTANCE BACTÉRIENNE AUX ANTIBIOTIQUES</b>	<b>14</b>
<b>I.1- RÉSISTANCE NATURELLE</b>	<b>14</b>
<b>I.2- RÉSISTANCE ACQUISE</b>	<b>14</b>
<b>I.2.1- RÉSISTANCE PAR MUTATION CHROMOSOMIQUE</b>	<b>15</b>
<b>I.2.2- RÉSISTANCE PAR ACQUISITION DE MATÉRIEL GÉNÉTIQUE EXOGÈNE</b>	<b>15</b>
<b>a- CONJUGAISON</b>	<b>16</b>
<b>b- TRANSFORMATION</b>	<b>16</b>
<b>c-TRANSDUCTION (TRANSDUCTION)</b>	<b>16</b>
<b>I.2.3- RESISTANCE MIXTE</b>	<b>16</b>
<b>I.2.4- RESISTANCE CROISEE</b>	<b>16</b>
<b>II- MECANISMES DE RESISTANCE</b>	<b>16</b>
<b>II.1- EN FONCTION DE LA STRUCTURE ANTIGENIQUE</b>	<b>16</b>

<b>II.1.1- RÉSISTANCE PAR DIMINUTION DE LA PÉNÉTRATION OU PAR AUGMENTATION DE L'EXCRÉTION D'UN ANTIBIOTIQUE</b>	<b>17</b>
<b>II.1.2- RÉSISTANCE PAR MODIFICATION DE LA CIBLE</b>	<b>17</b>
<b>II.2- LA RESISTANCE EN FONCTION DES REACTIONS BIOCHIMIQUES</b>	<b>17</b>
<b>II.2.1- RÉSISTANCE PAR INACTIVATION ENZYMATIQUE DE L'ANTIBIOTIQUE</b>	<b>17</b>
<b>II.2.2- RÉSISTANCE PAR MODIFICATION DU MÉTABOLISME</b>	<b>17</b>
<b>III- EVALUATION DE L'ANTIBIORÉSISTANCE</b>	<b>18</b>
<b>III.1- LES TESTS DE SENSIBILITÉ</b>	<b>18</b>
<b>III.1.1- MÉTHODE PAR DILUTION</b>	<b>18</b>
<b>a- MÉTHODE PAR DILUTIONS SUCCESSIVES EN MILIEU SOLIDE</b>	<b>19</b>
<b>b- MÉTHODES PAR DILUTIONS SUCCESSIVES EN MILIEU LIQUIDE</b>	<b>19</b>
<b>III.1.2- MÉTHODE PAR DIFFUSION</b>	<b>19</b>
<b>a- PRINCIPE</b>	<b>19</b>
<b>b- ETABLISSEMENT DE LA COURBE DE CORRÉLATION ET DE DÉFINITION DES CATEGORIES</b>	<b>20</b>
<b>c- MISE EN ŒUVRE</b>	<b>21</b>
<b>d- AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS</b>	<b>21</b>
<b>IV- LES ANTIBIOTIQUES A TESTES ET LEURS MODES D'ACTION</b>	<b>22</b>
<b>IV.1- LES ANTIS STAPHYLOCOCCIQUES</b>	<b>22</b>
<b>IV.2- LES BÊTA-LACTAMINES</b>	<b>22</b>
<b>a- À RETENIR</b>	<b>22</b>
<b>IV.2.1- MÉCANISMES DE RÉSISTANCE</b>	<b>22</b>
<b>IV.2.1.1- RÉSISTANCE À LA PÉNICILLINE PAR PRODUCTION DE PÉNICILLINASE</b>	<b>23</b>
<b>a- INTERPRÉTATION DE L'ANTIBIOGRAMME ET RÉPONSE AU CLINICIEN</b>	<b>23</b>
<b>b- À RETENIR</b>	<b>23</b>
<b>IV.2.1.2- MÉTICILLINO-RÉSISTANCE PAR MODIFICATION DE CIBLE</b>	<b>24</b>
<b>a- INTERPRÉTATION DE L'ANTIBIOGRAMME ET RÉPONSE AU CLINICIEN</b>	<b>24</b>
<b>b- À RETENIR</b>	<b>24</b>

<b>IV.2.1.3- RÉSISTANCE « BORDERLINE »</b>	<b>24</b>
<b>IV.2.1.4- LES AMINOSIDES</b>	<b>25</b>
<b>a- DÉTECTION ET LECTURE INTERPRÉTATIVE</b>	<b>27</b>
<b>b- À RETENIR</b>	<b>27</b>
<b>IV.2.1.5- LES GLYCOPEPTIDES</b>	<b>27</b>
<b>a- MÉCANISMES ET DÉFINITIONS DE LA RÉSISTANCE</b>	<b>27</b>
<b>b- SOUCHES DE SENSIBILITÉ DIMINUÉE AUX GLYCOPEPTIDES</b>	<b>27</b>
<b>c- DÉTECTION</b>	<b>28</b>
<b>IV.2.1.6- LES MACROLIDES-LINCOSAMIDES STREPTOGRAMINES</b>	<b>31</b>
<b>a- MÉCANISMES DE RÉSISTANCE</b>	<b>31</b>
<b>b- DÉTECTION ET LECTURE INTERPRÉTATIVE</b>	<b>32</b>
<b>IV.2.1.7- LES QUINOLONES</b>	<b>33</b>
<b>a- MÉCANISMES DE RÉSISTANCE</b>	<b>33</b>
<b>IV.1 .2.8- LES AUTRES ANTIBIOTIQUES</b>	<b>34</b>
<b>a- SULFAMIDES ET TRIMÉTHOPRIME</b>	<b>34</b>
<b>b- ACIDE FUSIDIQUE</b>	<b>34</b>
<b>c- RIFAMPICINE</b>	<b>34</b>
<b>d- OXAZOLIDINONES</b>	<b>35</b>
<b>e- LIPOPEPTIDE</b>	<b>35</b>
<b>f- GLYCYLCYCLINE</b>	<b>35</b>
<b>g- LES PHÉNOTYPES ASSOCIÉS DE RÉSISTANCE</b>	<b>35</b>

## **ETUDES EXPERIMENTALES**

<b>I-LIEU D'ACCES</b>	<b>36</b>
<b>II-MATERIELS ET METHODES</b>	<b>36</b>

<b>II.1-PROTOCOLE DE PRELEVEMENT</b>	<b>36</b>
<b>II.2- PURIFICATION DE GENRE DE S-AUREUS</b>	<b>36</b>
<b>II.2.1 COLORATION SIMPLE</b>	<b>36</b>
<b>II.2.2 COLORATION DE GRAM</b>	<b>36</b>
<b>II-3- IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE DE S-AUREUS</b>	<b>37</b>
<b>II.3.1 TEST DE CATALASE</b>	<b>37</b>
<b>II.3.2 TEST DE CITRATE</b>	<b>37</b>
<b>II.3.3 TEST DE H2S</b>	<b>37</b>
<b>II.3.4 TEST DE MANNITOL DE MOBILITE</b>	<b>37</b>
<b>II.3.5 COSERVATION DE LA BACTERIE</b>	<b>37</b>
<b>II-4- REALISATION D'ANTIBIOGRAMME</b>	<b>38</b>
<b>II.4.1CHOIX DES ANTIBOITIQUES</b>	<b>38</b>
<b>III- LES RESUTATS</b>	<b>38</b>
<b>III.1.PURIFICATION DU GENRE DE S-AUREUS</b>	<b>38</b>
<b>III.1.1 OBSERVATION MACROSCOPIQUE</b>	<b>38</b>
<b>IV.1.2 OBSERVATION MICROSCOPIQUE</b>	<b>38</b>
<b>III.2. IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE DE LA SOUCHE</b>	<b>39</b>
<b>III.2.1 TEST DE CATALASE</b>	<b>39</b>
<b>III.2.2 TEST DE CITRATE</b>	<b>39</b>
<b>III.2.3 TEST DE H2S</b>	<b>39</b>
<b>III.2.3 TEST DE MANNITOL DE MOBILITE</b>	<b>39</b>
<b>III.3 RESULTAT D'ANTIBIOGRAMME</b>	<b>39</b>
<b>IV. DUSCUSSION</b>	<b>45</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>46</b>
<b>CONCLUSION</b>	



# **REMERCEMENT**

*Nous voulons exprimer vivant nos gratitudee et nos sincères remerciements à toutes les personnes qui d'une façon directe ou indirecte, qui ont participé à la réalisation de ce travail en particulier à notre encadreur Dr : BOURABAH qui n'a pas cessé de nous guider avec ses précieux conseils en nous transmettant son savoir.*

*Nous exprimons toute notre sympathie à tous les responsables et les enseignants de l'institut des sciences vétérinaires pour leurs compétences durant nos années d'études en particulier :*

*Dr BEN AMEUR KADA*

*Dr SANNIA*

*Dr HAMOUDI*

*Dr MOUSSA*

# ***Dédicaces***

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mon très cher père qui m'a constamment témoigné ces sacrifices et bonification et pour toute les prières qu'il a manifesté afin qu'il me voit réussir.*

*A ma généreuse et merveilleuse mère qui a été chaleureusement présente avec beaucoup de tendresse dans les moments les plus difficiles et qui m'a entouré de chaleur pleine de sacrifice pour ma réussite.*

*A mes frères, mes sœurs qui m'ont aidé de loin et de proche et qui m'ont soutenu le long de mes études.*

*A mon adorable neveu : ABDOU et mes belles nièces : FATI et ISRAE.*

*A mes chers amis en particulier :*

*HAFIDA, AFFAF, SÉRINE, IMEN, ZINEB, SOUMIA, HAMZA, MUSTAPHA, SID AHMED*

*A toute la promotion 5eme année docteur vétérinaire (2010-2011).*

# ***Dédicaces***

*A ma mère qui m'a toujours soutenue et encouragée pendant les périodes difficiles.*

*A mon frère DIDEN, merci pour ton conseil.*

*A l'âme de mon père, dieu le soutenu dans son paradis.*

*A mes sœurs : ARBIA, ZOUBIDA, KHIERA et le petit KADA.*

*A la famille BOUZID et BELGHERIB et GHASSOUL ET BEN FATIMA.*

*A ceux qui me sont chers : BETAHER AMINA et SAADOU ASSIA.*

*A FATIHA merci pour ta générosité et ta gentillesse et les bons moments qui 'ont à passés ensembles.*

*A mes chers : AFFAF, SERINE, IMEN, SOUMIA, ZINEB, SOUFIAN.*

*A toute la promotion 5eme année docteur vétérinaire 2010-2011.*

## **LISTE DES TABLEAUX :**

### **ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES :**

**Tableau 01 : Principales résistances naturelles.**

**Tableau 02 : Critères de classement des souches pour les tests qualitatifs.**

**Tableau 03 : Enzymes inactivatrices des aminosides et phénotype de résistance.**

**Tableau 04 : Principaux phénotypes de résistance aux MLS chez les staphylocoques.**

**Tableau 05: Mécanisme de résistance des bactéries aux antibiotiques.**

### **ETUDES EXPERIMENTALE :**

**Tableau 01 : Diamètres d'inhibition.**

**Tableau 02 : Diamètres critiques en mm et la charge des disques.**

**Tableau 03 : La sensibilité et la résistance du S-AUREUS de chaque prélèvement.**

**Tableau 04 : Pourcentage de sensibilité et de résistance.**

## **LISE DES FIGURES :**

**FIGURE 01 : MILIEU D'B.H.I.B**

**FIGURE 02 : STAPHYLOCOQUES SUR MILIEU DE CHAPMAN**

**FIGURE 03 : RESULTAT DE L'ANTIBIOGRAMME**

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

**CMI : CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE.**

**LPS: LIPO POLY SACCHARIDE.**

**TMS: TRIMETHOPRINE- SULFONAMIDE.**

**SARM : PREMIER ANTIBIOTIQUE DE LA FAMILLE DE L'OXAZOLIDINONES.**

**MLS : MACROLIDES, LINCOSAMIDES, STREPTOGRAMINES.**

**K : KANAMYCINE.**

**KT : KANAMYCINE- TOBRAMYCINE.**

**KTG : KANAMYCINE-TOBRAMYCINE-GENTAMYCINE.**

**S/I/R : SENSIBILITE/ INTERMEDIAIRE/ RESISTANCE.**

# **Introduction**

# INTRODUCTION

Les antibiotiques sont utilisés dans la lutte contre les infections bactériennes depuis la découverte de pénicilline en 1922 et les sulfamides en 1935.

Les nouvelles molécules sont d'abord utilisées en médecine puis leur emploi est étendu à la médecine vétérinaire.

L'utilisation de ces antibiotiques s'accompagne et inéluctablement de l'apparition de résistance acquise par les souches d'origine humaine ou animale rendant l'efficacité des thérapeutiques plus aléatoires.

Pour évaluer le degré de résistance d'une bactérie, différents tests de sensibilité ont été mis en point par le test de l'antibiogramme.

L'objectif de cette étude est de faire : un état des lieux de niveau de résistance de *S.aureus* dans le cas de mammite chez vaches laitières.

# **Chapitre I**

## **Purification et l'identification de s- aureus**



**I- CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES :****I.1-CARACTÈRES CULTURAUX :**

Dans les milieux liquides, on observe des coques isolées en diplocoques <<4>> et en très courtes chainettes ne dépasse pas 4 bactéries. (Frottis frais)

(BAURIAND-R et al, 1979)

**I.1.1- EN GÉLOSE NUTRITIVE :**

Les staphylocoques aureus forment des colonies arrondies à bord régulier, bombés, luisantes et pigmentes en 24h, peuvent présenter une coloration acre-jaune or « STAPH doré ».

(BAURIAND-R et al, 1979)

**I .1.2- EN GÉLOSE AU SANG :**

Les colonies donnent une grande zone d'hémolyse, c'est l'un des meilleurs milieux pour la culture des staph (aureus ou blanc ou les deux).

**I.1.3- EN BOUILLON NUTRITIVE :**

On observe en 24h un trouble uniforme et abondant puis un dépôt et un voile pelliculaire en surface.

(BAURIAND-R et al, 1979)

**I.1.4- MILIEU DE CHAPMAN :**

Les colonies s'encroûte d'une enroule jaune avec un éclat métallique (hydrolyse du mannitol).

(BAURIAND-R et al, 1979)

**I.2- EXAMEN MACROSCOPIQUE :**

Les colonies sont caractérisées par leur aspect, leur forme, leur contour, leur couleur et leur surface.

Les colonies de S .aureus : sont marquées par le pigment doré caractéristique est plus intense au centre de la colonie.

(BAURIAND-R et al, 1979)

**I.3- EXAMEN MICROSCOPIQUE :**

L'étude de la morphologie cellulaire de la bactérie et son mode d'association ont été réalisés par une coloration au bleu de méthylène.

Cet examen a été suivi d'une coloration de Gram qui est différentielle ; pour donner une idée sur le type de la paroi Gram positive Gram négative.

À l'observation microscopique on voit un amas caractéristique de STAPHYLOCOCCUS aureus qui ressemble à une petite grappe de raisin, il existe aussi des COCCI isolées et en paires.

**(R.J.OLDS, 1979)**

**II -CARACTÈRES BIOCHIMIQUES : Identification biochimique de la souche****II.1- L'API SYSTÈME 20 E (OU L'API STAPH) :**

L'API STAPH est un système standardisé pour l'identification des genres STAPHYLOCOCCUS, MICROCOCCUS ; et KOCURIA ; comprenant des tests biochimiques miniaturisés ainsi qu'une base de donnée.

La galerie API STAPH comporte 20 micros tubes contenant des substrats déshydratés, les micros tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans API STAPH medium qui reconstitue les tests.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

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.

**(BIOMÉRIEUX-2002)**

**II.2- TEST DE CATALASE :**

Le test de catalase est réalisé par l'ajout d'une goutte d'H<sub>2</sub>O à une colonie, et l'apparition d'une bulle montrant que la bactérie est catalase positif ou négatif.

Des bulles gazeuses se forment alors de cas de STRAPHYLACOCCUS AUREUS.

**(FERSAY, A, 1984)**

**II.3-TEST DE CITRATE :**

A partir d'une suspension bactérienne de STAPHYLOCACCUS AUREUS, l'ensemencement est réalisé dans un tube contenant un milieu gélosé récliné appelle : « citrate de Simmons » puis l'incubation à «37°c pendant 18 à 24 l'heure.

