

[MCours.com](https://www.MCours.com)

## MATÉRIEL ET MÉTHODES :

Cette étude a été réalisée dans l'objectif de comparer les bactéries isolées en portage chez les nouveau-nés avec celles isolées à partir de leurs environnements, ainsi que leurs déterminants phénotypiques et génotypiques de la résistance aux antibiotiques. Ceci dans le but d'établir une éventuelle transmission croisée entre le nouveau-né et son environnement proche.

### I. Lieu et période de l'étude :

Il s'agit d'une étude prospective réalisée dans le service de néonatalogie au CHU Hassan II Fès. Ce service est divisé en 2 ailes : un réservé aux prématurés et l'autre de la réanimation néonatale dont chacun possède 9 couveuses. Les analyses microbiologiques et moléculaires ont été réalisées au laboratoire de microbiologie et de biologie moléculaire de la faculté de médecine et de pharmacie de Fès, durant une période allant de 1 Mars au 7 Juin 2015.

### II. Prélèvements :

Au 1<sup>er</sup> jour de son hospitalisation, chaque nouveau-né faisait l'objet d'un prélèvement par écouvillonnage au niveau des fosses nasales et de la muqueuse rectale, ainsi qu'au niveau de son environnement immédiat. Les mêmes types de prélèvements étaient réalisés à la sortie du nouveau-né en question.

Les prélèvements de surface ont concerné 8 points de l'environnement proche du nouveau-né notamment au niveau de différents points de la surface de la **couveuse**: hublot pivotant de la couveuse (17), la surface qui se trouve en dessous du matelas de la couveuse (15) et la surface de l'écran afficheur (11), la table à tiroir (2), le plateau à matériel (2), la surface du scope (18), le poignet de porte de la salle (4), surface de la couveuse (26).



Dessous du  
matelas

Surface de la  
couveuse

Hublot  
pivotant

Ecran afficheur

### III. Technique par écouvillonnage

#### ✚ Prélèvements de surfaces

La surface a été frottée à l'aide d'un écouvillon humidifié avec de l'eau physiologique stérile, sur des zones définies en stries parallèles rapprochées en le faisant tourner légèrement, puis sur les mêmes zones en stries perpendiculaires aux premières (Norme ISO/DIS 14698-1), puis nous avons remis les écouvillons dans leur étuis protecteurs et nous les avons transmis au laboratoire dans une glacière maintenue entre 2 et 5°C. Les écouvillons ont été transférés en milieu d'enrichissement BHI concentré pour réaliser les analyses microbiologiques.

#### ✚ Ecouvillonnage du nouveau né

**Écouvillonnage nasal:** On introduit l'écouvillon dans chaque narine le plus profond possible suivie de rotations sur les parois nasales.

**Écouvillonnage rectal:** L'écouvillon est introduit dans le sphincter anal, on le fait tourner, on le retire puis on vérifie la présence de traces de matières fécales (Figure 4).

Chaque écouvillon est placé dans son étui, rebouché et identifié clairement. Les renseignements suivants sont notés: identification du NN, date, heure, site de prélèvement.



**Figure 4:** Photo illustrant la méthode d'écouvillonnage

### IV. Ensemencement sur des milieux spécifiques

Les écouvillons ont été ensemencés par épuisement sur des milieux de culture spécifiques des bactéries

- Pour la recherche des entérobactéries fermentaires et non fermentaires, l'ensemencement a été fait sur des boîtes contenant le milieu EMB (Eosine Methyl Blue), incubées à 37 °C pendant 24 H. Toutes les types et formes de colonies ont été retenues pour identification.
- Pour la recherche des Staphylocoques, nous avons utilisé le milieu Chapman, l'incubation a été faite à 37 °C pendant 48 heures. En raison de la présence d'une forte concentration en NaCl, Ce milieu permet la sélection des Staphylocoques tolérant des fortes concentrations en NaCl.

- Pour la recherche du *Pseudomonas*, nous avons utilisé un milieu sélectif de *Pseudomonas*, et l'incubation a été faite à 37 °C pendant 24 H.

#### **V. Conservation des souches isolées**

Nous avons ensemencé la culture isolée, dans un tube contenant de la gélose inclinée pour qu'elle soit conservée afin de réaliser par la suite des tests d'identification.

