

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
**Université A. MIRA - Béjaïa**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Microbiologie**  
**Spécialité : Microbiologie Fondamentale**



**Réf :.....**

Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

**MASTER**

***Thème***

**Etude des bacilles à Gram négatif résistants  
aux  $\beta$ -lactamines et des entérocoques  
résistants à la vancomycine isolés chez les  
insectes dans les hôpitaux**

Présenté par :

**MEDDAS Narimane**

Soutenu le : **25 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

Mme Tafoukt Rima	MAA	Présidente
Mme Gharout-Sait Alima	MCB	Encadreur
Mme Zenati Karima	MAA	Examinatrice

**Année universitaire : 2017 / 2018**

## **Remerciements**

*«Louange à Allah, le tout puissant et miséricordieux qui m'a prodigué le courage et la force afin de mener à terme ce travail»*

### **Je remercie :**

*Ma chère promotrice Mme GHAROUT Alima pour son suivi, ses conseils, sa confiance, sa disponibilité et surtout sa patience et sa compréhension. Je vous souhaite tout le bonheur du monde.*

*Je remercie les membres de jury Mme TAFOUKT R. et Mme ZENATI K. pour avoir accepté de juger ce travail*

*Je remercie aussi Mme RAHMANI D. et Mr DJOUDI F. pour leurs conseils et pour le matériel mis à notre disposition.*

*Je remercie l'ensemble de l'équipe du laboratoire de microbiologie et le laboratoire d'écologie microbienne.*

*Je remercie également Mme KHERBACHI et Mr BOUKHALFA pour leurs aimables gentillesse et pour tous leurs services.*

*Enfin, je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mes très chers parents sans qui je ne serais pas là où je suis aujourd'hui. Merci d'être toujours à mes côtés et de m'avoir tant soutenu et guidé.*

*A mon adorable frère Hamza qui est toujours là pour moi.*

*A toutes mes tantes et tous mes oncles qui sont toujours présents pour moi.*

*A mes cousins et cousines en particuliers : Ilhem, Amel, Sihem et Mounira.*

*A tous mes amis en particuliers : Dalila et Menad merci pour votre aide incontestable.*

*A ma deuxième famille : tous les membres de l'association AHBAB CHEIKH SADEK EL BEJAOUI en particuliers toutes mes sœurs de l'orchestre féminin, merci d'être à mes côtés dans les meilleurs comme dans les pires moments de ma vie.*

**Liste des tableaux**

**Liste des figures**

**Liste des abréviations**

**Tables des matières**

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>9</b>
<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>15</b>
<b>I. Echantillonnage.....</b>	<b>16</b>
<b>II. Pré-enrichissement.....</b>	<b>17</b>
<b>III. Recherche de Bacilles à Gram négatif.....</b>	<b>17</b>
III.1 Recherche de Bacilles à Gram négatif résistants aux céphalosporines de troisième génération .....	17
III.2 Recherche de Bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes .....	17
III.3 Identification.....	17
III.4 Etude de la sensibilité des souches .....	21
III.4.1 Recherche de la production d'une bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) .....	21
III.4.2 Recherche de la production d'une carbapénémase .....	22
<b>IV. Recherche d'entérocoques résistants à la vancomycine .....</b>	<b>23</b>
IV.1 Isolement .....	23
IV.2 Etude de la sensibilité des entérocoques à la vancomycine .....	23
IV.3 Caractérisation phénotypique .....	24
<b>RESULTATS .....</b>	<b>25</b>
<b>I. Souches bactériennes .....</b>	<b>26</b>
II. Bacilles à Gram négatif.....	26
II.1 Recherche de la production de $\beta$ -lactamases à Spectre Etendu .....	26
II.2 Recherche de la production de carbapénémases .....	28
III. Les entérocoques .....	30
<b>DISCUSSION ET CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>34</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>38</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>43</b>

## **LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau I :</b> Mini galerie biochimique .....	16
<b>Tableau II :</b> Aspect des colonies sur milieu Chromagar.....	19
<b>Tableau III :</b> Souches présentant une BLSE .....	25
<b>Tableau VI :</b> Résultats du DD-test sans et avec cloxacilline.....	28
<b>Tableau V :</b> Souches positives au test MCIM .....	31
<b>Tableau VI :</b> Résultats de l'antibiogramme pour les souches positives au test MCIM.....	32
<b>Tableau VII :</b> Caractérisation phénotypique des entérocoques isolés .....	34.