(FERSAY, A, 1984)

**II.4-TEST DE H<sub>2</sub>S<sub>8</sub> :**

L'ensemencement de la bactérie se fait dans un tube qui contient un milieu THRÉE SHUGES IRON - (T .S .T), et l'incubation est à 37°c pendant 18 à 24 heures ; l'apparition de couleur noir est le sulfure d'hydrogène, ainsi que le dégagement du CO<sub>2</sub> à partir de la fermentation de glucose.

(FERSAY, A, 1984)

**II.5-TEST DE TOLÉRANCE À 7,5 % DU NA CL :**

Ce test réalisé en deux conditions de la culture :

En aérobiose par l'ensemencement de la bactérie dans une boite de pétrie contenant le milieu de Chapman et incubation à 37°c pendant 18 à 24 heures.

En aérobiose par l'ensemencement de la bactérie dans un tube contenant aussi le milieu de Chapman ; et les même conditions d'incubaton.

Le virage de couleur range du milieu de Chapman au jaune traduit que le STAPHYLACACCUS AUREUS à utilisé le mannitol comme une source de carbone par voie oxydative et fermentation.

(Boissonnat. B et al ,1984)

**II.6-TEST DE MANNITOL MOBILITÉ :**

Un tube de mannitol a été repiqué pour mettre en évidence la mobilité bactérienne ; et incubé à 37°c pendant 18 à 24 heures.

La mobilité bactérienne se traduit par la présence au l'absence d'une culture à proximité de la piqure centrale montrait la mobilité ou l'immobilité bactérienne.

(Boissonnat. B et al ,1984)

**II.7-RECHERCHE DE TYPE D'HÉMOLYSINE :**

Pour mettre en évidence le type d'hémolysine ; une gélose au sang humain préparée par l'ajout du sang humain à la gélose nutritive à étéensemencée par une suspension bactérienne âgée de 24 heures ; l'ensemble est mis dans une étuve 37 pendant 24 H

(Boissonnat. B et al ,1984)

**III-POUVOIR PATHOGÈNE :****III.1-LA RENCONTRE :**

Les Staphylococcus partagent le même environnement que l'homme-ils vivent sur lui et sur vivent sur des surfaces minérales telles que la literie ; les vêtements ; les poignets de portes ; etc..... L'homme est le principal réservoir de S- aureus- Ces germes colonisent fréquemment le nez et on les trouve chez environ 30% des individus normaux- il peut également coloniser la peau de façon transitoire ; l'oropharynx, et les selles- ils sont bien équipés pour coloniser la peau. Car il peut pousser à des Concentrations élevées de sels et lipides.

- Saprophyte ubiquitaire : sol ; air ; eau ; poussière.
- Commensal de la peau et des muqueuses (hommes/ animaux).
- Sites anatomiques : fosses nasales ; aisselles ; périnée.
- Très abondant dans la flore résidente et très adapté à l'homme.
- Infection endogène ou infection nosocomiale manu portée.

(Marc Victor Assour – 1999)

**III.2-CONTAGIOSITÉ ET MODE DE TRANSMISSION :**

Les staphylococcies diffusent d'une personne à l'autre, en général par l'intermédiaire des contacts manuels ; les peuvent également diffuser à travers les aérosols émis par les patients atteints de pneumopathie. Les nouveau-nés sont contaminés peu de temps après leur naissance, par les personnes qui sont dans leurs entourages immédiats.

(Marc Victor Assour – 1999)

**III.2.1-TRANSMISSION DIRECT :**

A partir de lésion ouvertes on d'un simple portage a symptomatique chez le sujet source auto inoculation des fosses nasales.

En milieu hospitalises, l'auto infestation intervient peu ; contrairement à ce qui se passe avec les entérobactéries. La transmission est essentiellement manu portée par le personnel soignant.

**(Marc Victor Assour – 1999)**

**III.2.2-TRANSMISSION INDIRECT :**

Par voie aérienne (sécrétion de la sphère ORL) par les objets souillés aussi que les toxi- infections alimentaires collectives (T. I.A.C).

Les spaths aureus, ainsi que la plupart des bactéries ne perpètrent pas habituellement dans les tissus profonds à moins que la peau et les membranes muqueuses n'aient été end nagées on coupées-Cela peut survenir Lore de brulures ; de blessures accidentelles ; de la création, de morsure d'insectes, d'une intervention chirurgicale, ou de maladie de peau primitives ; une plaie, même minime, une excoriation, le point de pénétration d'un cathéter soute des portes d'entrée potentielles.

**(Marc Victor Assour – 1999)**

**III.3-FACTEURS DE VIRULENCE :**

**III.3.1- CONSTITUANTS DE LA PAROI :**

Peptidoglycane ; acides techniques- cytokines inflammatoires ; l'acide tectonique polymère de ribitol et de Glycéro phosphates, qui semble aussi impliqué dans l'activation de couplement, et peut être dans d'adhésion de ces germes aux cellules muqueuses.

**(Marc Victor Assour – 1999)**

**III.3.1.1- CAPSULE :**

Qui empêché la phagocytose mais probablement pas avec la même efficacité que chez les pneumocoques et les méningocoques.

**(Marc Victor Assour – 1999)**

**III.3.1.2- MURINE :**

Composant de la paroi de S-aureus active le couplement par la voie alterne, contribuent ainsi à la réponse inflammatoire. En ce sens ; la murène staphylococcique ressemble à l'endotoxine des bactéries gram négatif.

(Marc Victor Assour – 1999)

**III.3.1.3- LA PROTÉINE A :**

Est ainsi un composant de la paroi de S-aureus ; la une propriété assez inattendue qui est sa liaison non spécifique au fragment FC de presque tous les types d'Ig G. Cela empêche les immunoglobulines de fonctionner en tout qu'anticorps contre les germes envahisseurs puis que leur partie Fab, normalement impliqué dans la liaison antigène – anticorps ; « Flotte » librement maintenant à la surface des bactéries.

(Marc Victor Assour – 1999)

**III.3.2- LES ENZYMES :****III.3.2.1- COAGULASSE :**

Provoque la prise en masse du plasma. Il convertit le fibrinogène en fibrine, ce qui contribue probablement à empêcher la phagocytose des germes, les leucocytes ayant une mauvaise pénétration à l'intérieur des caillots de fibrine.

(Marc Victor Assour – 1999)

**III.3.2.2- CATALASE :**

Diminue probablement l'action destructrice des phagocytes. Par transformation de peroxyde d'hydrogène en eau et pourrait contribuer l'action des tractive des polynucléaires neutrophiles qui produisent des radicaux libères d'oxygène.

(Marc Victor Assour – 1999)

**III.3.2.3- HYALURONIDASE :**

Qui hydrolyse la matrice du Tissa conjonctif et favorise peut être la diffusion le long des plans de clivage tissulaire.

(Marc Victor Assour – 1999)

**III.3.2.4- LA B- LACTAMES :**

A un rôle plus clair ; c'est une puissante enzyme qui hydrolyse les pénicillines ; on la trouve chez 90 % des souches de S. aureus et elle est responsable de la Résistance à la pénicilline de genre de cette enzyme est porté par un plasmide qui peut être facilement transféré. Ce qui probablement a contribué à la diffusion rapide de cette Résistance parmi les staphylocoques.

En plus de ces enzymes ; il ya aussi : DNA se, gélatinasse ; lipase.

**(Marc Victor Assour – 1999)**

**III.3.1- LES TOXINES :****III.3.1.1- CYTOLYSINES :****a- STAPHYLOLYSIUE (HÉMOLYSINE) :**

Qui pourraient contribuer à rendre le fer disponible pour les micro-organismes, en lysant les hématies.

**(Marc Victor Assour – 1999)**

**b- LEUCOCIDIVE (PANTOUM ET VALENTINE) :**

Entraine la formation de pores dans la membrane des polynucléaires neutrophiles et elle est probablement responsable de leur destruction.

**(Marc Victor Assour – 1999)**

**III.3.1.2- LES ENTEROTOXINES :****a- LES ENTÉROTOXINE B :**

L'enter toxine B produit une intoxication : aliénatoire, cette toxine garde son activité même après avoir bouilli durant 30 minutes et résiste aux enzymes de l'estomac et de jéjunum.

Ces toxines agissent directement sur les récepteurs neuronaux de système gastro-intestinal ; conduisant aussi à une stimulation des centres du cerveau responsable de vomissement et de diarrhée.

Vit bien dans les produits laitiers. Dans ce cas-ci c'est la toxine qui est donc genreuse et non la bactérie.

**(Marc Victor Assour – 1999)**

**b- LES ALPHA-TOXINES :**

Cette toxine cause la lyse des érythrocytes, des leucocytes et des plaquettes âgées en s'insérant dans la double couche de PHOSPHOGLYCÉROLIPIDES de la membrane cellulaire ; formant aussi des pores (trous) transmembranaire qui laissent sortir les constituants vitaux de la cellule. (Mort de la cellule, un peu comme le complément à long terme et à grande échelle : nécrose des tissus)

(Marc Victor Assour – 1999)

**III.3.1.3-TSST-1(TOXINE RESPONSABLE DU CHOC TOXINE) :**

Cette toxine ressemble un peu à l'action de l'alpha-toxine mais est plus virulente

**a-CHOC :**

Dilatation des vaisseaux qui entraînent une baisse de pression et un manque du Sang dans les organes vitaux. Agit au contact de la membrane mais agit comme un super antigène qui déclenche les mécanismes de l'immunité.

(Marc Victor Assour – 1999)

**b- SUPER ANTIGÈNE :**

Capable d'attacher directement ensemble le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) du macrophage et le récepteur de lymphocyte en demeurent à l'extérieur du complexe.

Il en résulte une stimulation massive de système immunitaire puisque ce n'est plus le macrophage qui contrôle la présentation des antigènes. Cette stimulation entraîne une libération phénoménale de cytokines qui font dilater les vaisseaux partout (baisse dramatique de la tension artérielle).

Le syndrome du choc toxique peut être causé par le port prolongé d'un tampon chez les femmes, mais peut aussi frapper n'importe quel porteur de la souche de S-aureus pouvant produire la toxine TSST-1

(Marc Victor Assour – 1999)



**III.4- LES INFECTIONS STAPHYLOCOQUES :****III.4.1- LES INFECTIONS CAUSÉES PAR LES STAPHYLOCOQUES LUI MÊME :****III.4.1.1- INFECTION DE LA PEAU ET DES TISSUS MOUS :****a- FURONCLES (GROS BOUTON) :**

Couramment appelé «clou» emplit de pus. La destruction des cellules de l'organisme entraîne la formation de pus (Saures est le type même du germe pyogène).

Staphylococcies cutanée-muqueuses : ce sont les plus fréquentes : les infections des plaies traumatiques et chirurgicales.

**(J.L.F : staphylocoques- 2007)**

**b- IMPÉTIGO :**

Infection de la peau caractérisé par des vésicules dont le contenu forme des croûtes jaunâtres.

**(J.L.F : staphylocoques- 2007)**

**c- LA BACTÉRIÉMIES À STAPHYLOCOQUE :**

Ce sont les bactéries les plus fréquentes (détaillé abréviations) le point d'entrée est souvent cutané, mais il peut être G R L, dentaire, vinaire ou intracranien .elles peuvent être aiguë ou chronique et entraîner une endocardite infectieuse.

**(J.L.F : staphylocoques- 2007)**

**III.4.1.3- ENDOCARDITES :**

Se produit surtout chez des patients déjà malades, dont le système immunitaire est affaibli.

**(J.L.F : staphylocoques- 2007)**

**III.4.1.4- MUSCLES ET SQUELETTE :****a-OSTÉOMYÉLITE ET MYOSITES INFECTIEUSE :**

Se produit surtout chez des patients déjà malades, dont le système immunitaire est affaibli.

Inflammation de l'OS et de la moelle Osseuse et des articulations (artérites).

**(J.L.F : staphylocoques- 2007)**

**III.4.1.5- STAPHYLOCOCCIES VISCÉRALES :**

Pleuro-pulmonaires avec ou sans micro abcès (les abcès métastasiques) ; pleurésie purulente ; pyélonéphrite aigue.

**(J.L.F : staphylocoques- 2007)**

**III.4.1.6-TRACTUS URO-GÉNITALE :**

Les abcès roman ou prostatiques, les infections de tractus urinaire inferieur.

**(J.L.F : staphylocoques- 2007)**

**III.4.1.7- DES INFECTIONS DE TRACTUS SYSTÈME NERVEUX CENTRAL :**

Atteinte neuro-méningées ; abcès cérébraux (point de départ sauvant ORL).

Abcès épidual, les méningites sont très rares.

**(J.L.F : staphylocoques- 2007)**

**III.4.2- LES INFECTIONS CAUSÉES PAR LES TOXINES DU STAPHYLOCOQUE :****III.4.2.1-SYNDROME DU CHOC TOXIQUE :**

Causé par la toxine TSST-1, syndrome potentiellement mortel.

Caractérise par une fièvre importante ; des vomissements, diarrhées, un rash cuterie, hypotension, dés fonctionnement des plusieurs systèmes essentiels, toux sèche et des douleurs musculaires.

En quatre-huit heures, ce ci peut devenir un choc sévère accompagné de dommages rénaux et hépatiques.

La maladie est associée à l'utilisation de tampons menstruels très absorbants ; qui apparemment favoriseraient la croissance des germes.

Le syndrome du choc toxique n'est pas limité à la porte d'entrée vaginale.

Il peut faire suite à des interventions chirurgicales, ou à des infections cutanées à staphylocoques ; et peut atteindre l'homme aussi bien que la femme.

La toxine impliquée ne peut être étudiée aussi facilement que l'exfoliative car elle ne provoque pas tous les symptômes de la maladie chez les animaux de laboratoires.

Elle provoque de la fièvre par le même mécanisme que l'endotoxine des entérobactéries c'est-à-dire en stimulant la formation d'interleukine-1(IL-1) qui est un pyrogène endogène.

**(J.L.F : staphylocoques- 2007)**

### **III.4.2.2-INTOXICATIONS ALIMENTAIRES :**

Toxi-infections alimentaires collectives (T.I.A.C) causée par l'entérotoxine B, il ne s'agit pas d'une infection mais bien d'une intoxication caractérisée par des vomissements et une diarrhée environ 1-5 heures après l'ingestion de nourriture contaminée. La récupération est généralement rapide.

Elle est provoquée par la répartition de la chaîne laitière.

**(J.L.F : staphylocoques- 2007)**

### **III.4.2.3-SYNDROME DE LYELL :**

C'est le syndrome de la peau ébouillantée, c'est une maladie grave qui met en jeu le pronostic vital. Elle atteint les nouveau-nés et les enfants de moins de 5 ans surtout. Elle se caractérise par un décollement étendu de la peau ; formation des érythèmes, cloques ; desquamation au niveau du visage et de la région axillaire en premier, puis gagne le reste du corps.

Cette maladie est due à : la toxine épidermolytique ou exfoliative (A et B)

**(J.L.F : staphylocoques- 2007)**

**IV- DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE :****IV.1-BACTÉRIOLOGIQUE :**

Attention aux espèces commensales peuvent devenir pathogène : souvent contaminant.

**IV.1.1- ISOLEMENT :** Examen direct et la mise en culture.

Culture sur milieu classique de type gélose au sang ou sur milieu spéciale comme le milieu de Chapman (Solution hyper salée avec mannitol). La présence habituelle du germe dans de nombreux territoires, notamment sur la peau et les muqueuses, fait qu'il faut être à la fois scrupuleux dans la réalisation des prélèvements et critique quant à leur interprétation.

**(J.L.F : staphylocoques- 2007)**

**IV.1.2- IDENTIFICATION :**

Par les tests suivants : -Coagulase : réaction +.

-Testes d'agglutination (Ag de surface).

-Marqueurs biochimiques (très rare).

**(J.L.F : staphylocoques- 2007)**

**IV.1.3- ANTIBIOGRAMME :**

Test prédictif pour déterminer le profil de sensibilité d'une bactérie à un panel d'antibiotiques et pour étudier l'activité bactériostatique des antibiotiques.

Etablit un lien avec les concentrations critiques qui déterminent les classes S.I.R (Disque d'antibiotique, une bactérie, un diamètre d'inhibition).