#### **VI. Tests d'identification biochimique**

##### **A. Coloration de Gram**

Un étalement aussi mince que possible a été effectué à l'aide d'une anse sur une lame contenant une goutte d'eau, après le séchage de la lame, nous avons déposé quelques gouttes du cristal violet en le laissant agir 30 s à 1 min, puis la lame a été recouverte avec du lugol (1min). En effectuant un rinçage de la lame après chaque étape. Ensuite une élimination du cristal violet a été réalisée à l'aide de l'alcool-acétone (5 à 10 secondes). Après, la lame a été rincée avec de l'eau, puis recouverte de la solution de fuchsine, pendant 30 secondes.

##### **B. Milieu Hajna Kligler**

Ce milieu a été utilisé pour l'identification des bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, en permettant de révéler la présence de 4 caractères chez la bactérie étudiée : l'utilisation du glucose et du lactose (fermentation du glucose, l'oxydation du lactose), la production de H<sub>2</sub>S et la production de gaz. La lecture des résultats se fait après 24h

- L'utilisation du glucose : le culot vire au jaune :
- L'utilisation de lactose : la pente devient jaune :
- Production de gaz : quelques bulles, ou une poche gazeuse qui décolle complètement le milieu gélosé du tube.
- La production de H<sub>2</sub>S : précipité noir qui se développe de long de la piqûre.

##### **C. Milieu Citrate de Simmons (CS)**

###### **• Principe**

Ce milieu permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate par les bactéries comme source de carbone et d'énergie, dans ce cas le milieu va virer au bleu, et le BBT permet de mettre en évidence une alcalinisation en cas d'utilisation du citrate. Les bactéries utilisant le citrate comme source de carbone bleussent normalement le milieu.

##### **D. Test oxydase**

###### **• Principe**

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase, Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diméthyl paraphénylène diamine.

- **Technique**

Avec une pipette pasteur nous avons étalé une colonie de germes à étudier sur un papier pré-imprégné par le N - diméthyl paraphénylène diamine.

- **Résultat**

- ✓ Si la colonie prend une coloration violette. Le germe possède une oxydase : le test est dit positif.
- ✓ Si la colonie reste incolore, le germe ne possède pas d'oxydase, le test est dit négatif.

### **E. Milieu urée – indole**

- **Principe**

Le milieu urée-indole ou urée-tryptophane est un milieu synthétique complexe fournissant un ensemble de résultats utiles à l'identification des entérobactéries et autre bactéries.

Il permet la recherche de l'activité de l'uréase et la production d'indole à partir du tryptophane grâce à une tryptophanase.

- **Technique**

Dans un tube à hémolyse, nous avons rempli 500 µl du milieu urée indole, dans lequel nous avonsensemencé richement une suspension de culture, et l'incubation a été faite pendant 24 heures à 37 °C.

- **Résultat**

- ❖ L'addition de réactif de Kovacs se manifeste par l'apparition d'un anneau rouge qui remonte à la surface, dû à la réaction entre le noyau indole et une des substances du réactif.
- ❖ Les bactéries qui possèdent une uréase active vont transformer urée et H<sub>2</sub>O en CO<sub>2</sub> et le NH<sub>3</sub>, ces derniers vont ensuite se combiner pour donner du carbonate d'ammonium donc une alcalinisation du milieu.

Milieu devient rose : Bactérie uréase +.

Milieu persiste orange : Bactérie uréase –.

Formation d'un anneau rouge après l'ajout du réactif de Kovacs : indole +.

Absence de coloration rouge : indole –.

### **F. Milieu MRVP**

- **Principe**

Ce test permet de mettre en évidence les voies fermentaires des entérobactéries :

Voie du butan-2,3-diol (VP).

Voie des acides mixtes (RM).

- **Test de RM**

Les bactéries fermentent le glucose par la voie des acides mixtes (acide formique, lactique, pyruvique ....) Ce qui libère une grande quantité d'acide organique dans le milieu et donc il y aura un abaissement du pH.

L'indicateur de pH utilisé est le Rouge de Méthyle (RM) qui est rouge à un pH inférieur à 5 et jaune à un pH supérieur à 5,8.