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> :Schéma représentant le DD-test .....	20
<b>Figure 2</b> : Test MCIM .....	21
<b>Figure 3</b> :Image de synergie pour la souche <i>E. coli</i> 139 I .....	25
<b>Figure 4</b> : DD-test sans cloxacilline (A) et avec cloxacilline (B) pour la souche <i>E. coli</i> 130E.....	28
<b>Figure 5</b> : Exemple de souche positive au test CIM .....	30
<b>Figure 6</b> : Aspect des entérocoques sur BEA .....	33
<b>Figure 7</b> : Aspect microscopique des entérocoques .....	33
<b>Figure 8</b> : Croissance et réduction de tellurite de potassium pour <i>E. faecalis</i> .....	33
<b>Figure 9</b> :Croissance sur bouillon hypersalé.....	33

## Liste des abréviations

**AMC** : Amoxicilline / Acide clavulanique.

**ATM**: Aztréonam.

**BGN** : Bacilles à Gram Négatif.

**BGNF** : Bacilles à Gram Négatifs non fermentaire.

**BLSE** :  $\beta$ -Lactamase à Spectre Elargi (ou Etendu).

**BHIB** : Brain Heart Infusion Broth.

**CAZ** : Ceftazidime.

**CTX-M** : Céfotaximase-Munich

**CTX** : Céfotaxime.

**C3G** : Céphalosporine de troisième génération.

**DD-Test**: Double-Disc Test.

**EMB**: gélose Eosin Methylene Blue.

**ERV** : Entérocoques résistants à la vancomycine

**EUCAST**: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.

**FEP**: Céfépime.

**FOX**: Céfoxitine.

**GES** : Guyane Extended spectre

**I** : Intermédiaire

**IPM** : Imipénème.

**KPC** : *Klebsiellapneumoniae* Carbapenemase

**MRP**: Méropénème.

**MCIM** : Modified Carbapenem Inactivation Method

**MH**: Mueller Hinton.

**MBL** : Métallo- $\beta$ -lactamase

**NR** : Nitrate Réductase.

**NDM**: New Delhi métallo- $\beta$ -lactamase.

**NMC -A** : No Metallo Carbapenemase A.

**OXA-48** : Oxacillinase.

**R** : Résistant.

**RM** : Rouge de Méthyle.

**S**: Sensible.

**SHV**: Sulfhydryl Variable

**SFC** : *SerratiaFonticola* Carbapenemase.

**TEM**: Témocilline.

Liste des abréviations

**TSI:** Three Sugar and Iron.

**VIM:** VeranaIntegron\_encodedMetallo  $\beta$ -lactamase.



# *Introduction*

## Introduction

La découverte des antibiotiques dans la première moitié du siècle dernier a révolutionné la médecine notamment par le traitement des maladies infectieuses d'origine bactérienne, et leur utilisation a réduit la morbidité et la mortalité chez les humains. Les antibiotiques sont des substances chimiques ou hémi-synthétiques élaborées par des micro-organismes. Le premier composé antibiotique découvert était la pénicilline par Flemming en 1929, un antibiotique  $\beta$ -lactame (Van Hoek et al., 2011).

Le problème de la résistance aux antibiotiques a commencé à se poser presque en même temps que l'introduction de ces molécules en thérapeutique. Dès les années 1950, les premières mises en garde contre ce risque ont été lancées dans les publications scientifiques. Il existait des mécanismes naturels de résistance préexistant à cette introduction, mais des nouvelles résistances sont apparues, notamment vis-à-vis d'antibiotiques entièrement synthétiques tels que les fluoroquinolones (Monnet, 2000).

Les  $\beta$ -lactamines sont une large classe d'antibiotiques qui contiennent un noyau bêta-lactame dans leur structure moléculaire. Elles incluent les dérivés des pénicilline, les céphalosporines, les monobactames, les carbapénèmes et les inhibiteurs de la bêta-lactamase (Nordmann, 2010).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines peut être non enzymatique, c'est-à-dire par imperméabilité de la paroi par modification des porines (Nordmann, 2010). Mais cette résistance reste peu fréquente surtout chez les bacilles à Gram négatif.

Les enzymes, dénommées  $\beta$ -lactamases à spectre élargi ou étendu (BLSE) ont été initialement découvertes chez les entérobactéries en Europe (Allemagne, France) avec l'émergence de la résistance aux C3G dans les années 1985. La détermination génétique était simple puisqu'il s'agissait d'une ou plusieurs mutations ponctuelles responsables de la substitution d'acides aminés proches du site enzymatique entraînant une meilleure affinité pour les  $\beta$ -lactamines dont les céphalosporines de troisième génération ou encore l'acide clavulanique permettant de proposer un test de détection simple (synergie entre une C3G et l'acide clavulanique) en routine de laboratoire. Selon la substitution. Ces enzymes dérivées de pénicillinases TEM-1 et SHV-1, sensibles à l'acide clavulanique sont de distribution mondiale (Philippon and Arlet, 2006). Les dernières identifiées à la date de consultation sont SHV-193 et TEM-223 (consultée le 12/06/2018 la base de données : <http://www.lahey.org/studies/>). Les BLSE de type CTX-M retrouvées dans les entérobactéries dérivent des  $\beta$ -lactamases chromosomiques