**(J.L.F : staphylocoques- 2007)**

**IV.1.3.1- LES CONDITIONS DE L'ANTIBIOGRAMME :****a- MILIEU DE CULTURE :**

La gélose de Mueller- Hinton est le milieu de culture de référence et se commercialise sous forme dehydratée. La teneur en cations bivalents, en thymine et le pH doivent être contrôlés.

Pour l'étude de la résistance d'un staphylocoque vis à vis de la MÉTICILLINE ou L'OXACILLINE, on devra compléter le milieu avec 2% de Na Cl.

**(J.L.F : staphylocoques- 2007)**

#### **b- BACTÉRIE :**

Inoculum bactérien calibré disposé à la surface d'une gélose (milieu standardisé Muller Hinton).

**(J.L.F : staphylocoques- 2007)**

#### **c- ANTIBIOTIQUE :**

Disque papier imprégné charge d'antibiotiques, formation d'un gradient de concentration autour du disque.

La Quantité d'antibiotique dans les disques est standardisée de manière à obtenir une lecture facile.

L'inoculum doit être standardisé pour obtenir des colonies juste confluentes on peut utiliser un photomètre ou la technique de comparaison au milieu Mac Far land. (0,5 Mac Far land).

L'ensemencement est possible par flottage ou par écouvillonnage. On procède ensuite au dépôt des disques d'antibiotiques soit manuellement soit avec un distributeur automatique. Le temps d'incubation est de 18-24 h dans une étuve à atmosphère normale et à 35-37 °C.

**(J.L.F : staphylocoques- 2007)**

#### **IV.1.3.2-LA LECTURE :**

On mesure après incubation le diamètre d'inhibition avec une règle graduée ou un pied à coulisse. Des appareils automatisés ont été également développés Pour faire cette mesure.

Grâce à des abaques, on interprète le diamètre obtenu en trois catégories.

Le bactériologiste peut modifier l'antibiogramme initial et faire des commentaires, par exemple une résistance à la MÉTICILLINE de la part d'un staphylocoque doit faire étendre la résistance à toutes les B-LACTAMINES ou encore une résistance croisée à la KANAMYCINE et à la néomycine implique une résistance à l'AMIKACINE etc. c'est la lecture interprétative de l'antibiogramme.

**(J.L.F : staphylocoques- 2007)**

**IV.2- SÉROLOGIQUES** : peu utilisées en routine.

Les ANTISTAPHYLOLYSINES alpha et gamma : élèves dans les staphylococcies chroniques.

Les anticorps antiacide TÉICHOÏQUE : utiles dans certaines endocardites à hémocultures négatives.

**(J.L.F : staphylocoques- 2007)**

**IV.3- TYPAGE ANTIGÉNIQUE ET ÉTUDE LYSOTYPIQUE** :

Uniquement pour les enquêtes épidémiologiques.

**(J.L.F : staphylocoques- 2007)**

**IV.4- PCR** :

Identification du type de staphylocoque et son éventuelle résistance aux antibiotiques du fait de certaines régions génomiques particulières

Nom réalisé en routine.

**(J.L.F : staphylocoques- 2007)**



# **Chapitre II**

## **Staph et les antibiotiques**



**I- LA RÉSISTANCE BACTÉRIENNE AUX ANTIBIOTIQUES :**

La résistance des bactéries aux antibiotiques est connue depuis fort longtemps et son importance clinique survient très peu de temps après le début de l'antibiothérapie.

Elle fait l'objet de publications et de revues nombreuses qui rendent compte de sa constante évolution. Ses mécanismes sont mieux connus grâce aux progrès de la connaissance de la morphologie et du métabolisme bactériens.

**(MONTASTRUS, 2002)**

**I.1- RÉSISTANCE NATURELLE :**

La résistance naturelle ou intrinsèque correspond à la capacité de résister à la présence d'un antibiotique pour toutes les souches d'une espèce ou d'un genre bactérien. La Société Française de Microbiologie (SFM) définit la résistance naturelle comme la caractéristique d'une espèce bactérienne qui se traduit par des concentrations minimales inhibitrices (CMI) supérieures à la concentration critique supérieure des tests de sensibilité pour l'antibiotique concerné (la définition de ces termes sera développée dans le chapitre des tests de sensibilité).

Habituellement le support de cette résistance est chromosomique. Les mécanismes sont nombreux et décrits pour des cas particuliers par la suite.

Quelques exemples de résistance naturelle sont rassemblés dans le tableau A.1 pour les principales bactéries du cheval.

**(MONTASTRUS, 2002)**

TABLEAU N : 1 PRINCIPALES RESISTANCES NATURELLES :

<u>Coques gram+</u> -STAPHYLOCOCCUS SPP -STAPHYLOCOCCUS SPP	MÉCILLINAM ; AZTRÉONAM ; QUINOLONES CLASSIQUES ; COLISTINE ; POLYMYXINE B. idem + <b>aminosides (bas niveau)</b>
<u>Bacilles Gram+</u> -RHODOCOCCUS EQUI	<b>STREPTOGRAMINES</b> ; MÉCILLINAM ; AZTRÉONAM ; QUINOLONES CLASSIQUES ; COLISTINE ; POLYMYXINE B.
<u>Bacilles Gram -</u> -tous -ENTÉROBACTÉRIES	OXACILLINE ; ACIDE FUSIDIQUE ; VANCOMYCINE <b>PÉNICILLINE G</b> ; OXACILLINE ; MACROLIDES ; LINCOSAMIDES ; <b>STREPTOGRAMINES</b> ; ACIDE FUSIDIQUE ; VANCOMYCINE.
<u>Bacilles Gram- non fermentaires</u> -PSEUDOMONAS AERUGINOSA	<b>AMINOPÉNICILLINES</b> ; CÉPHALOSPORINES DE 1ÈRE ET 2ÈME GÉNÉRATIONS ; <b>TÉTRACYCLINES</b> ; <b>CHLORAMPHÉNICOL</b> <b>TRIMÉTHOPRIME</b> .
<u>Bactéries anaérobies strictes</u> -toutes -BACTEROÏDES FRAGILIS -CLOSTRIDIUM DIFFICILE	<b>AMINOSIDES</b> ; <b>TRIMÉTHOPRIME</b> ; <b>QUINOLONES</b> . IDEM + <b>AMINOPÉNICILLINES</b> ; CÉPHALOSPORINE DE 1ÈRE GÉNÉRATION ; COLISTINE ;

(MONTASTRUS, 2002)

**I.2- RÉSISTANCE ACQUISE :**

On oppose à la résistance naturelle, propriété d'espèce ou de genre, la résistance acquise qui est une propriété de souche. Cette dernière correspond à la capacité de supporter une concentration d'antibiotique beaucoup plus élevée que celle supportée par les autres souches de la même espèce.

Elle peut s'acquérir soit par mutation chromosomique, soit par acquisition de matériel génétique exogène.

(MONTASTRUS, 2002)

**I.2.1- RÉSISTANCE PAR MUTATION CHROMOSOMIQUE :**

Ce phénomène spontané est rare et n'explique qu'une faible partie des résistances rencontrées en clinique. L'antibiotique n'induit pas la mutation mais si celle-ci survient l'antibiotique favorise la souche résistante qui est alors sélectionnée. La diffusion de ce type de résistance est liée à la diffusion de la souche mutante.

Généralement, l'augmentation de résistance se fait progressivement, par paliers.

Cependant, on peut rencontrer des cas où une seule mutation chromosomique aboutit à une élévation de résistance très importante ; par exemple, la CMI vis à vis de la streptomycine peut être multipliée par 1000 par une unique mutation chromosomique.

La fréquence d'apparition des mutations est fonction de l'antibiotique. On observe les plus grandes fréquences de mutation pour la streptomycine et la rifampicine.

Elle est due à des mutations et peut revêtir plusieurs aspects :

-à un ou deux échelons, c'est-à-dire qu'une seule mutation donne un mutant de taux très élevé, ou en deux mutations donnant d'abord un mutant de taux intermédiaire (*STREPTOMYCINE, POLYMYXINE*).

-à deux échelons (*MACROLIDES, NOVOBIOCINE*).

-à plusieurs échelons : *PÉNICILLINE, NÉOMYCINE, PARMOMYCINE, KANAMYCINE, TÉTRACYCLINE, CHLORAMPHÉNICOL*.

(MONTASTRUS, 2002)

### I.2.2- RÉSISTANCE PAR ACQUISITION DE MATÉRIEL GÉNÉTIQUE EXOGÈNE :

Dit aussi la résistance extra-chromosomique. c'est la résistance la plus fréquemment rencontrée. Ce type de résistance procède de l'acquisition de gènes de résistance par l'intermédiaire d'un plasmide ou de transposons à la faveur de 3 mécanismes d'échange possibles : conjugaison, transformation ou transposition.

Généralement, on observe une augmentation brusque de résistance plutôt qu'une augmentation par paliers du niveau de résistance.

Elle est liée à la production d'une enzyme inhibitrice c'est ainsi qu'un grand nombre de bactéries, parmi lesquelles *LES STAPHYLOCOQUES, LES COLIBACILLES, LE PROTEUS, LE PSEUDOMONAS*, peuvent hydrolyser le cycle *DE B-LACTAMINE DE PÉNICILLINES* et *DES CÉPHALOSPORINES* à l'aide d'un *B-LACTAMINE*.

(MONTASTRUS, 2002)

#### a- CONJUGAISON :

Dans le phénomène de conjugaison, une bactérie donneuse transmet à une bactérie receveuse une copie de son plasmide porteur de gène de résistance (appelé plasmide R ou facteur R).

Ce mécanisme peut s'effectuer entre bactéries de la même espèce, au sein d'un même genre ou parfois entre bactéries de genres différents d'où son efficacité. Par exemple, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* peut échanger du matériel génétique avec *E. COLI*.

Un plasmide peut contenir différents gènes de résistance. L'utilisation d'un seul des antibiotiques contre lesquels le plasmide est efficace permet alors sa sélection et son maintien dans son intégralité.

(MONTASTRUS, 2002)

**b- TRANSFORMATION :**

La transformation est le résultat d'un réarrangement de séquences d'ADN échangées entre 2 bactéries. On peut alors obtenir de nouveaux gènes de résistance. Ce processus se fait généralement entre bactéries de genre proche car il doit y avoir une forte analogie entre les séquences nucléotidiques pour permettre la recombinaison.

(MONTASTRUS, 2002)

**c-TRANSDUCTION (TRANSDUCTION) :**

Dans la transduction, un virus bactériophage incorpore une séquence d'ADN d'une bactérie et la transmet à une autre bactérie. Du fait de la spécificité des bactériophages, ce phénomène n'a lieu que pour les bactéries de la même espèce.

(MONTASTRUS, 2002)

**I.2.3- RESISTANCE MIXTE :**

*LES STAPHYLOCOQUES* et *LES ENTÉROBACTÉRIACÉS* en particulier peuvent résistants par les deux mécanismes.

**I.2.4- RESISTANCE CROISEE :**

Un germe devenu résistant à un antibiotique peut devenir résistant à un autre antibiotique, les résistances chromosomiques ne seulement exister qu'un antibiotique possédant une structure chimique voisine.

Les résistances extra chromosomiques sont variables à l'intérieur d'une même classe, on peut alors observer soit une résistance réciproque (à double sens), soit une résistance unilatérale (à sens unique).

(MONTASTRUS, 2002)

**II- MECANISMES DE RESISTANCE :****II.1- EN FONCTION DE LA STRUCTURE ANTIGENIQUE :****II.1.1- RÉSISTANCE PAR DIMINUTION DE LA PÉNÉTRATION OU PAR AUGMENTATION DE L'EXCRÉTION D'UN ANTIBIOTIQUE :**

La diminution de la pénétration de l'antibiotique peut être la conséquence de différentes stratégies bactériennes. Certaines bactéries sont capsulées (*KLEBSIELLA SPP.*, *STREPTOCOQUES...*) ou peuvent sécréter une zoogée qui les protège de l'action des antibiotiques par effet de barrière ou par modification de leur charge externe. Les antibiotiques très lipophiles, tels que les macrolides, ont beaucoup de mal à traverser la membrane externe des bactéries Gram - à cause de la présence protectrice de LPS.

Quant aux molécules hydrophiles, elles doivent passer la couche de LPS à travers des *PORINES* plus ou moins spécifiques. La diminution ou le caractère non fonctionnel de ces *PORINES* (par exemple après mutation chromosomique) rendent la bactérie beaucoup moins sensible par une diminution de la diffusion. Si plusieurs antibiotiques utilisent la *PORINE* en cause, alors l'efficacité de tous ces antibiotiques s'en trouve altérée (on parle alors de résistances croisées). Ce mécanisme se retrouve essentiellement chez les

entérobactéries et les *PSEUDOMONAS*. Enfin, le passage de la membrane cytoplasmique nécessite parfois des enzymes appelées perméases «*ÉNERGIE DÉPENDANTES*». Si le potentiel de membrane et/ou le transfert d'électron sont trop faibles alors ces perméases ne sont pas fonctionnelles et l'antibiotique ne peut pas pénétrer dans la bactérie. Ce phénomène explique la résistance naturelle des bactéries anaérobies vis à vis des aminosides.

Des protéines membranaires peuvent induire une augmentation de l'excrétion de l'antibiotique. On rencontre ce mécanisme chez certaines entérobactéries résistantes aux tétracyclines. La résistance s'explique par une concentration intracellulaire insuffisante de cette famille d'antibiotiques. Un mécanisme similaire est décrit pour les *FLUOROQUINOLONES*.

(MONTASTRUS, 2002)

### II.1.2- RÉSISTANCE PAR MODIFICATION DE LA CIBLE :

Une mutation peut induire une modification de la cible de l'antibiotique utilisé. A cause d'une moindre affinité, l'efficacité sera réduite. On retrouve ce phénomène pour de nombreuses familles d'antibiotiques : *MÉTICILLINE* et nouvelles PLP (protéines de liaisons des pénicillines), macrolides et *MÉTHYLATION* de l'ARN, rifampicines et mutation de l'ARN polymérase ADN-dépendante.

Ce mécanisme de résistance est fréquent pour les quinolones : la bactérie résistante synthétise une *ADN GYRASE* moins sensible.

(MONTASTRUS, 2002)

## II.2- LA RESISTANCE EN FONCTION DES REACTIONS BIOCHIMIQUES :

### II.2.1- RÉSISTANCE PAR INACTIVATION ENZYMATIQUE DE L'ANTIBIOTIQUE :

La synthèse de certaines enzymes peut réduire ou annuler l'efficacité d'un antibiotique. Ce mécanisme est décrit contre les *B-LACTAMINES*, les aminosides et le chloramphénicol.

Dans le cas des *B-LACTAMINES*, on peut distinguer des pénicillinases, ayant un support génétique essentiellement *PLASMIDIQUE* et donc très répandues, et des *CÉPHALOSPORINASES* généralement chromosomiques et spécifiques d'espèces.

(MONTASTRUS, 2002)

### II.2.2- RÉSISTANCE PAR MODIFICATION DU MÉTABOLISME :

Ce mécanisme explique la résistance bactérienne aux TMS. Les sulfamides et *LE TRIMÉTHOPRIME* (ou équivalent) bloquent la voie de synthèse des bases nucléiques en inhibant certaines enzymes. En augmentant la synthèse des précurseurs, des enzymes ou en fabriquant des enzymes moins sensibles, la bactérie peut devenir résistante.

(MONTASTRUS, 2002)

## III- EVALUATION DE L'ANTIBIORÉSISTANCE :

Considérant que la résistance des bactéries aux antibiotiques est très variable et semble en augmentation, l'isolement et l'identification ne suffisent souvent plus aux vétérinaires pour mettre en œuvre une antibiothérapie efficace. Le vétérinaire peut alors faire appel aux laboratoires de bactériologie pour réaliser des tests de sensibilité.

(MONTASTRUS, 2002)

### III.1- LES TESTS DE SENSIBILITÉ :

Les tests de sensibilité bactérienne les plus répandus ont pour but d'étudier l'effet bactériostatique des antibiotiques. Pour chaque souche bactérienne, on peut définir une concentration minimale inhibitrice (CMI) qui correspond à la concentration minimale d'antibiotique qui inhibe la croissance visible du germe. Elle est donc associée à un phénomène macroscopique, ce qui explique sa relative facilité d'obtention et son universalité.