- **Test VP**

Ce test permet la mise en évidence de la production d'acétoïne (ou 3-hydroxy-butanone) au cours de la fermentation butylène glycolique: en présence d'une base forte (soude ou potasse) et d'a-naphtol, l'acétoïne donne une coloration rouge en milieu très oxygéné.

- **Technique**

Dans un tube à hémolyse, nous avons rempli 1 ml du milieu MRVP, dans lequel nous avonsensemencé richement une suspension de culture à l'aide d'une anse stérile. Après une incubation pendant 24 heures à 37 °C l'ajout du rouge de méthyle au tube a été effectué.

- **Résultat**

Milieu acide (pH < 5) = RM (rouge) = bactérie fermente le glucose par voie des acides mixtes (Suite à une acidification importante du milieu).

Milieu acide (pH > 5) = RM (jaune) = bactérie ne fermente pas le glucose par voie des acides mixtes.

### **G. Galerie Api 20 E**

L'identification d'une bactérie avec le système Api 20 E consiste à réaliser 20 tests avec la galerie Api 20 E, puis à interpréter les résultats obtenus à l'aide de la base de données Api 20<sup>E</sup>.

- **Inoculum de la galerie**

Nous avons introduit la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette avec :

- Remplissage des tubes et cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette pasteur.
- Remplissage uniquement les tubes et non les cupules des autres tests.
- Création d'une anaérobiose dans les tests ; ADH, LDC, ODC, URE, H<sub>2</sub>S en remplissant leurs cupules d'huile d'immersion
- Couverture de la boîte et la placer à l'étuve à 35-37 °C pendant 18 à 24 heures.

- **Lecture de la galerie**

Après 18-24 heures à 35-37° C, la lecture de la galerie a été réalisée en se référant au tableau de lecture, nous avons noté les résultats des tests complémentaires, en ajoutant des réactifs qui sont nécessaires pour la révélation de certains tests.

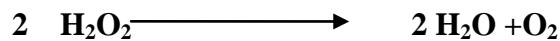
➤ **Tests d'identification des *Staphylocoques***

**A. Test catalase**

Sur une lame propre et sèche nous avons déposé une goutte d'eau oxygénée sur laquelle nous avons ensemencé l'inoculum bactérien à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée.

**a. Principe**

Cette enzyme est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire (AS et AAF) qui peuvent détruire les peroxydes. La catalase est une enzyme qui catalyse :



**b. Lecture**

- apparition de bulles, dégagement gazeux : catalase +.
- pas de bulles : catalase –.

**B. Test coagulase**

La recherche de la Staphylocoagulase constitue un critère absolu d'identification de *Staphylococcus aureus* car elle joue un rôle central dans le pouvoir pathogène des Staphylocoques.

**a. Méthode**

Le test de détection consiste à incuber, pendant 4 h puis 24 h, à 37 °C, un mélange de 0,5 ml de plasma de lapin et de 0,5 ml de la souche à tester. L'apparition d'un caillot est observée en inclinant le tube à 90 °C.

Lorsque la bactérie possède une coagulase, le plasma de lapin reste en masse au fond du tube.

➤ **Tests d'identification des *Pseudomonas***

Pour confirmer que les souches qui ont été poussées sur milieu sélectif de *Pseudomonas* avec une coloration verdâtre sont bien des souches de *Pseudomonas* nous avons effectué un test oxydase et nous avons ensemencé la souche sur milieu Hajna Kligler.

**a. Résultat**

Glucose -, lactose-, oxydase + = *Pseudomonas aeruginosa*

## **VII. Antibiogramme**

Méthodes de diffusion : antibiogramme standard en milieu gélosé : selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie (Recommandations 2013).

### **a. Milieu de culture**

Pour réaliser la méthode d'antibiogramme nous avons utilisé un milieu non sélectif (le milieu MH). Dont l'épaisseur de la gélose doit être strictement de 4 mm répartie uniformément et les boîtes doivent être séchées 30 minutes avant leur emploi.

### **b. Réalisation de l'inoculum bactérien**

Pour préparer l'inoculum bactérien nous avons travaillé au départ avec une souche pure. A partir d'une colonie bien isolée au niveau de la gélose nutritive qui représente une culture jeune nous avons réalisé une suspension turbide en bouillon échelle 0,5 de Mac Farland en effectuant par la suite une dilution de 1/10 de la culture ainsi préparée.