## Introduction

d'espèces du genre *Kluyverasp*. Avant 2002, les BLSE de types TEM et SHV étaient majoritaires. Elles étaient isolées en milieu hospitalier, essentiellement chez *K. pneumoniae*. De nos jours CTX-M est la BLSE la plus souvent isolée dans le monde, notamment CTX-M-15 et CTX-M-14. Alors que TEM et SHV restaient essentiellement cantonnées à l'hôpital, CTX-M diffusait beaucoup plus largement dans la communauté. En 2018, à la date de consultation du site : <http://www.lahey.org/studies/> (le 12/06/2018) on compte 173 variants alléliques de CTX-M. Par ailleurs, des clones d'*E. coli* producteurs de CTX-M-15 comme le sérotype O25b:H4, appartenant à la séquence type 131 et responsables d'infections graves, ont désormais une diffusion mondiale (Vodovar et al., 2013). La diffusion des entérobactéries productrices de BLSE a également été plus fréquemment observée en milieu communautaire (J.-R. Zahar et al. 2009).

Les enzymes de type AmpC sont des céphalosporinases de classe C et sont inhibées par la cloxacilline. Leur spectre d'activité inclut les pénicillines, les céphalosporines de première, deuxième et troisième génération et les monobactames. Elles peuvent être chromosomiques mais également plasmidiques telles que CMY et DHA (Bush and Jacoby 2010).

Suite à l'utilisation des carbapénèmes à cause de l'émergence des BLSE il y'a eu apparition de résistance à ces dernières. Les carbapénèmes demeurent les  $\beta$ -lactamines dont le spectre d'activité est le plus large. Elles sont utilisées pour traiter de nombreuses infections nosocomiales, en particulier celles liées aux espèces de bacilles à Gram négatif les plus fréquentes ; les Entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* (J. R. Zahar, Grall, and Kouatchet 2010). La résistance aux carbapénèmes est causée par deux mécanismes principaux: (1) l'activité  $\beta$ -lactamase combinée à des modifications de la structure de la paroi (2) production de carbapénémases ; enzymes qui hydrolysent les carbapénèmes (Logan and Weinstein 2017). L'émergence de résistances aux carbapénèmes est particulièrement notable chez les espèces de bacilles à Gram négatif telles que *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*. Cette résistance reste beaucoup plus fréquente en milieu hospitalier qu'en milieu communautaire (Nordmann 2010). Les carbapénémases sont classées par leurs structures moléculaires et appartiennent à 3 classes de  $\beta$ -lactamases: classe A, B et D dans le système de classification d'Ambler. Les carbapénémases de classe A et D requièrent une sérine dans leur site actif, alors que la classe B ; les métallo- $\beta$ -lactamases (MBL) nécessitent du zinc pour l'hydrolyse du cycle  $\beta$ -lactame. Les carbapénémases les plus importantes de la classe A comprennent les KPC, GES, NMC-A et SFC, dont les KPC sont les enzymes de classe A les

## Introduction

plus décrites chez les *Enterobacteriaceae* dans le monde (Logan and Weinstein 2017). Les métallo- $\beta$ -lactamases constituent la classe moléculaire B d'Ambler. De nombreuses nouvelles enzymes de cette classe ont été décrites et les séquences des gènes correspondants ont été déterminées. Leur importance clinique est mise en évidence par le fait qu'ils hydrolysent les carbapénèmes. De plus, la plupart des métallo- $\beta$ -lactamases sont des enzymes à large spectre qui hydrolysent également une variété de pénicillines et de céphalosporines excepté l'aztréonam (Galleni et al. 2001). Les enzymes les plus importantes de cette classe sont les VIM, IMP et les NDM, La plupart des MBL sont retrouvés chez *K.pneumoniae* multirésistante isolée chez des patients hospitalisés (Nordmann et al., 2011). Les carbapénémases de classe D sont des enzymes de la plus grande importance clinique. La grande majorité de ces enzymes ont été identifiées chez *Acinetobacter* spp., notamment chez *Acinetobacter baumannii*. Les enzymes OXA-2 et OXA-10 sont à spectre étroit et sont rencontrés principalement chez *Pseudomonas aeruginosa* (Antunes et al. 2014). Des *Enterobacteriaceae* productrices d'OXA-48 ont été impliquées dans des épidémies hospitalières dans de nombreuses régions du monde (Pulss et al. 2018).