C'est une information intéressante et pertinente pour le praticien puisque dans la majorité des cas on recherche essentiellement une inhibition de croissance bactérienne pour permettre aux défenses immunitaires de combattre l'infection plus efficacement. La CMI est une valeur pour une souche bactérienne donnée, on peut aussi définir une CMI<sub>50</sub> (50% des souches ont une CMI inférieure à la CMI<sub>50</sub>) et une CMI<sub>90</sub> (90% des souches ont une CMI inférieure à la CMI<sub>90</sub>).

En parallèle, on peut chercher à évaluer le caractère bactéricide d'un antibiotique. On pourra alors déterminer une CMB (concentration minimale de bactéricide) qui correspond à la concentration minimale en antibiotique pour obtenir la destruction de 99,99% des bactéries en 18 heures. Cependant, étant donné que la détermination de la CMB est peu courante, la réalisation de cette technique ne sera pas développée. Son intérêt est malgré tout certain pour les patients à système immunitaire déprimé ou déficient (par exemple, poulain n'ayant pas bu de colostrum).

Il existe 2 grandes familles de tests pour étudier l'effet bactériostatique :

- ceux utilisant une méthode quantitative aboutissant à un résultat chiffré correspondant à une CMI : tests par dilution,
- ceux utilisant une méthode qualitative permettant de classer les bactéries en sensible(S), intermédiaire(I) ou résistante(R) : tests par diffusion.

Toutes ces méthodes doivent suivre des règles de standardisation rigoureuses pour pouvoir être reproductibles, interprétables et comparables au sein du laboratoire, du pays ou entre les Etats.

(MONTASTRUS, 2002)

#### III.1.1- MÉTHODE PAR DILUTION :

Le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM)[10] définit la CMI comme étant la plus faible concentration d'une gamme de dilution d'antibiotique de demi en demi qui inhibe la croissance visible du germe.

L'avantage des méthodes par dilution est leur relative souplesse d'utilisation puisqu'on peut compléter le milieu de culture pour des germes à besoin particulier et utiliser n'importe quel antibiotique pourvu qu'il soit disponible sous forme de poudre. De plus, les résultats peuvent être donnés sous forme de CMI et/ou sous forme de classification S/I/R.

Ces techniques de dilution, sur milieu solide ou en milieu liquide, sont les méthodes de référence.

(MONTASTRUS, 2002)

#### a- MÉTHODE PAR DILUTIONS SUCCESSIVES EN MILIEU SOLIDE :

Cette méthode consiste en l'ensemencement de géloses contenant des concentrations décroissantes en antibiotique. On recherche la plus faible concentration pour laquelle il y a inhibition macroscopique de la pousse bactérienne.

Les solvants et les diluants utilisables sont définis dans les documents de la SFM pour la France ou dans ceux du NCCLS pour l'Amérique de Nord.

La gélose de Mueller-Hinton est le milieu de culture de référence et se commercialise sous forme déshydratée. La teneur en cations bivalents, en thymine et le pH doivent être contrôlés. Pour l'étude des Streptocoques on rajoute parfois 5% de sang de cheval ou de mouton. Si l'on recherche la résistance d'un

staphylocoque vis à vis de la *MÉTICILLINE* ou l'*OXACILLINE*, on devra supplémenter le milieu avec 2% de Na Cl.

L'inoculum bactérien doit être standardisé : on cherche à obtenir  $10^4$  CFU par spot sur la gélose. Pour cela, on peut ajuster la turbidité de l'échantillon avec le milieu *MRC FARLAND*.

Une fois l'inoculum absorbé par la gélose, les milieux sont incubés à 35°C pendant 16 à 20 heures à atmosphère normale. Pour certaines bactéries, on pourra augmenter la teneur en CO<sub>2</sub>.

On recherche enfin la plus faible concentration pour laquelle la pousse est inhibée macroscopiquement : on obtient alors la CMI.

C'est une méthode de référence du fait de sa standardisation et qui permet d'évaluer les performances des autres tests mais sa mise en œuvre nécessite des moyens en temps et en personnels qui limitent son champ d'application.

(MONTASTRUS, 2002)

### **b- MÉTHODES PAR DILUTIONS SUCCESSIVES EN MILIEU LIQUIDE :**

Le principe est le même que pour le milieu solide sauf que l'on travaille en milieu liquide. On peut faire une distinction entre des méthodes de *MACRODILUTION* et des méthodes de *MICRODILUTION*. Ces dernières sont plus utilisées car des kits sont commercialisés et le travail est automatisable.

(MONTASTRUS, 2002)

### **III.1.2- MÉTHODE PAR DIFFUSION :**

#### **a- PRINCIPE :**

Ce test consiste en l'application de disques imprégnés d'antibiotiques sur une gélose préalablement ensemencée par des bactéries. L'antibiotique va diffuser dans la gélose avec une concentration décroissante vers la périphérie. Dans la zone où la concentration est inhibitrice, on n'observera pas de pousse bactérienne. Avec la mesure du diamètre de la zone d'inhibition et grâce à des abaques, on pourra classer la bactérie en sensible(S), intermédiaire(I) ou résistante(R). L'analyse de l'efficacité de différents antibiotiques sur une souche bactérienne donne un antibiogramme.

(MONTASTRUS, 2002)

#### **b- ETABLISSEMENT DE LA COURBE DE CORRELATION ET DE DEFINITION DES CATEGORIES :**

Pour un grand nombre de souche (au moins 300), on met en relation le diamètre d'inhibition avec la CMI obtenue par une des méthodes de dilution on obtient un nuage de points dans un graphique représentant le diamètre en fonction du log<sub>2</sub> de la CMI. On peut calculer alors une courbe de régression, appelée courbe de concordance, qui met en relation la CMI avec le diamètre de la zone d'inhibition de croissance bactérienne.

Dans son communiqué 2000-2001, le comité de l'antibiogramme de la SFM définit les trois catégories de souches bactériennes:

☞ Les souches sensibles sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte dans le cas d'un traitement par voie systémique avec la posologie recommandée.

☞ Les souches résistantes sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quel que soit le type de traitement.



☞ Les souches intermédiaires sont celles pour lesquelles le succès est imprévisible. Ces souches forment un ensemble hétérogène pour lequel la seule valeur de la CMI n'est pas prédictive de succès thérapeutique :

- Elles peuvent présenter un mécanisme de résistance dont l'expression *in vitro* est faible, pouvant entraîner leur classement dans la catégorie S. Cependant, *in vivo*, une partie de ces souches apparaissent résistantes à la thérapeutique ;
- Elles peuvent présenter un mécanisme de résistance dont l'expression n'est pas suffisante pour justifier un classement dans la catégorie R, mais qui favorise l'apparition de résistance *in vivo* en cours de traitement ;
- La catégorie intermédiaire est aussi une zone tampon qui tient compte des incertitudes techniques et biologiques.»

Pour classer les bactéries, on compare la CMI avec des valeurs critiques (valeur critique inférieure, valeur critique supérieure) qui dépendent de nombreux facteurs : concentration tissulaire et sérique avec un traitement à posologie habituelle, résultats cliniques, distribution des CMI pour les populations sensibles et résistantes, variabilité statistique...

(MONTASTRUS, 2002)

**TABLEAU N : 2 CRITERES DE CLASSEMENT DES SOUCHES POUR LES TESTS QUALITATIFS :**

Données	Interprétation
CMI < Valeur critique inférieure	Sensible
V. c. inférieure < CMI < V. c. supérieure	Intermédiaire
CMI > valeur critique supérieure	Résistant

Ces valeurs critiques sont établies et mises à jour régulièrement par le NCCLS ou la SFM. Jusqu'à ces derniers temps, les normes calculées pour l'antibiothérapie humaine étaient utilisées pour l'antibiothérapie vétérinaire sans véritable validation. Récemment le NCCLS a édité un certain nombre de valeurs établies pour les animaux.

L'annexe I présente quelques valeurs critiques en vigueur au laboratoire de bactériologie clinique de l'HVE à la date du 15 septembre 2000. Certaines valeurs sont adaptées selon l'espèce animale sur laquelle a été pratiqué le prélèvement.

(MONTASTRUS, 2002)

### c- MISE EN ŒUVRE :

La quantité d'antibiotique dans les disques est standardisée de manière à obtenir une lecture facile, *i.e.* une zone d'inhibition <10 mm pour les bactéries résistantes ou >30 mm pour les sensibles si possible. Les paramètres de stockage sont définis par le fabricant.

Le milieu de culture recommandé en France et en Amérique du Nord est la gélose de Mueller-Hinton. Les milieux utilisés dans les autres pays sont décrits dans le tableau 2.



Les méthodes sont très similaires en France et aux USA et peuvent être considérées comme équivalentes. La supplémentation de ce milieu est délicate car elle peut modifier les paramètres de diffusion et donc les CMI obtenues.

L'inoculum doit être standardisé pour obtenir des colonies justes confluentes. On peut utiliser un photomètre ou la technique de comparaison au milieu MRC FARLAND.

L'ensemencement est possible par flottage ou par écouvillonnage. On procède ensuite au dépôt des disques d'antibiotiques soit manuellement soit avec un distributeur automatique. Le temps d'incubation est de 18 à 24h dans une étuve à atmosphère normale et à 35-37 °C.

On mesure après incubation le diamètre d'inhibition avec une règle graduée ou un pied à coulisse. Des appareils automatisés ont été également développés pour faire cette mesure.

Grâce à des abaques, on interprète le diamètre obtenu en trois catégories. Le bactériologiste peut modifier l'antibiogramme initial et faire des commentaires. Par exemple une résistance à la *MÉTICILLINE* de la part d'un staphylocoque doit faire étendre la résistance à toutes les *B-LACTAMINES* ou encore une résistance croisée à la *KANAMYCINE* et à la néomycine implique une résistance à l'*AMIKACINE* etc. C'est la lecture interprétative de l'antibiogramme.

(MONTASTRUS, 2002)

#### d- AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS :

L'avantage essentiel de la méthode par diffusion est sa facilité de mise en œuvre avec une lecture facile des résultats. Mais ce test n'est pas adapté pour les bactéries à pousse lente ou qui nécessitent une supplémentation car les abaques de décision ont été étalonnés pour des bactéries à pousse rapide et sur gélose non supplémentée. De plus certains types de résistance ne s'expriment pas pleinement avec cette méthode.

(MONTASTRUS, 2002)

#### IV- LES ANTIBIOTIQUES A TESTES ET LEURS MODES D'ACTION :

##### IV.1- LES ANTIS STAPHYLOCOCCIQUES :

Des antis staphylococciques existent dans toutes les familles d'antibiotiques (hormis les *POLYMYXINES* et les *IMIDAZOLÉS*). Les *ANTISTAPHYLOCOCCIQUES* les plus utilisés appartiennent aux familles suivantes : les *BÊTA-LACTAMINES* (l'*OXACILLINE* du groupe des *PÉNICILLINESM*), les *GLYCOPEPTIDES* (*VANCOMYCINE* ou *TEICOPLANINE*) en cas de résistance ou d'intolérance à cette première classe, les *AMINOSIDES* (*GENTAMICINE*), qui permettent d'obtenir une bactéricide rapide en association à l'une des deux classes précédentes, et les *FLUOROQUINOLONES*. D'autres antibiotiques sont également utilisés : les *STREPTOGRAMINES* (*PRISTINAMYCINE*), les *MACROLIDES*, la *CLINDAMYCINE*, le *COTRIMOXAZOLE*, la *RIFAMPICINE*, l'*ACIDE FUSIDIQUE* et la *FOSFOMYCINE*. Ces trois dernières molécules sont données en association du fait des fréquences élevées de mutations. Plus récemment, de nouveaux antibiotiques sont venus renforcer l'arsenal thérapeutique : une *OXAZOLIDINONE*, le *LINÉZOLIDE*, un *LIPOPEPTIDE*, la *DAPTOMYCINE* et une *GLYCYLCYCLINE*, la *TIGÉCYCLINE*. Les conditions techniques générales pour les méthodes de dilution et de diffusion en milieu gélosé sont référencées dans les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie.

(ROLAND LECLECQ 2008)

## IV.2- LES BÊTA-LACTAMINES :

*LES BÊTA-LACTAMINES* ont pour cibles différentes enzymes (« protéines liant les pénicillines » ou PLP) impliquées dans la formation du peptidoglycane. La fixation des *BÊTALACTAMINES* à ces cibles entraîne l'absence de polymérisation du peptidoglycane et secondairement la synthèse par la bactérie d'auto lysines conduisant à sa mort. Les *BÊTA-LACTAMINES* sont donc bactéricides.

La sensibilité des souches de *S. aureus* sauvages aux *BÊTALACTAMINES* varie selon la molécule. Actuellement, 80 % à 95 % des souches de *S. aureus* produisent une pénicillinase qui inactive la pénicilline G et l'ampicilline, rendant leurs indications obsolètes dans le cadre d'une infection à *S. aureus*. Cependant, ces deux *BÊTA-LACTAMINES* sont très actives sur les souches non productrices de pénicillinase [concentrations minimales inhibitrices (CMI) modales respectivement égales à 0,03 mg/L et 0,06 mg/L]. L'*OXACILLINE* et la *CLOXACILLINE* (qui ont remplacé la *MÉTICILLINE*) sont peu sensibles à l'action des pénicillinases acquises, avec des CMI généralement égales à 0,25 mg/L. Les céphalosporines ne sont pas plus actives, celles de 3<sup>e</sup> génération sont nettement moins actives (par exemple la CMI du *CÉFOTAXIME*, égale à 2 mg/L). L'*IMIPÉNÈME* a une activité comparable à celle de L'*OXACILLINE*.

(ROLAND LECLECQ 2008)

### a- À RETENIR :

L'*OXACILLINE* et la *CLOXACILLINE* restent les *BÊTA-LACTAMINES* de référence pour *S. aureus* en l'absence de résistance acquise.

(ROLAND LECLECQ 2008)

## IV.2.1- MÉCANISMES DE RÉSISTANCE :

Deux mécanismes principaux de résistance sont décrits, la production de pénicillinase et la modification de la cible des *BÊTA-LACTAMINES*.

### IV.2.1.1- RÉSISTANCE À LA PÉNICILLINE PAR PRODUCTION DE PÉNICILLINASE :

L'expression de la *PÉNICILLINASE PLASMIDIQUE* est inductible par les *BÊTA-LACTAMINES* et se traduit par une large dispersion des CMI de la pénicilline G et de l'*AMOXICILLINE*. L'interprétation de l'antibiogramme peut ainsi être difficile pour des CMI limites. Par la méthode de diffusion en gélose, la détection de cette résistance se fait en utilisant un disque de pénicilline G chargé à 6 µg.

Les souches sensibles à la pénicilline G ont un diamètre largement > 29 mm, et la zone d'inhibition présente une bordure floue faites de colonies s'amenuisant et devenant transparentes, réalisant une « zone fantôme ».

Les souches résistantes à la pénicilline G ont un diamètre variable (souvent < 25 mm). La zone fantôme est remplacée par des colonies opaques de grande taille, réalisant une bordure nette avec parfois des colonies « squatters » occupant la zone d'inhibition. Cet aspect est caractéristique de la présence d'une pénicillinase sans qu'aucun test additionnel ne soit nécessaire. La présence de pénicillinase pourrait être vérifiée par un test à la *NITROCÉFINE* (méthode enzymatique) en prenant les colonies induites par une pénicilline (colonies en bordure de disque). Les automates testent des concentrations critiques de pénicilline G. Certains incluent un test pénicillinase. Cependant, il existe des faux-négatifs (particulièrement pour les staphylocoques à coagulase négative) et il est nécessaire de contrôler les résultats négatifs par un test à la *NITROCÉFINE*. Le comité européen de l'EUCAST considère que dans les pays à forte prévalence de *S. aureus* producteurs de pénicillinase, il est possible de rapporter toutes les souches comme résistantes à la pénicilline G, à l'ampicilline et l'*AMOXICILLINE* du fait de la difficulté de détection et du risque de faux négatifs.