### **c. Ensemencement par écouvillonnage**

Nous avons effectué un ensemencement en stries sur toute la surface du milieu à 3 reprises selon 3 angles (60 °). Avant de réaliser un écouvillonnage partout autour du bord de la surface de la gélose.

### **d. Application des disques**

Les disques choisis ont été posés à l'aide d'une pince flambée, tout en appuyant légèrement sur les disques pour qu'ils soient bien coller sur la surface de la gélose, une distance minimale de 15 mm doit séparer un disque périphérique du bord de la boîte et deux disques doivent être éloignés au maximum de 30 mm de sorte que les zones d'inhibition ne se chevauchent pas.

### **e. Incubation**

Les boîtes ont été ensuite portées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures, après incubation chaque disque sera entouré d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne.

### **f. Choix des antibiotiques**

Les antibiotiques testés lors de la réalisation de l'antibiogramme pour les entérobactéries ainsi que leur concentration :

- ✓ Deux aminopénicillines : l'Amoxicilline (AML). (30 µg) et Amoxicilline / Acide clavulanique (AMC) (10µg).
- ✓ Une céphalosporine de première génération : la Céfalotine (KF) (30 µg).

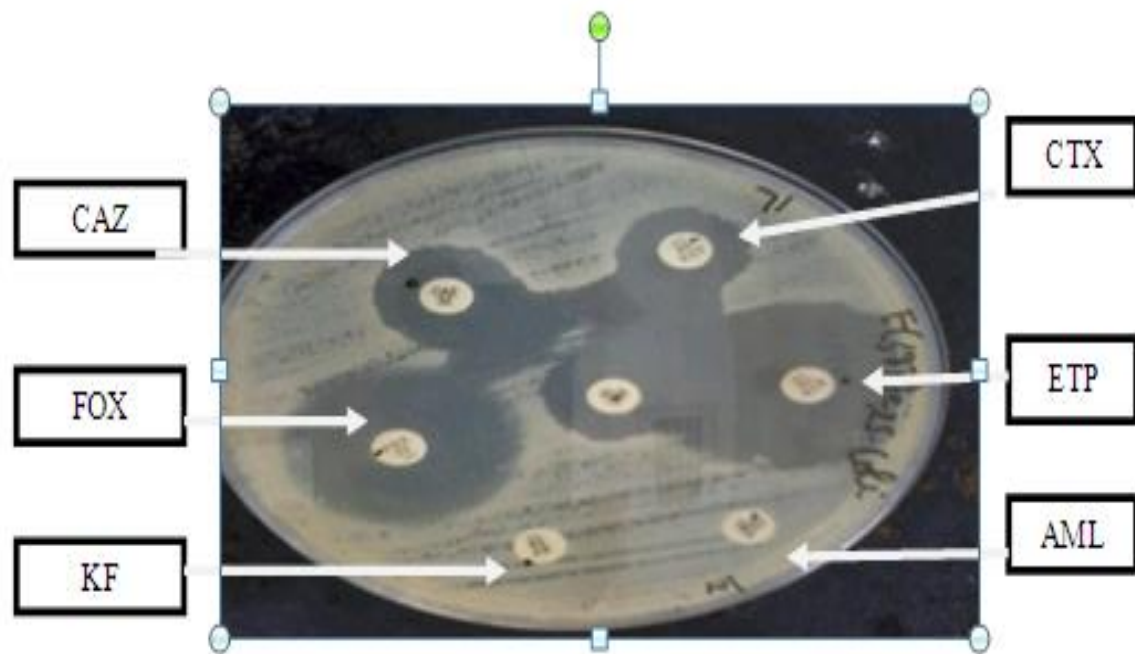


- ✓ Une céphalosporine de deuxième génération : la Céfoxitine (FOX) (30 µg).
- ✓ Deux céphalosporines de troisième génération : le Céfotaxime (CTX) (30 µg) et la Céfotazidime (CAZ) (30 µg).
- ✓ Deux aminosides : la gentamicine (CN) (10 µg) et l'Amikacine (AK) (30 µg).
- ✓ Trois quinolones : l'acide nalidixique (NA) (30 µg) et la ofloxacine (OFX) (5 µg). ciprofloxacine (CIP) (5 µg).
- ✓ Un sulfamides : Sulfaméthoxazole (SXT) (1,25-23,75 µg).
- ✓ Une carbapénème : Ertapénème (ETP) (10 µg).

### VIII. La Recherche de la bêta-lactamase à spectre élargi :

Lors de la réalisation d'un antibiogramme standard, après ensemencement, et au moment de l'application des disques sur la gélose, nous avons placé le disque porteur l'amoxicilline / acide clavulanique (AMC) en face d'un à deux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération : Céfotaxime (CTX), Céfotazidime (CAZ).

La réalisation du test de synergie et l'obtention d'une image sous forme de « bouchon de champagne » comme visualisé dans la figure 5 ci-dessous, permet de confirmer qu'il y a la présence de BLSE et alors conclure que la souche est productrice de bêta lactamase à spectre élargi.



**Figure 5 :** *E. coli* productrice de bêta-lactamase dont AMC présente une synergie avec CAZ, CTX, KF (Test de synergie positif).

Les antibiotiques utilisés lors de la réalisation de l'antibiogramme pour les *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* sont illustrés dans le Tableau 1.

**Tableau 1 :** Antibiotiques testés pour l'antibiogramme des *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*

Les antibiotiques testés pour :	
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
✓ Pénicilline G (P).	✓ Tobramycine (TOB) (10 µg).
✓ Vancomycine (VA).	✓ Céftazidime (CAZ) (10 µg).
✓ Teicoplanine (Tec).	✓ Ciprofloxacine (CIP) (5 µg).
✓ Gentamycine (CN) (10 µg).	✓ Colistine (CT)
✓ Céfoxitine (FOX) (30 µg).	✓ Imipénème (IPM) (10 µg).
✓ Sulfaméthoxazole (SXT) (1,25-23,75)	✓ Pipéracilline (PRL) (30 µg).
✓ Levofloxacine (Lev).	✓ Ticarcilline (TIC) (75 µg).
✓ Rifampicine (RD) (5µg).	✓ Aztréonam (ATM) (30 µg).
✓ Fosfomycine (FOS).	✓ Céfépime (FEP) (30 µg).
✓ Erythromycine (E).	✓ Pipéracilline + tazobactam (TPZ) (30
✓ Lincomycine (MY).	- 6 µg).
✓ Pristinamycine (PT).	

## IX. Détection des gènes de résistance par PCR (Polymerase Chain Reaction)

### A. Extraction d'ADN total

La méthode que nous avons utilisée pour extraire l'ADN est celle du choc thermique : pour chaque culture jeune, nous avons prélevé deux à cinq colonies dans des tubes eppendorfs contenant 500µl d'eau distillée stérile. Après, homogénéisation par vortex, ce mélange a été mis dans un bain marie à 100 °C pendant 10 minutes, puis dans la glace immédiatement pendant 2 min. nous avons ensuite réalisé une centrifugation pendant 10 minutes à 14000g.

Les surnagants récupérés vont servir comme extraits d'ADN dans les réactions de PCR et leurs conservation a été faite à - 20 °C.

### B. Caractérisation des gènes codant les bêta-lactamases

Nous avons procédé à la recherche des gènes codants les β-lactamases BLSE par PCR: *blaTEM*, *blaSHV*, *blaCTX-M1*, *blaCTX-M2*, *blaCTX-M9* (tableau 2). La polymérisation est réalisé dans un mélange réactionnel contenant de faibles quantités d'ADN possédant la séquence à amplifier (2µl d'ADN), et le mix PCR : 0,5 µl dNTP (dATP, dTTP, dCTP et dGTp ), deux amorces nucléotidiques complémentaires des séquences flanquants la cible à

amplifier (1 µl pour chaque amorce) (Tableau 2), 0,2 µl de la Taq polymérase, 2,5 µl de la solution de MgCl<sub>2</sub>, 5 µl tampon d'enzyme, 37,8 µl d'eau ultra pure.

Le mélange réactionnel utilisé pour cette amplification contient, pour chacune des réactions, une concentration 1X du tampon, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTP, 400 nM de chaque amorce, 1 unités (U) de la Taq polymérase (Invitrogen® Taq DNA Polymerase) et 5µL d'ADN extrait. Le volume final est ajusté à 50 µL par ajout de l'eau distillée stérile.