(ROLAND LECLECQ 2008)

**a- INTERPRÉTATION DE L'ANTIBIOGRAMME ET RÉPONSE AU CLINICIEN :**

Si une résistance à la *PÉNICILLINE G* est détectée, les *BÊTALACTAMINES* suivantes seront inactives : *PÉNICILLINE G*, *AMPICILLINE*, *AMOXICILLINE*, *TICARCILLINE*, *PIPÉRACILLINE*. En revanche, l'association à des inhibiteurs de pénicillinase (*ACIDE CLAVULANIQUE*, *SULBACTAM*, *TAZOBACTAM*) restaure une sensibilité pour ces antibiotiques. Les céphalosporines et l'imipénème ne sont pas hydrolysés par la pénicillinase.

(ROLAND LECLECQ 2008)

**b- À RETENIR :**

La plupart des souches de *S. aureus* produisent une pénicillinase. Tester la pénicilline G par la méthode des disques permet de détecter la résistance par pénicillinase. Les souches productrices de pénicillinase restent sensibles à l'association *AMOXICILLINE-ACIDE CLAVULANIQUE* et aux céphalosporines (en l'absence de *MÉTICILLINO*-résistance).

(ROLAND LECLECQ 2008)

**IV.2.1.2- MÉTICILLINO-RÉSISTANCE PAR MODIFICATION DE CIBLE :**

Cette résistance est due chez *S. aureus* et chez les staphylocoques à coagulase négative à la production d'une PLP additionnelle, la PLP2a, qui se surajoute aux PLP « normales » de *S. aureus*. En présence de *BÊTA-LACTAMINES* (*PÉNICILLINES*, *CÉPHALOSPORINES*, *CARBAPÉNÈMES*), les PLP sont inhibées, sauf la PLP2a. Cette protéine est codée par le gène d'expression inductible *mecA*. Ce gène est porté par un élément génétique mobile particulier, une cassette chromosomique appelée *SCCmec* insérée dans un locus spécifique. L'expression de la résistance est variable en fonction des souches. Elle peut être homogène et dans ce cas, pour la souche considérée, la totalité de la population exprime la résistance à la *MÉTICILLINE*. Elle peut être hétérogène, et dans ce cas seule une fraction de la population bactérienne va exprimer la résistance. Le niveau d'hétérogénéité varie. Certaines souches sont très hétérogènes avec seulement 1/106 bactéries exprimant la résistance. Cette résistance est donc très difficile à détecter alors que ces souches doivent impérativement être considérées comme résistantes. L'expression hétérogène de la résistance est aujourd'hui majoritaire chez les souches de *S. aureus* résistantes à la *MÉTICILLINE* (SARM). Le diagnostic de certitude de la *MÉTICILLINO*-résistance repose sur la détection du gène *mecA*. Malheureusement, ce test ne peut être effectué pour l'instant facilement en routine. L'expression d'une PLP2a peut aussi être recherchée à l'aide de tests au latex commercialisés. Selon les recommandations du CA-SFM, la détection de la résistance nécessite l'emploi de conditions particulières. Il faut modifier les conditions du test en utilisant un fort inoculum et un milieu Mueller-Hinton hyper salé incubé à 37 °C (ou un milieu Mueller-Hinton incubé à 30°C). On peut aussi tester dans les conditions standardisées de la méthode des disques des *BÊTA-LACTAMINES* (*CÉPHAMYCINES*) pour lesquelles l'expression de la résistance est plus franche, la *CÉFOXITINE* ou *LE MOXALACTAM*. En pratique, la simplicité et la meilleure sensibilité du test de la *CÉFOXITINE* le font recommander. Les critères d'interprétation (disque 30 µg) sont :  $\geq 27$  mm, sensible à l'*OXACILLINE* ;  $< 25$  mm, résistant à l'*OXACILLINE*. Un diamètre inférieur à 25 mm est bien corrélé avec la présence du gène *mecA*. Pour des diamètres de 25 ou 26 mm, le résultat est incertain. Il est alors nécessaire de rechercher la PLP2a par un test au latex (dans les conditions indiquées par le fournisseur) après induction (autour du disque de *CÉFOXITINE* ou de *MOXALACTAM*) ou le gène *mecA* par PCR. Certains automates proposent le test automatisé de la *CÉFOXITINE* en sus du test de *L'OXACILLINE*.

(ROLAND LECLECQ 2008)

**a- INTERPRÉTATION DE L'ANTIBIOGRAMME ET RÉPONSE AU CLINICIEN :**

Du fait du mécanisme de modification de cible, la résistance est croisée entre les différentes *BÊTA-LACTAMINES* :

Il s'agit d'une résistance à la famille entière. Cependant, des céphalosporines en développement, *CEFTOBIPROLE* et *CEFTAROLINE*, conservent une certaine activité *in vitro* contre les SARM. La démonstration clinique reste à faire.

Il faut rappeler aussi que le *CÉFOTAXIME* peut être utilisé en association avec la *FOSFOMYCINE* pour les méningites *POSTCHIRURGICALES* à SARM sensible à la *FOSFOMYCINE*.

(ROLAND LECLEQCQ 2008)

**b- À RETENIR :**

Le test de la *CÉFOXITINE* permet de détecter de façon fiable et spécifique la résistance à la *MÉTICILLINE* chez *S. aureus*.

La résistance à la *MÉTICILLINE* est croisée entre toutes les *BÊTA-LACTAMINES* actuellement commercialisées.

(ROLAND LECLEQCQ 2008)

**IV.2.1.3- RÉSISTANCE « BORDERLINE » :**

Les souches « borderline » BORSA (borderline *OXACILLIN* résistant *S. aureus*) montrent une activité diminuée de l'*OXACILLINE* (ou une résistance de bas niveau) non due à la présence du gène *mecA*. Elles ont une CMI de l'*OXACILLINE* égale à 2 mg/L (sensible mais limite). Cette diminution de sensibilité est liée à l'hyperproduction de la pénicillinase touchant l'*OXACILLINE*, sans que l'on puisse la classer résistante.

Des CMI « borderline » de l'*OXACILLINE* se voient aussi en cas de modification des PLP présentes normalement chez *S. aureus* (surtout la PLP4). Ces souches sont alors appelées MODSA. Ces résistances sont difficiles à détecter avec le disque d'*OXACILLINE* et les disques de *CÉFOXITINE* ou de *MOXALACTAM*. La signification clinique de cette diminution de sensibilité n'est pas connue.

(ROLAND LECLEQCQ 2008)

**IV.2.1.4- LES AMINOSIDES :**

Les aminosides inhibent la synthèse protéique en se fixant sur la sous-unité 30S du ribosome bactérien. Ils exercent une activité bactéricide rapide qui justifie leur association aux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse de la paroi (*OXACILLINE* et *VANCOMYCINE*) pour le traitement des infections graves.

La résistance acquise des staphylocoques aux aminosides est surtout due à la production d'enzymes inactivatrices.

Les enzymes sont divisées en trois classes selon la réaction catalysée :

- Aminoside *N-ACÉTYLTRANSFÉRISE* (AAC) : acétylation d'un groupement -NH<sub>2</sub> ;
- Aminoside *O-PHOSPHOTRANSFÉRISE* (APH) : phosphorylation d'un groupement -OH ;
- Aminoside *NUCLÉOTIDYLTRANSFÉRISE* (ANT) : *NUCLÉOTIDYLATION* d'un groupement -OH.

Chacune de ces classes peut être divisée en sous-classes en fonction de la position du carbone qui porte le groupement aminé ou hydroxyle modifié (chiffre arabe). Certaines enzymes d'une même sous-classe peuvent différer par leur profil de substrats, ce qui se traduit par plusieurs formes isozymiques (chiffre romain).

Chaque enzyme va modifier un certain nombre d'aminosides différents, ce qui va se traduire par un phénotype de résistance spécifique de l'enzyme. Chez les staphylocoques, trois enzymes sont connues :

**L'APH (3')-III** confère une résistance à haut niveau à la *KANAMYCINE* et à la néomycine (phénotype K)

Cette enzyme phosphoryle lentement l'*AMIKACINE*, qui conserve une activité bactériostatique mais perd son activité bactéricide et la synergie avec l'*OXACILLINE* et la *VANCOMYCINE* ;

**L'ANT (4') (4'')-I** confère une résistance à haut niveau à la *KANAMYCINE* et à la *TOBRAMYCINE* (phénotype KT)

(ROLAND LECLECQ 2008)

**TABLEAU 3 : ENZYMES INACTIVATRICES DES AMINOSIDES ET PHÉNOTYPES DE RÉSISTANCE.**

Phénotype 1	Acronyme du phénotype	Enzyme	Conséquences sur la synergie avec les <i>BÊTA-LACTAMINES</i> ou les <i>GLYCOPEPTIDES</i>
<i>KANAMYCINE</i>	K	<i>AMINOSIDE PHOSPHOTRANSFÉRISE</i> 3' type III [APH (3')-III]	Pas de synergie avec <i>KANAMYCINE</i> et <i>AMIKACINE</i>
<i>KANAMYCINE-TOBRAMYCINE</i>	KT	<i>AMINOSIDE NUCLÉOTIDYLTRANSFÉRISE</i> 4'-4'' type I [ANT(4')-(4'')-I]	Pas de synergie avec <i>KANAMYCINE</i> , <i>TOBRAMYCINE</i> et <i>AMIKACINE</i>
<i>KANAMYCINE-TOBRAMYCINEGENTAMICINE</i>	KTG	<i>AMINOSIDE ACÉTYLTRANSFÉRISE 6'-PHOSPHOTRANSFÉRISE 2''</i> [AAC (6') APH (2'')]	Pas de synergie avec <i>KANAMYCINE</i> , <i>GENTAMICINE</i> , <i>NÉTILMICINE</i> , <i>TOBRAMYCINE</i> , <i>AMIKACINE</i>
1 Seuls les antibiotiques fortement inactivés sont indiqués.			

(ROLAND LECLECQ 2008)

L'*AMIKACINE* est également substrat pour cette enzyme avec les mêmes conséquences que pour l'enzyme précédente.

Certaines souches produisant à niveau modéré cette enzyme peuvent apparaître résistantes seulement à la *TOBRAMYCINE*. Les CMI de la *KANAMYCINE* sont en fait augmentées, mais insuffisamment pour catégoriser la souche comme résistante. Il faut considérer ces souches comme ayant un phénotype KT ;



**L'APH (2'')-AAC (6')** : cette enzyme qui possède deux fonctions confère une résistance à haut niveau à la *KANAMYCINE*, à la *TOBRAMYCINE* et à la gentamicine (phénotype KTG) (*Tableau 3*).

L'activité enzymatique modifie fortement la *KANAMYCINE*, la gentamicine, la *TOBRAMYCINE* et modérément la *NÉTILMICINE* et l'*AMIKACINE* (à noter que la streptomycine n'est pas affectée par cette enzyme). Là encore, ces deux dernières molécules restent bactériostatiques mais leur activité bactéricide et la synergie avec les inhibiteurs de synthèse de la paroi sont supprimées. En pratique, aucun des aminosides usuels n'est utilisable.

(ROLAND LECLEQC 2008)

#### a- DÉTECTION ET LECTURE INTERPRÉTATIVE :

En pratique, il suffit de tester les aminosides qui sont les meilleurs substrats pour les enzymes inactivatrices, la *KANAMYCINE*, la *TOBRAMYCINE* et la gentamicine.

Il n'est pas utile de tester l'*AMIKACINE* et la *NÉTILMICINE* qui risquent d'induire des réponses faussement sensibles. En cas de résistance à la *KANAMYCINE*, l'*AMIKACINE* est aussi considérée comme inactive du fait de la perte des synergies. En cas de résistance à la gentamicine, l'*AMIKACINE* et la *NÉTILMICINE* sont inactives. La résistance à la *TOBRAMYCINE* répond pour elle-même.

(ROLAND LECLEQC 2008)

#### b- À RETENIR :

Trois enzymes sont responsables des trois seuls phénotypes de résistance connus (K, KT et KTG). Le test de la *KANAMYCINE*, de la *TOBRAMYCINE* et de la gentamicine est suffisant. La réponse pour l'*AMIKACINE* se déduit du test de la *KANAMYCINE* et celle pour la *NÉTILMICINE* du test de la gentamicine.

(ROLAND LECLEQC 2008)

#### IV.2.1.5- LES GLYCOPEPTIDES :

Deux *GLYCOPEPTIDES* sont commercialisés, la *VANCOMYCINE* et la *TEICoplanine*. Ils agissent sur la synthèse du peptidoglycane. Ils utilisent une caractéristique des précurseurs du peptidoglycane qui est de comporter un *ACYL-D-ALANYL-D-ALANINE* à leur extrémité. Les *GLYCOPEPTIDES* se lient aux *D-ALA-D-ALA* terminaux des précurseurs à la surface de la bactérie avec une haute affinité, bloquant ainsi l'addition des précurseurs à la chaîne du peptidoglycane naissant et prévenant les étapes ultérieures de polymérisation.

Ces molécules sont lentement bactéricides.

La découverte de souches de sensibilité diminuée a été à l'origine de controverses toujours actuelles sur leur définition et les méthodes de détection.

(ROLAND LECLEQC 2008)

#### a- MÉCANISMES ET DÉFINITIONS DE LA RÉSISTANCE :

Différents termes et acronymes, VISA, GISA, hétéro-VISA, ont été utilisés pour définir les souches de *S. aureus* de sensibilité diminuée aux *GLYCOPEPTIDES* et plus récemment VRSA pour les souches résistantes.

(ROLAND LECLEQC 2008)

**b- SOUCHES DE SENSIBILITÉ DIMINUÉE AUX GLYCOPEPTIDES :**

Ces souches ont une paroi épaissie résultant d'une réorganisation complexe du métabolisme du peptidoglycane liée probablement à des mutations dans de multiples gènes. Ces réorganisations pourraient empêcher l'accès de la *VANCOMYCINE* à sa cible. Une autre hypothèse non exclusive serait l'hyperproduction de précurseurs du peptidoglycane agissant comme autant de leurres pour les *GLYCOPEPTIDES*. Les souches de sensibilité diminuée aux *GLYCOPEPTIDES* sont isolées à des fréquences faibles dans le monde entier et se recrutent essentiellement parmi les SARM.

(ROLAND LECLECQ 2008)

**☞ VISA et GISA :**

Les termes de VISA (*VANCOMYCIN INTERMEDIATE S. AUREUS*) et de GISA (*GLYCOPEPTIDE INTERMEDIATE S. AUREUS*) regroupent des souches intermédiaires (CMI = 8 mg/L) ou résistantes (CMI > 8 mg/L) à la *TEICOPLANINE* et sensibles (CMI ≤ 4 mg/L) ou intermédiaires (CMI = 8 mg/L) à la *VANCOMYCINE*. Le terme de GISA est préférable car il englobe l'ensemble des souches de sensibilité diminuée à l'un ou l'autre des *GLYCOPEPTIDES*.

(ROLAND LECLECQ 2008)

**☞ Hétéro-VISA :**

Ces souches de *S. aureus*, initialement isolées au Japon, sont sensibles à la *VANCOMYCINE* (CMI 2-4 mg/L) mais présentent des sous-populations intermédiaires à la *VANCOMYCINE* (CMI 6-8 mg/L). Les sous-populations sont présentes à des fréquences faibles, de l'ordre de 10<sup>-5</sup> à 10<sup>-7</sup>, et ne peuvent être mises en évidence à l'antibiogramme standard. Ces souches sont pour leurs grandes majorités intermédiaires à la *TEICOPLANINE* (CMI 8 mg/L), voire résistantes.

La définition des souches hétéro-VISA souffre de l'absence d'une technique génétique servant de référence. De plus, leur signification clinique est discutée. Cependant, beaucoup considèrent que les souches hétéro-VISA constituent le réservoir des souches GISA, l'ensemble ne constituant qu'un continuum de souches de diverses sensibilités aux *GLYCOPEPTIDES*.

(ROLAND LECLECQ 2008)

**☞ VRSA :**

Plus récemment, de rares souches de *S. aureus* résistantes à la *VANCOMYCINE* et à la *TEICOPLANINE* (CMI de la *VANCOMYCINE* > 16 mg/L) ayant acquis l'opéron de résistance à la *VANCOMYCINE* *vanA* ont été rapportées aux États-Unis.

L'opéron *vanA* porté par des plasmides provient de souches d'entérocoques résistantes aux *GLYCOPEPTIDES*. Jusqu'à maintenant, les VRSA n'ont pas été isolés en Europe.