**Tableau 2 :** Séquences des amorces utilisés lors de la réalisation de la PCR (Gangoue., 2007)

Gène	Amorces	Séquence d'amorce (5'- 3')	Taille de la séquence amplifiée (pb)
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	OS-5	CGCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC	795 pb
	OS-6	TCTTTCCGATGCCGCCGCCAGT CA	
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	A-216	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	1079 pb
	A-217	GACAGTTACCAATGCTTAATCA	
<i>bla<sub>CTXM- Groupe1</sub></i>	CTXM1(+)	GGTAAAAAATCACTGCGTC	863 pb
	CTXM1(-)	TTGGTGACGATTTTAGCCGC	
<i>bla<sub>CTXM- Groupe2</sub></i>	CTXM2(+)	ATGATGACTCAGAGCATTCG	865 pb
	CTXM2(-)	TGGGTACGATTTTCGCCGC	
<i>bla<sub>CTXM- Groupe9</sub></i>	CTXM9(+)	ATGGTGACAAAGAGAGTGCA	869 pb
	CTXM9(-)	CCCTTCGGCGATGATTCTC	

L'ADN a été amplifié pour un volume final de 50 µl, dans un thermocycleur (Applied Biosystem) en respectant les conditions d'amplification (Tableau 3).

**Tableau 3 :** Conditions d'amplification pour chaque gène (Gangoue., 2007)

Etapas d'amplification	Condition de température/durée	
	<i>bla<sub>SHV</sub>, CTX-M1, CTX-M2, CTX-M9,</i>	<i>bla<sub>TEM</sub></i>
Dénaturation initiale	94 °C/5 min	94 °C/5 min
Dénaturation cyclique	94 °C/1 min	94 °C/1 min
Hybridation	60 °C/1 min	50 °C/1 min
Elongation cyclique	72 °C/1 min	72 °C/1 min
Elongation finale	72 °C/7 min	72 °C/7 min

Pour chaque PCR, il faut toujours un témoin positif et un témoin négatif (eau distillée). Les souches témoins qui ont été utilisés sont illustrées ci-dessous dans le Tableau 4.

**Tableau 4 : Souches témoins utilisées**

<i>Bactérie</i>	<i>Numéro</i>	<i>Caractéristiques</i>
<i>Salmonella sp</i>	U2A1446	SHV/TEM
<i>E. coli</i>	U2A1790	CTX-M-groupe 1
<i>Salmonella sp</i>	U2A2145	CTX-M-groupe 2
<i>E. coli</i>	U2A1796	CTX-M-groupe 9

### **C. Préparation du gel**

Nous avons préparé 1g de poudre d'agarose pour 100 ml de TBE 0.5X, L'agarose a été ensuite solubilisé dans un four à micro-ondes. Une fois un peu refroidi, nous avons ajouté 1,5 µl de Bromure d'éthidium pour 100 ml de TBE, nous avons versé l'agarose dans un moule pourvu d'un peigne creusant des puits, permettant de déposer les échantillons. Lorsque le gel se solidifie, nous avons retiré le peigne et les rubans adhésifs qui fermaient les extrémités du moule. Ensuite, l'ensemble du gel et moule est placé dans la cuve d'électrophorèse, puis la cuve à électrophorèse est alors rempli avec le tampon TBE à 0.5X jusqu'à ce que le gel soit complètement immergé.

### **D. Electrophorèse**

Dans les puits du gel, nous avons déposé 12 µl d'un mélange contenant 10 µl de la solution, d'ADN et 2 µl de bleu de bromothymol.

### **E. Révélation**

Après la migration, le gel a été immergé dans une solution de TBE. La lecture s'est faite sous UV.

## X. Statistique khi deux :

La statistique du Khi-deux  $\chi^2$  consiste à mesurer l'écart qui existe entre la distribution des effectifs théoriques  $a_i$  et la distribution des effectifs observés  $o_i$  et à tester si cet écart est suffisamment faible pour être imputable aux fluctuations d'échantillonnage. Pour cela nous sommes intéressé à calculer le test ki deux pour chaque souche bactérienne isolée à l'entrée et à la sortie des patients afin de savoir est ce que la différence est significative ou non sachant que  $\alpha = 0,05$ . Selon la formule suivante :

$$\sum_{i=1}^m \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$



MCours.com