(ROLAND LECLECQ 2008)

**c- DÉTECTION :**

La détection des souches qui ne présentent qu'un niveau modéré de résistance aux *GLYCOPEPTIDES* est importante.

En effet, l'utilisation de la *VANCOMYCINE* ou de la *TEICOPLANINE* dans les cas d'infections dues aux souches catégorisées intermédiaires (ou à plus forte raison résistantes) au *GLYCOPEPTIDE* utilisé conduit fréquemment à des échecs.

Un certain nombre de difficultés sont inhérentes à l'étude de l'activité *in vitro* des *GLYCOPEPTIDES*.

La méthode de diffusion en gélose convient mal pour les *GLYCOPEPTIDES* : ces grosses molécules diffusent médiocrement dans la gélose.

Les méthodes rapides automatisées ne conviennent pas car l'expression de la résistance nécessite un temps prolongé d'incubation.

L'effet inoculum important pour la *TEICOPLANINE* peut amener à surestimer les résistances.

Les difficultés du test des *GLYCOPEPTIDES* contre les staphylocoques ont conduit à une démarche présentée dans les recommandations du CA-SFM. Une diminution de sensibilité aux *GLYCOPEPTIDES* peut être suspectée lorsque l'on utilise les méthodes de routine en prêtant attention à certains critères d'alerte ou par un criblage spécifique. Une fois la diminution de sensibilité suspectée, la catégorisation clinique (S/R) des souches se fait par détermination des CMI des *GLYCOPEPTIDES* dans les conditions standardisées. Parfois, certains tests peuvent être nécessaires en complément. Un arbre décisionnel est présenté.

(ROLAND LECLECQ 2008)

### ☞ TEST DES GLYCOPEPTIDES :

Malgré ses performances médiocres, la méthode de diffusion reste utilisée pour tester les *GLYCOPEPTIDES*. Après une incubation qui doit être de 24 h pleines, un certain nombre de critères doivent alerter sur la possibilité d'une sensibilité diminuée aux *GLYCOPEPTIDES* :

- Un diamètre < 17 mm pour la *VANCOMYCINE* ou la *TEICOPLANINE*;
- Un diamètre d'inhibition de la *TEICOPLANINE* inférieur ou égal d'au moins 3 mm à celui de la *VANCOMYCINE*;
- La présence de colonies dans la zone d'inhibition d'un *GLYCOPEPTIDE*.

Avec les automates, un résultat intermédiaire ou résistant pour la *VANCOMYCINE* ou la *TEICOPLANINE* doit faire confirmer le résultat.

Les méthodes de routine pouvant être en défaut pour la détection des GISA et ne détectant pas les hétéro-VISA, certaines équipes utilisent une des méthodes suivantes de criblage.

- Le CA-SFM recommande l'utilisation d'une gélose de Mueller-Hinton supplémentée par 5 mg/L de *TEICOPLANINE*, ensemencée avec 10 µL d'une suspension de turbidité *MCFARLAND 2*, incubée à 35 °C-37 °C pendant 24 et 48 h ; le test est positif en cas de présence d'au moins 4 colonies.

Cette méthode a l'avantage d'être très sensible, la *TEICOPLANINE* étant le meilleur marqueur de la résistance, mais elle manque de spécificité.

- Par la méthode E-test® : il faut ensemencer par écouvillonnage une gélose cœur-cerveau avec 200 µL d'une suspension lourde (turbidité *MCFARLAND 2*). La lecture est faite à 24 h et confirmée à 48 h. Si les concentrations inhibitrices de la *VANCOMYCINE* et de la *TEICOPLANINE* sont supérieure ou égales à 8 mg/L (ne pas convertir un résultat de 6 mg/L en 8 mg/L) ou bien si la concentration inhibitrice de la *TEICOPLANINE* seule est supérieure ou égale à 12 mg/L, la souche est vraisemblablement de sensibilité diminuée aux *GLYCOPEPTIDES*. Attention, ce test est un test de criblage qui ne permet pas de déterminer la CMI : celle-ci doit être réalisée dans les conditions standardisées.



D'autres critères incitent également à vérifier d'emblée la sensibilité aux *GLYCOPEPTIDES*, au moins dans les infections sévères. Ainsi, une attention est requise envers les souches de SARM résistantes à la gentamicine et à la rifampicine. C'est en effet à ce groupe de souches.

Qu'appartiennent la plupart des VISA/GISA isolés en France.

(ROLAND LECLECQ 2008)

#### ☛ CONFIRMATION DE LA RÉSISTANCE ET CATÉGORISATION DES SOUCHES :

##### •Mesure des CMI :

La mesure de la CMI s'effectue par une méthode de référence ou par la technique E-test® en gélose Mueller- Hinton avec une suspension de turbidité équivalente à *MCFARLAND* 0,5. Les lectures doivent être effectuées après 24 h pleines d'incubation et les réponses rendues selon les critères de catégorisation clinique.

(ROLAND LECLECQ 2008)

##### •Cas des hétéro-VISA :

Ces souches apparaissent sensibles à la *VANCOMYCINE* et l'hétéro-résistance à la *VANCOMYCINE* ne peut pas être mise en évidence par détermination de la CMI, par définition, puisque l'inoculum bactérien testé est d'environ 10<sup>4</sup> bactéries et que la fréquence de la sous-population intermédiaire à la *VANCOMYCINE* est inférieure à ce seuil.

Il faut suspecter un hétéro-VISA devant :

- une CMI de la *VANCOMYCINE* égale à 4 mg/L avec la méthode E-test® ;
- une réponse intermédiaire (CMI = 8 mg/L) pour la *TEICOPLANINE* avec sensibilité à la *VANCOMYCINE* (CMI = 2 ou 4 mg/L) avec la méthode E-test® ;
- une positivité à un des tests de criblage.

La technique de référence pour identifier un hétéro-VISA est l'analyse de population. Cette technique consiste à étaler différentes dilutions d'un inoculum fort de la souche sur des milieux gélosés contenant des concentrations croissantes de *VANCOMYCINE*. Les colonies ayant poussé sur ces milieux sont comptées après 48 h d'incubation et l'on calcule le pourcentage de bactéries qui poussent aux différentes concentrations. Un résultat typique est présenté Comme cette technique est difficilement réalisable en pratique, certains se contentent des méthodes de criblage utilisant la méthode E-test® ou le milieu Mueller-Hinton avec 5 mg/L de *TEICOPLANINE* en remplacement, mais avec une spécificité et une sensibilité qui se situent un peu au delà de 80 % Ces méthodes peuvent être utilisées en routine d'emblée ou en seconde intention.

(ROLAND LECLECQ 2008)

##### •Réponse au clinicien

Pour les souches hétéro-VISA, l'attention du clinicien doit être attirée sur la sensibilité diminuée à la *VANCOMYCINE*, qui n'interdit pas son usage mais incite à une surveillance étroite du traitement.

##### •À retenir

Les méthodes de routine peuvent être prises en défaut pour détecter les résistances mais peuvent alerter sur une possible diminution de la sensibilité aux *GLYCOPEPTIDES*.

Celle-ci doit être confirmée par la mesure des CMI qui est la méthode de référence.

Une CMI de la *VANCOMYCINE* égale à 4 mg/L ou une réponse intermédiaire pour la *TEICOPLANINE* avec sensibilité à la *VANCOMYCINE* doit faire suspecter un hétéro-VISA. La méthode de confirmation de référence est l'analyse de population.

(ROLAND LECLECQ 2008)

**IV.2.1.6- LES MACROLIDES-LINCOSAMIDES STREPTOGRAMINES :**

Les macrolides, *LINCOSAMIDES* et *STREPTOGRAMINES* (MLS) appartiennent au même groupe du fait d'un mode d'action proche (inhibition de la synthèse protéique par fixation sur l'ARN 23S de la sous-unité 50S du ribosome bactérien) et d'une résistance fréquemment croisée entre ces antibiotiques. Cependant, ces antibiotiques sont à considérer classe par classe. Les macrolides présentent une structure chimique commune constituée d'un macrocycle avec des fonctions lactones comprenant un ensemble de 14 (*ÉRYTHROMYCINE, CLARITHROMYCINE, ROXITHROMYCINE...*), 15 (*AZITHROMYCINE*) OU 16 ATOMES (*JOSAMYCINE, SPIRAMYCINE*). Les *LINCOSAMIDES* sont composés de la *LINCOMYCINE* et de la *CLINDAMYCINE*. Les *STREPTOGRAMINES* sont une association des deux composés, le composé A (*PRISTINAMYCINE IA* ou *DALFOPRISTINE*) et le composé B (*PRISTINAMYCINE IIA* ou *QUINUPRISTINE*). Leur place dans l'arsenal thérapeutique *ANTISTAPHYLOCOCCIQUE* est d'autant plus importante qu'ils sont une alternative en cas d'allergie aux pénicillines. Contrairement aux *STREPTOGRAMINES*, les macrolides et les *LINCOSAMIDES* ne sont pas bactéricides pour *S. aureus*.

(ROLAND LECLEQC 2008)

**a- MÉCANISMES DE RÉSISTANCE :****☞ MÉTHYLATION RIBOSOMALE (PHÉNOTYPE MLSB) :**

Ce mécanisme de résistance est le plus fréquent. Il est lié à la modification du ribosome due à la *MÉTHYLATION* de l'adénine 2058 de l'ARN ribosomal 23S. Ce groupement méthyle empêche alors toute fixation de l'antibiotique sur sa cible. Cette base étant un site de fixation commun aux macrolides, *LINCOSAMIDES* et *STREPTOGRAMINES B*, la résistance affectera ces trois groupes. Les gènes codant une *MÉTHYLASE* sont nommés *erm* (*ERYTHROMYCIN RIBOSOME METHYLASE*). Chez *S. aureus*, les deux principaux gènes identifiés sont *erm(A)* et *erm(C)*. L'expression des gènes *erm* peut être inductible ou constitutive. Dans le premier cas, la *MÉTHYLASE* n'est synthétisée qu'en présence d'un inducteur.

Seuls les macrolides à 14 et 15 atomes sont inducteurs et sont inactifs. En revanche, les macrolides à 16 atomes, les *LINCOSAMIDES* et les *STREPTOGRAMINES* ne sont pas des inducteurs et restent donc actifs. Ce mécanisme de résistance peut être identifié par diffusion en milieu gélosé. En effet, lorsqu'un disque d'érythromycine (inducteur) est placé à côté d'un disque de clindamycine, de *LINCOMYCINE*, de *SPIRAMYCINE* ou de *JOSAMYCINE* (non inducteurs), un aplatissement de la zone d'inhibition autour du disque contenant l'antibiotique non inducteur est observé en regard du disque d'érythromycine, formant une zone en forme de D. Lorsque l'expression des gènes *erm* est constitutive, la *MÉTHYLASE* est synthétisée en permanence. Les macrolides, *LINCOSAMIDES* et *STREPTOGRAMINES B* ne sont donc pas actifs. Cependant, la synergie entre les facteurs A et B des *STREPTOGRAMINES* est conservée, expliquant l'activité de la *PRISTINAMYCINE*. Les CMI des souches d'expression constitutive ne sont augmentées que d'une dilution au maximum par rapport à celles des souches sensibles. En revanche, l'activité bactéricide précoce est supprimée.

(ROLAND LECLEQC 2008)

**☞ EFFLUX (PHÉNOTYPE MSB) :**

C'est le deuxième mécanisme de résistance aux macrolides le plus important chez *S. aureus*. La présence d'une pompe ATP-dépendante codée par le gène *PLASMIDIQUE msrA* va conférer une résistance par efflux aux macrolides à 14 et 15 atomes ainsi qu'aux *STREPTOGRAMINES B* (sans conséquence sur l'activité de la *PRISTINAMYCINE*). La résistance isolée à l'érythromycine et l'absence de zone en forme de D entre un disque d'érythromycine et un disque de *LINCOMYCINE* permettent de reconnaître ce phénotype.

(ROLAND LECLEQC 2008)

**☛ INACTIVATION DES LINCOSAMIDES (PHÉNOTYPE L) :**

Ce phénotype est dû à l'acquisition du gène *lnu(A)*. La production d'une enzyme inactivant les *LINCOSAMIDES* se traduit par une diminution franche de l'activité de la *LINCOMYCINE*, alors que la diminution de l'activité de la clindamycine reste modérée.

(ROLAND LECLEQC 2008)

**☛ PHÉNOTYPE LSA :**

Le mécanisme de ce phénotype n'est pas complètement élucidé. Les souches résistantes aux *LINCOSAMIDES* et aux *STREPTOGRAMINES A* possèdent parfois les gènes d'efflux du facteur A *vga(A)* et *vga(Ag)*. Les *LINCOSAMIDES* (*LINCOMYCINE* et clindamycine) sont souvent catégorisés intermédiaires.

En revanche, la CMI de la *STREPTOGRAMINE A* est élevée. L'activité de l'association *STREPTOGRAMINE A* et *STREPTOGRAMINE B* est diminuée avec une augmentation modérée des CMI (catégorisation sensible ou intermédiaire).

(ROLAND LECLEQC 2008)

**☛ RÉSISTANCE À LA PRISTINAMYCINE (PHÉNOTYPE SAB) :**

La résistance isolée à la PRISTINAMYCINE peut se rencontrer. Elle est due à l'acquisition de gènes conférant la résistance au facteur A (gènes *vat* codant des ACÉTYLASES OU VGA codant une protéine de pompe à efflux) associés ou non à des gènes conférant la résistance au facteur B (gènes VGB codant des lyases). La résistance à la PRISTINAMYCINE est souvent associée à la résistance MLSB constitutive.

(ROLAND LECLEQC 2008)

**b- DÉTECTION ET LECTURE INTERPRÉTATIVE :**

Le test de l'érythromycine, de la *LINCOMYCINE* et de la *PRISTINAMYCINE* permet de reconnaître les phénotypes et d'interpréter les résultats. La distance entre les disques d'érythromycine et de *LINCOMYCINE*, habituellement égale à 24 mm de bord à bord, est généralement suffisante pour observer les interactions ; il peut être nécessaire de rapprocher davantage les disques.

(ROLAND LECLEQC 2008)

**☛ RÉSISTANCE ISOLÉE À L'ÉRYTHROMYCINE :**

S'il s'agit d'un phénotype MLSB inductible (zone en forme de D), des mutants constitutifs peuvent être sélectionnés en présence de macrolide ou de *LINCOSAMIDE* non inducteur à partir de souches inductibles à la fréquence de 10<sup>-7</sup>. Des cas cliniques d'échec par mutation ont été rapportés. Bien que son importance ne soit pas connue, ce risque devrait être signalé au clinicien. Les macrolides à 16 atomes, les *LINCOSAMIDES* et la *STREPTOGRAMINE B* sont actifs mais risquent de sélectionner des mutants résistants.

S'il s'agit d'un phénotype d'efflux, il n'y a pas lieu de réinterpréter la sensibilité aux macrolides à 16 atomes, aux *LINCOSAMIDES* et aux *STREPTOGRAMINES*. Les méthodes automatisées en milieu liquide ne permettent pas encore de distinguer ce phénotype du précédent.

(ROLAND LECLEQC 2008)

### ☛ RÉSISTANCE À L'ÉRYTHROMYCINE ET À LA LINCOMYCINE (PHÉNOTYPE MLSB CONSTITUTIF) :

Seule la *PRISTINAMYCINE* est active mais la modification de l'activité bactéricide fait discuter son utilisation. Lors d'une infection sévère comme par exemple une infection osseuse, la prudence s'impose dans l'utilisation de cette molécule et il faut s'en référer aux recommandations de bonne pratique. Les méthodes automatisées détectent bien ce phénotype.

(ROLAND LECLECQ 2008)

### ☛ RÉSISTANCE ISOLÉE À LA LINCOMYCINE :

Il semble nécessaire de modifier le résultat sensible en intermédiaire pour la clindamycine. Cette résistance n'affecte pas les autres antibiotiques du groupe MLS.

### IV.2.1.7- LES QUINOLONONES :

Les quinolones ont pour cible des enzymes essentielles à la survie bactérienne, les *TOPOISOMÉRASES* de type II incluant la *GYRASE* (composée de deux sous unités, *GYRA* et *GYRB*) et la *TOPOISOMÉRASE IV* (composée de deux sous unités, *PARC* et *PARE*).

Ces enzymes sont responsables du surenroulement de la molécule d'ADN (*GYRASE*), nécessaire à son stockage sous forme compacte ou, inversement, au désenchevêtrement s'opérant lors de la traduction en ARN m. (*TOPOISOMÉRASE IV*). La liaison des quinolones à leurs cibles entraîne l'arrêt de la réplication et de la transcription de l'ADN bactérien. Les *FLUOROQUINOLONONES* sont rapidement bactéricides.

*S. aureus* est naturellement résistant aux quinolones de première génération (*ACIDE NALIDIXIQUE*, *ACIDE OXOLINIQUE ET FLUMÉQUINE*), mais sensible aux *FLUOROQUINOLONONES* systémiques (*CIPROFLOXACINE*, *LÉVOFLOXACINE*, *MOXIFLOXACINE*, *OFLOXACINE ET PÉFLOXACINE*) ou urinaire (*NORFLOXACINE*).

(ROLAND LECLECQ 2008)

### a- MÉCANISMES DE RÉSISTANCE :

#### ☛ MODIFICATION DE CIBLE

Le principal mécanisme de résistance est dû à l'apparition de mutations ponctuelles dans la ou les cibles des quinolones (*GYRASE* et *TOPOISOMÉRASE IV*). Ces mutations siègent le plus souvent dans une courte région conservée appelée QRDR (quinolone résistance determining région). Les quinolones n'arrivent alors plus à se fixer à leurs cibles. Chez *S. aureus*, une première mutation sur une cible (en général *ParC*) va conférer un niveau de résistance de bas niveau. Dans un deuxième temps, une deuxième mutation sur la deuxième cible (*ParC*, *ParE* ou *GyrA*) va conférer une résistance de haut niveau. Les souches de haut niveau auront alors une résistance croisée à la *PÉFLOXACINE*, à la *CIPROFLOXACINE*, à la *LÉVOFLOXACINE* et à la *MOXIFLOXACINE*.

(ROLAND LECLECQ 2008)

**☞ EFFLUX :**

Des pompes vont diminuer la concentration *INTRACYTOPLASMIQUE* de certaines quinolones spécifiques : la *CIPROFLOXACINE* ET LA *NORFLOXACINE*. La surexpression d'une pompe inducible de la famille « *MAJOR FACILITATOR SUPERFAMILY* » entraîne la résistance qui est alors associée À LA résistance au *CHLORAMPHÉNICOL*. L'Efflux peut s'associer au mécanisme précédent.

(ROLAND LECLEQC 2008)

**☞ DÉTECTION ET LECTURE INTERPRÉTATIVE :**

Il suffit de tester une *FLUOROQUINOLONE*, de préférence parmi les moins actives (*PÉFLOXACINE*, *OFLOXACINE* OU *NORFLOXACINE*). La réponse vaut pour l'ensemble de la classe.

(ROLAND LECLEQC 2008)

**IV.1 .2.8- LES AUTRES ANTIBIOTIQUES :****a- SULFAMIDES ET TRIMÉTHOPRIME :**

Les acides foliques sont impliqués dans la synthèse des acides nucléiques. En raison de leur activité anti-folique, les sulfamides et le *TRIMÉTHOPRIME* interfèrent avec la synthèse des acides nucléiques et des protéines. L'association de ces deux molécules est synergique. Cette synergie est maintenue en cas de résistance isolée aux sulfamides, mais pas en cas de résistance isolée au *TRIMÉTHOPRIME*.

Chez *S. aureus*, la résistance aux sulfamides est fréquente (30 à 50 % des souches de *S. aureus* sensibles à la *MÉTICILLINE* et 80 à 95 % des SARM), souvent par modification de la cible. La résistance au *TRIMÉTHOPRIME* est elle aussi due à une modification de la cible.

(ROLAND LECLEQC 2008)

**b- ACIDE FUSIDIQUE :**

L'acide *FUSIDIQUE*, représentant unique de sa famille, inhibe la synthèse protéique en interférant avec une GTPase (facteur d'élongation G (EF-G)), empêchant la progression de la chaîne polypeptidique au niveau du ribosome. Il existe deux mécanismes de résistance à cet antibiotique chez *S. aureus* : mutation dans le gène *fusA*, codant le facteur d'élongation G ou diminution de la perméabilité. Les mutants pour le premier type de résistance sont obtenus à une fréquence élevée, de l'ordre de  $10^{-6}$  à  $10^{-8}$ .

(ROLAND LECLEQC 2008)

**c- RIFAMPICINE :**

La rifampicine inhibe l'ARN polymérase, bloquant ainsi la transcription. Elle est bactéricide. Des mutations au sein du gène *rpoB* codant la chaîne bêta de l'ARN polymérase sont responsables du phénotype de résistance à cet antibiotique. La plupart des souches présentent un haut niveau de résistance (CMI > 32 mg/L), d'autres sont catégorisées intermédiaires (CMI = 1 mg/L). Ces deux types présentent des mutations différentes.

(ROLAND LECLEQC 2008)

**d- OXAZOLIDINONES :**

Le *LINÉZOLIDE* est le seul représentant de cette famille. C'est un inhibiteur de la synthèse protéique. Il interagit au niveau de la sous-unité 50S du ribosome et bloque une étape précoce de la synthèse protéique. C'est un antibiotique bactériostatique très actif sur *S. aureus*, incluant les SARM.

La détection de la résistance s'effectue selon les méthodes standardisées. Parfois, les méthodes de diffusion peuvent surestimer la résistance. Les résultats intermédiaires ou résistants doivent être vérifiés par la détermination de la CMI (méthode de référence ou E-test®). Il existe de rares souches de *S. aureus* résistantes au *LINÉZOLIDE*.

(ROLAND LECLEQC 2008)

**e- LIPOPEPTIDE :**

La *DAPTOMYCINE* est le seul représentant de cette famille. Le mécanisme d'action de cet antibiotique n'est pas encore complètement élucidé. Son insertion dans la membrane cytoplasmique (mécanisme calcium dépendant) crée une dépolarisation de la membrane et une fuite d'ions potassium.

La bactérie arrête alors toute synthèse d'ADN, d'ARN et de protéines. C'est un antibiotique bactéricide. Cependant, des mutants résistants sont isolés *in vivo*. Les CMI de la *DAPTOMYCINE* augmentent parallèlement à celles de la *VANCOMYCINE*. En effet, l'épaississement de la paroi observé chez les VISA gênerait l'accès de la *DAPTOMYCINE* à la membrane cytoplasmique.

(ROLAND LECLEQC 2008)

**f- GLYCYLCYCLINE :**

LA *TIGÉCYCLINE* est le seul représentant de cette sous-classe dérivée des tétracyclines. Cet antibiotique à spectre large est actif contre les souches de staphylocoques hébergeant les classiques mécanismes de résistance aux tétracyclines par protection du ribosome ou efflux actif. Les souches de staphylocoques résistantes sont exceptionnelles.

(ROLAND LECLEQC 2008)

**g- LES PHÉNOTYPES ASSOCIÉS DE RÉSISTANCE :**

Les phénotypes associés de résistance se voient surtout chez les SARM. La résistance à la *MÉTICILLINE* chez *S. aureus* est longtemps restée strictement hospitalière, résultant de la diffusion mondiale de 5 principaux clones. Pour ces clones, il existe une résistance associée à de multiples antibiotiques (*FLUOROQUINOLONES*, *MACROLIDES*, *AMINOSIDES*...).

Les combinaisons de résistance ont beaucoup varié dans le passé. Actuellement, la résistance à la *MÉTICILLINE* est associée dans environ 90 % des cas à la résistance aux *FLUOROQUINOLONES* et au phénotype de résistance aux aminosides KT. La résistance MLSB constitutive est présente chez plus de 50 % des souches. La fréquence de la résistance à la gentamicine, à la rifampicine, à la *FOSFOMYCINE* ou à l'*ACIDE FUSIDIQUE* est proche de 10 %.

Par ailleurs, depuis quelques années, on observe l'apparition de souches communautaires de SARM [CA-MRSA (COMMUNITY-ACQUIRED MRSA)].

Elles sont rares en France bien qu'en fréquence croissante. Ces staphylocoques sont surtout isolés chez l'enfant ou bien au sein de certaines collectivités (équipes de sport collectif, prisonniers).



Dans presque tous les cas, ils possèdent les gènes codant la *LEUCOCIDINE* de *PANTON VALENTINE* qui leur confère un pouvoir pathogène particulier. Ces souches sont responsables d'infections sévères de la peau et des tissus mous.

Les SARM communautaires sont résistants, outre à la *MÉTICILLINE*, à la *KANAMYCINE*, à *L'ACIDE FUSIDIQUE* (intermédiaire) et souvent aux tétracyclines.

(ROLAND LECLECQ 2008)

**TABLEAU.4 PRINCIPAUX PHÉNOTYPES DE RÉSISTANCE AUX MLS CHEZ LES STAPHYLOCOQUES.**

Mécanisme	Classe de gènes	Phénotype	Phénotype de résistance			
			14-,15-M	16-M	L	S
<i>MÉTHYLATION RIBOSOMALE</i>	<i>erm(A), erm(C)</i>	MLSB inductible	R	Sa	Sa	S
		MLSB constitutif	R	R	R	Sb
Efflux	<i>msr(A)</i>	MSB	R	S	S	S
Modification enzymatique	<i>lnu(A)</i>	L	S	S	Rc	S
Efflux ?	<i>vga(A), vga(Av), lsa(B)</i> , déterminants inconnus	LSA	S	S	I	S
Modification enzymatique des facteurs A ou B +/- efflux du facteur A	<i>vat(A), vat(B), vat(C), vga(A), vga(Av), vga(B), vgb(A), vgb(B)</i> en diverses combinaisons	S ou LSd	S	S	S ou Id	R

a -Risque de sélection de mutant résistant.

b- Activité bactéricide réduite.

c- Résistance à la *LINCOMYCINE* et sensibilité à la clindamycine (interpréter I).

d -Possibilité de résistance à la *LINCOMYCINE* et à la clindamycine en cas de présence des gènes *VGA(A)* ou *VGA(AV)*.

(ROLAND LECLECQ 2008)

**TABLEAU 5 : MECANISME DE RESISTANCE DES BACTERIES AUX ANTIBIOTIQUES :**

Antibiotiques	Mécanisme de résistance	Groupe bactérien
B-LACTAMINE	B.LACTAMINE	Staphylocoques/ entérobactéries
	Modification des PLP ciblent	Pneumocoque, SARM, <i>NEISSÉRIA</i> , <i>HAEMOPHILUS</i> , <i>PSEUDOMONAS</i>
CHLORANPHENICOL	acétylation	Gram+ et Gram-
AMINOSIDES	Modification des protéines ribosomales	Streptocoques
	Enzymes d'inactivation	Entérobactéries, Staphylocoques
MACROLIDES LINCOSAMINES STREPTOSAMINES	<i>MÉTHYLATION</i> de l'ARN r	Gram+
QUINOLONES	Modification de l'ARN gyraze	Gram+ et Gram-
RIMANPICINES	Mutation de l'ARN polymérase	Gram+ et Gram-

(ROLAND LECLECQ 2008)



# **Partie expérimentale**

Cette étude a été déroulée pendant la période qui s'étant MARS\_ AVRIL 2011 à la ferme d'état commune MAZEGHRAN wilaya de MOSTAGANEM.

### **I-LIEU D'ACCES :**

Notre travail a été réalisé au de laboratoire vétérinaire régional de MOSTAGANEM « LVR » qui était constitué en 1985 à plusieurs services :

- Bactériologie médicale
- Sérologie
- Hygiène alimentaire
- Parasitologie
- Histologie
- Service de brucellose

### **II-MATERIELS ET METHODES :**

La souche bactérienne a été prélevée à partir de lait mamiteux.

#### **II.1-PROTOCOLE DE PRELEVEMENT :**

- désinfection des tryans de chaque vache à l'aide de solution antiseptique.
- élimination des premiers jets dans un bol.
- la récolte de lait en des tubes vakitinaires « des tubes stériles »

Seuls les prélèvements pour recherche de S-aureus ont été pris en compte.

Les échantillons ont été d'abord cultivés sur gélose de CHAPMAN MANNITE (qui contient une base péotonée contenant de mannitol, chlorure, sodium et rouge de phénol) et incubées à 37°C et 5% d'humidité (la bactérie a été ensemencée dans une boîte de pétrie) pendant 24-48 h.

#### **II.2- PURIFICATION DE GENRE DE S-AUREUS :**

**II.2.1 COLORATION SIMPLE :** A base de bleu de méthylène

#### **II.2.2 COLORATION DE GRAM :**

Voici les étapes à franchir pour accomplir cette coloration.

- préparation un frottis sur une lame de verre et fixer à chaleur.
- en suite, couvrir le frottis avec violet de gancian, laisser agir pendant 30 sec.
- en ajoute lugol, laisse 1min, laver avec l'eau.

-par suite, en ajoute alcool 5-10 sec.

-couvrir le frottis par la Fushine pendant 1 min.

-laver et sécher, examiner le frottis à l'immersion.

### **II-3- IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE DE S-AUREUS :**

#### **II.3.1 TEST DE CATALASE :**

Le test de catalase est réalisé par l'ajout d'une goutte d' $H_2O_2$  à une colonie, et l'apparition d'une bulle montrant que la bactérie est catalase positif ou négatif.

#### **II.3.2 TEST DE CITRATE :**

A partir d'une suspension bactérienne de S- aureus l'ensemencement est réalisé dans un tube contenant un milieu gélosé incliné appelle : « citrate de Simmons », puis l'incubation à  $37^\circ C$  pendant 18-24H.

#### **II.3.3 TEST DE H<sub>2</sub>S :**

L'ensemencement de la bactérie se fait dans un tube qui contient un milieu *THRÉE SHUGER IRON* (TSI) et l'incubation est à  $37^\circ C$  pendant 18-24H ; l'apparition de couleur noir est le résultat de la formation de sulfure de fer à partir de l'association du citrate de fer avec le sulfure d'hydrogène, ainsi que le dégagement du  $CO_2$  à partir de fermentation de glucose.

#### **II.3.4 TEST DE MANNITOL DE MOBILITE :**

Un tube de mannitol de mobilité a été repiqué pour mettre en évidence la mobilité bactérienne et incubé à  $37^\circ C$  pendant 18-24H.

La mobilité bactérienne se traduit par la présence ou l'absence d'une culture à proximité de la piqûre centrale montrant la mobilité bactérienne.

#### **II.3.5 COSERVATION DE LA BACTERIE :**

La souche de S-aureus ainsi purifiée est repiquée dans la gélose nutritive (gélose de conservation).

Les tubes sont ensuite conserve à  $4^\circ C$  pour une utilisation ultérieure.

### **II-4- REALISATION D'ANTIBIOGRAMME :**

Lorsque la bactérie identifiée était jugée cliniquement importante, des antibiogrammes étaient réalise selon la méthode de KIRBY BAUER avec les normes standardisées décrites dans la partie bibliographique.

Le milieu de MULLER HINTON(MH) à été coulé en boite de pétrie avec une épaisseur d'environ 4 mm, après solidification on ensemence une suspension bactérienne âgée de 18-24H à la surface de chaque boite par inondation, les boites sont mises dans l'étuve à  $37^\circ C$  pendant 10 min pour le séchage.

L'antibiogramme à été effectué dans une zone stérile, près de bec BENZEN. Chaque antibiotique est prélevé avec une pince spéciale stérile posée au niveau d'un appareil spécial pour la disposition des disques

d'antibiotique en respectant mesures de 2cm à proximité d'un autre en moyenne d'une quatre antibiotique par boîte, une légère pression à été effectuée sur les disques pour une bonne adhésion à la gélose.

L'incubation à été réalisée à une température de 37°C pendant 18-24H.

### **II.4.1 CHOIX DES ANTIBIOTIQUES :**

Le choix à été basé d'une part sur les antibiotiques qui peuvent inhiber S-aureus même en petites efficacités, et d'autre part sur la disponibilité des antibiotiques sur le marché.

Dans notre travail nous avons choisi les antibiotiques suivants :

CIPROFLOXACINE de famille FLUOROQUINOLONES

SULPHONAMIDE de famille SULFAMIDES

BACITRACINE de famille POLYPEPTIDES

VANCOMYCINE de famille GLYCOPEPTIDES

ERYTHROMYCINE de famille MACROLIDES

OXYTETRACYCLINE de famille TETRACYCLINES

PENICILLINE G de famille PENICILLINE

STREPTOMYCINE

### **III- LES RESULTATS :**

#### **III.1. PURIFICATION DU GENRE DE S-AUREUS :**

##### **III.1.1 OBSERVATION MACROSCOPIQUE :**

Sur la boîte de pétrie, les colonies de S-aureus sont petites 0,5-1 mm de diamètre, de couleur jaune à jaune doré, de surface lisse à contour régulier de forme ronde.

##### **IV.1.2 OBSERVATION MICROSCOPIQUE :**

La coloration par le bleu de méthylène à révélé la présence de cocci colorées en bleu regroupées en diplocoques, ou en petites amas (grappes de raisins), ou en courte chaînettes ne groupant jamais plus de 4 bactéries.

Par coloration de gram, les mêmes associations étaient observée sauf que leur couleur était violette ce qui nous à permet de dire qu'elles sont de gram positif.

Cette observation nous a indiqué qu'il n'y a pas présence d'une contamination du fait de l'homogénéisation du frottis.

### III.2. IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE DE LA SOUCHE :

#### III.2.1 TEST DE CATALASE :

Le mélange d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) avec la suspension bactérienne résulte l'apparition de bulles d'oxygènes qui se traduit la présence d'une catalase positive.

L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est décomposée en eau et oxygène selon la réaction suivante :



#### III.2.2 TEST DE CITRATE :

Dans le milieu de CITRATE DE SIMMONS, le citrate doit être utilisé comme seule source de carbone, la dégradation de citrate est traduite par virage au bleu de l'indicateur.

*S. aureus* ne présente pas une citratase active (citrate négative) car il n'y pas un virage au bleu de l'indicateur.

#### III.2.3 TEST DE H<sub>2</sub>S :

Après incubation du milieu TSI, nous avons constaté que *S. aureus* n'a produit ni gaz à partir des trois sucres ni sulfure de fer (Fe S) de couleur noire, donc la bactérie n'est pas productrice d'H<sub>2</sub>S.

#### III.2.3 TEST DE MANNITOL DE MOBILITE :

La lecture de milieu du mannitol de mobilité, montre que la culture se présente autour de la pique centrale sans modification, donc c'est une souche immobile.

C'est résultat est confirmé par une goutte de suspension bactérienne entre lame et lamelle et observation microscopique, qui montre l'absence de la mobilité et absence aussi des flagelles.

Le virage de couleur du milieu au jaune est résultat de dégradation du mannitol.

### III.3 RESULTAT D'ANTIBIOGRAMME :

Les prélèvements sont obtenus à partir de 6 vaches qui ont mammite clinique.

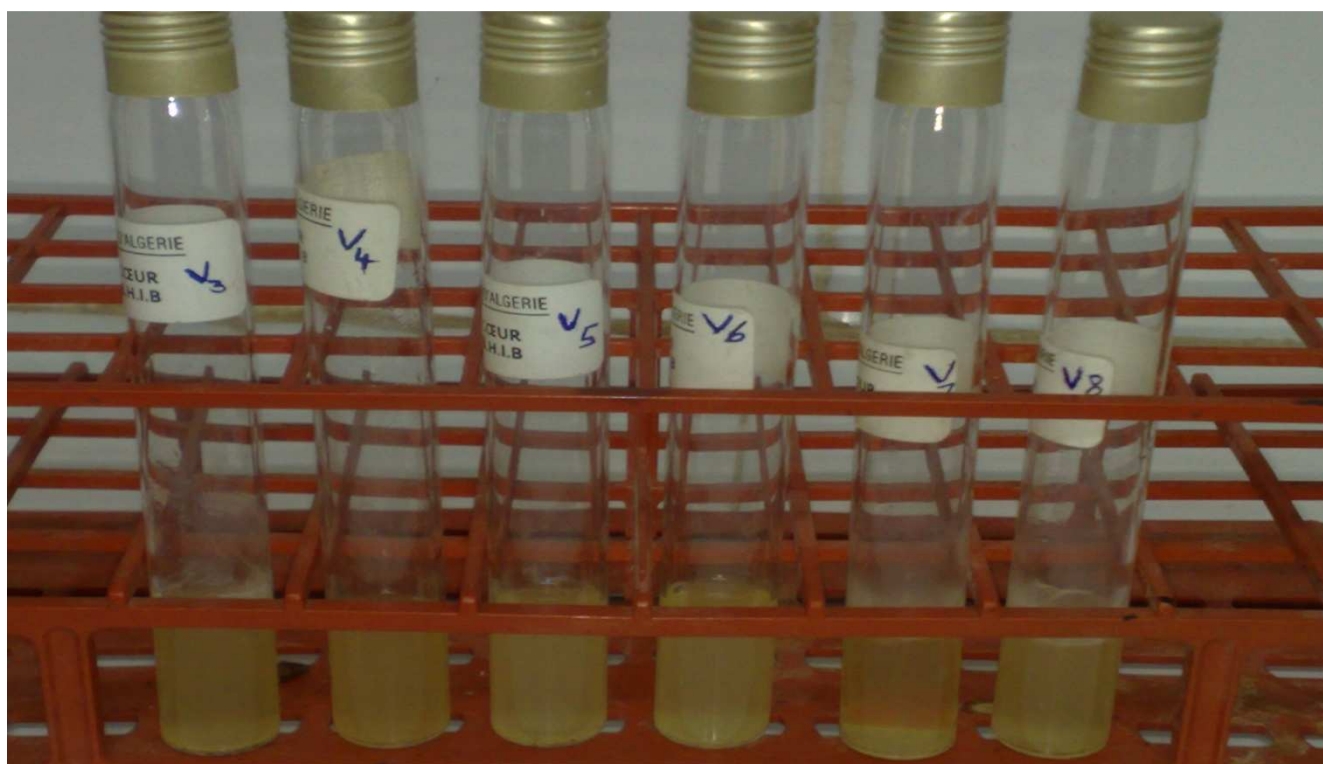
Après la diffusion de l'antibiotique dans le milieu de culture à partir de disques en créant une zone d'inhibition circulaire.

La lecture s'effectue en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de chaque disque en moyen d'un compas appliquer près en contact.

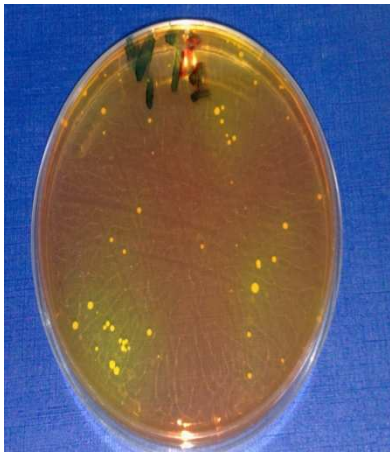
**TABLEAU N : 1 DIAMETRE D'INHIBITION :**

PRELEVEMENT	Vache 1	Vache 2	Vache 3	Vache 4	Vache 5	Vache 6
ERYTROMYCINE	11	0	17	15	41	0
SULPHONAMIDE	26	0	17	11	43	28
STREPTOMYCINE	0	0	0	32	17	22
PENICILLINE	19	0	24	31	25	29
OXYTETRACYCLINE	8	0	0	11	0	27
VANCOMYCINE	21	0	0	21	19	16
OXACILLINE	23	0	0	16	17	19
BACITRACINE	22	16	0	16	22	0
CIPROFLOXACINE	43	30	33	31	33	0

**FIGURE 01 :RESULTAT DES PRELEVAMENT SUR MILIEU D'B.H.I.B**



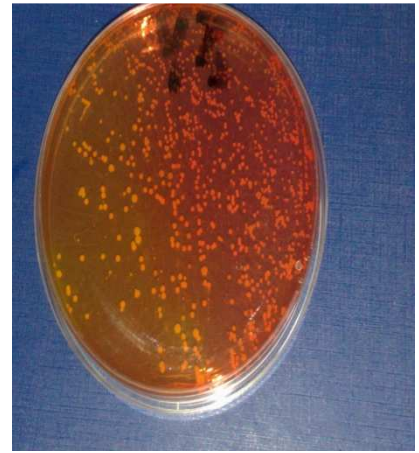
**Figure 02 : STAPHYLOCOQUES SUR MILIEU DE CHAPMAN**



**VACHE 01**



**VACHE 02**



**VACHE 03**



**VACHE 04**



**VACHE 05**



**VACHE 06**



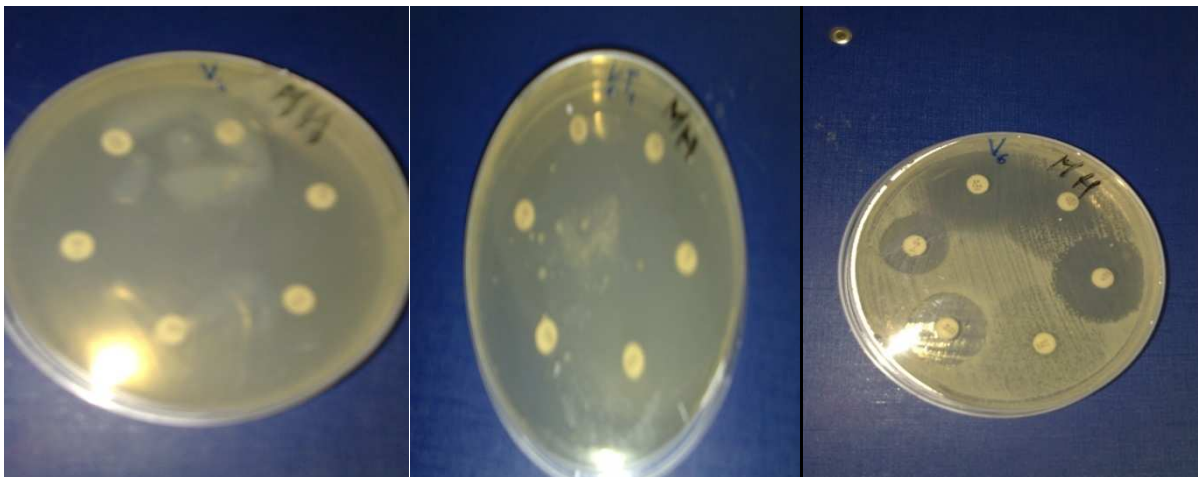
FIGURE 03 : RESULTAT DE L'ANTIBIOGRAMME :



VACH 01

VACH 02

VACH 03



VACH 04

VACH 05

VACH 06



**TABLEAU N : 2 DIAMETRE CRITIQUE EN mm ET LA CHARGE DES DISQUES :**

Les antibiotiques a testes	Charge de disque	Diamètre critique mm	
		Sensibilité	résistance
ERYTHROMYCINE	15 UI	≥22	<17
OXACILLINE	30 UI	≥20	<20
STREPTOMYCINE	10 UI	≥19	<17
OXYTETRACYCLINE	30 UI	≥17	<17
VANCOMYCINE	30 UI	≥15	<15
BACITRACINE	30 UI	≥29	<29
PENECILLINE G	6 Ug ou 10 UI	≥17	<12
SULPHONAMIDE	200 Ug	≥25	<22
CIPROFLOXACINE	30 UI	≥15	<13

**TABLEAU N : 3 : SENSIBILITE ET LA RESISTANCE DE S-AUREUS DE CHAQUE PRELEVEMENT :**

PRELEVEMENT	Vache1	Vache2	Vache3	Vache4	Vache 5	Vache 6
ERYTHROMYCINE	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>R</b>
SULPHONAMIDE	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
STREPTOMYCINE	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
PENECILLINE G	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>S</b>
OXYTETRACYCLINE	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>S</b>
VANCOMYCINE	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>R</b>
OXACILLINE	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>
BACITRACINE	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>R</b>
CIPROFLOXACINE	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>R</b>

**TABLEAU N : 4 POURCENTAGE DE SENSIBILITE ET RESISTANCE :**

Antibiotique	S	R	Antibiotique	S	R
ERYTHROMYCINE	2/6	4/6	VANCOMYCINE	3/6	3/6
	20%	80%		50%	50%
SULPHONAMIDE	4/6	4/6	OXACILLINE	1/6	5/6
	80%	20%		16,7%	83,3%
STREPTOMYCINE	3/6	3/6	BACITRACINE	4/6	2/6
	50%	50%		80%	20%
PENICILLINE	2/6	4/6	CIPROFLOXACINE	5/6	1/6
	20%	80%		83,3%	16,7%
OXYTETRACYCLINE	1/6	5/6			
	16,7%	83,3%			

### IV. DUSCUSSION :

A partir de notre travail la souche S-aureus est sensible à BACITRACINE(B), CIPROFLOXACINE(CIP), SULPHONAMIDE(SP).

Résistance : ERYTHROMYCINE et PENICILLINE G et OXYTETRACYCLINE et OXACILLINE.

En distingue une sensibilité variée pour : VANCOMYCINE, STREPTOMYCINE

Après la comparaison avec les études de : docteur BOUSQUET MELOU en 1998, professeur CLAIRE DAUREL en 2008 et docteur MONTASTRUS 2002 ; qu'ils ont arrivé à la sensibilité de S-aureus au ERYTHROMYCINE, STREPTOMYCINE, OXYTETRAMYCINE, VANCOMYCINE, SULPHANAMIDE et CIPROFLOXACINE.

La résistance au : OXACILLINE et une résistance intermédiaire au PENICILLINE G.

Mais suivant notre étude, on distingue que : S-aureus à développer une résistance contre : ERYTHROMYCINE, OXYTETRACYCLINE et PENICILLINE G.

Concernant le VANCAMYCINE et STREPTOMYCINE elle à une résistance par le temps.

Pour l'OXACILLINE elle a une résistance stable.

### VI. RECOMMANDATION :

Lors d'antibiothérapie contre n'importe quelles infections bactériennes, il faut réaliser un antibiogramme dans des conditions standard qui respectent tous les paramètres de stérilisations afin d'avoir un antibiotique de choix (antibiotique qui a une efficacité très élevée sur tous les mécanismes de la bactérie en cause)

Afin d'éviter développement d'antibiorésistance nous devons au moins tous les 3 ans de changer antibiotique « choisir les antibiotiques a source naturel »

### CONCLUSION :

L'antibiorésistance de la bactérie est influencée par des facteurs antigéniques de la bactérie elle-même ou en fonction des doses de l'antibiotique utilisé et de la fréquence d'utilisation.

Les mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques sont nombreux et variés. Les tests de sensibilité permettant d'évaluer *in vitro* l'efficacité de ces molécules sont le plus souvent l'antibiogramme qui donne un résultat sous forme qualitative en classant la bactérie connue comme sensible, résistante, ou de sensibilité intermédiaire pour chaque antibiotique testé.

Les données de notre partie expérimentale montrent une évolution significative dans le temps du pourcentage de souches sensibles à des antibiotiques très utilisés tels que le SULPHONAMIDE, la CIPROFLOXACINE et la BACITRACINE.



## **LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :**

- **BAURIAND RETAL, 1979**                    **LA RESISTANCE DES BACTERIES AUX ANTIBIOTIQUES**
- **BIOMERIEUX, 2002**                    **L'ANTIBIOTHERAPIE VETERINAIRE ET PROBLEME  
DE SANTE PUBLIQUE**
- **BOISSOMAT.B, 1984**                **TECHNIQUES D'ANTIBIOGRAMME DES STAPHYLOCOQUES**
- **FERSAY.A, 1984**                    **RELATIONS HOTE –BACTERIE**
- **JEAN ASSELINEAU et JEAN PIERRE ZALTA, 1996**  
**LES ANTIBIOTIQUES STRUCTURES ET EXEMPLES DE MODE D'ACTION**
- **MARC VICTOR, 1999**                **MICROBIOLOGIQUE ET PATHOLOGIE INFECTIEUSE**
- **MONTASTRUS, 2002**                **L'ANTIBIOGRAMME DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS**
- **RAYMOND S. AOY, 1979**            **TRAVEAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE**
- **RJ-OLDS, 1979**                    **ATLAS EN COULEUR DE MICROBIOLOGIE**
- **ROLAND LECLECQ, 2008**            **INFECTIONS A PNEUMOCOQUE ET A S- AUREUS**
- **VER WAERDE, 1996**                **ANTIBIORESISTANCE DES SOUCHES BACTERIENNES  
D'ORIGINE EQUINE**