Les entérocoques sont des microorganismes à Gram positif, ce sont des colonisateurs naturels des voies gastro-intestinales chez les humains et les animaux. Ces bactéries sont relativement non virulentes et avant 1970 elles étaient les seules rares causes d'infection grave. L'*Enterococcus* résistant à la vancomycine (ERV) a été signalé en 1987 en Europe, où il a établi un réservoir chez les humains en bonne santé et les animaux, mais reste un peu la rare cause d'infections nosocomiales. En revanche, au cours de la précédente décennie aux États-Unis, l'*Enterococcus* est rapidement apparu comme une source d'infection chez les patients hospitalisés et surtout chez les patients admis dans les unités de soins intensifs avec des taux élevés d'utilisation d'antibiotiques (Adams et al. 2016).

Les entérocoques possèdent une résistance naturelle de bas niveau à de nombreux antibiotiques comme les  $\beta$ -lactamines (Prieto et al. 2016), et une résistance acquise aux glycopeptides ou aux aminosides. La plus importante en clinique est la résistance à la vancomycine (ERV), surtout par l'acquisition du gène *vanA* (Werner et al. 2008). Les glycopeptides agissent sur la synthèse de la paroi des bactéries à Gram positif en inhibant la transglycosylation. Il existe neuf phénotypes de résistance aux glycopeptides chez les entérocoques, le phénotype VAN A (résistance très élevée et inductible à la vancomycine et la téicoplanine), le phénotype VAN B (résistance variable et inductible à la vancomycine, sensible à la téicoplanine), le phénotype VAN D (résistance constitutive à des niveaux

## Introduction

modérés pour les deuxglycopeptides),les phénotypes C,E,G,L, et N (résistance de bas niveau à la vancomycine et une sensibilité à la téicoplanine)(Prieto et al. 2016). En Algérie, le premier cas d'*Enterococcusfaecalis*résistant à la vancomycine a été rapporté en 2006 chez un patient de 24 ans souffrant d'une uropathie malformative (Aggoune et al. 2008)

L'environnement hospitalier peut servir de réservoir pour les bactéries résistantes qui posent des risques d'infection hospitalière. L'émergence et la propagation croissantes de bactéries multirésistantes dans les hôpitaux sont très préoccupantes et continuent de remettre en question le contrôle des infections et la pratique épidémiologique hospitalière (Zenati et al. 2016). Des cas de production de BLSE chez les *Enterobacteriaceae* et d'OXA-23 et NDM-1 chez l'*Acinetobacterbaumannii* isolées de l'environnement hospitalier ont été rapportés en Algérie (Touati et al. 2010 ; Zenati et al. 2016).Dans l'environnement hospitalier les insectes sont en contact directe avec les patients, les aliments, les surfaces et le matériel de soin, ils peuvent être considérés comme un réservoir de bactéries multi-résistant.

Les insectes représentent 75% du monde animal. Ce sont des petits animaux invertébrés.La classe des insectes fait partie de l'embranchement des arthropodes, quiprésentent la particularité d'avoir un corps compose de segments articulées et protège parun squelette externe (cuticule), mais les insectes se distinguent par : Un corps compose detrois parties (tête, thorax et abdomen), une paire d'antennes, trois paires de pattes et desailles (le plus souvent)(Laurentiaux 1953).

Depuis quelques années la science s'intéresse de plus en plus a ce petit monde qui pourrait avoir un rôle dans la transmission des bactéries multirésistantes au monde humain. A cet effet, plusieurs études ont été réalisées ou même en cour de réalisation.Les insectes ont ete connus comme des vecteurs mecaniques dans la propagation demaladies infectieuses telles que le cholera, la shigellose, la salmonellose et les infectionsde la peau Plusieurs études ont démontré la prolifération de bactéries et le transfert horizontal de gènes de résistance dans le tube digestif des insectes ainsi que la transmission de bactéries résistantes par des insectes à de nouveaux substrats, il a été démontré que les mouches domestiques et les cafards transportent des souches clonales multirésistantes aux bactéries identiques à celles trouvées dans le fumier animal(Zurek and Ghosh 2014).

Les mouches représentent un vecteur potentiel pour la propagation de la résistance aux antibiotiques car elles se nourrissent et se développent dans les excréments et matières en

## Introduction

décomposition, elles portent des bactéries résistantes aux antibiotiques d'intérêt clinique particulièrement les bactéries entériques, telles que *E. coli* produisant des BLSE et donc elles pourraient probablement transmettre des pathogènes entériques aux humains et aux animaux(Onwugamba et al. 2018).

La résistance aux antibiotiques chez les insectes représente un domaine de recherche important, notamment à cause des nombreux cas rapportés de la dissémination de bactéries multi-résistantes chez des cafards(Loucif et al. 2016), chez les moustiques (Hleba et al. 2017) et chez les mouches (Onwugamba et al. 2018).

L'Algérie est connue comme une zone affectée par la diffusion des BLSE de type CTX-M-15 et de carbapénémases de type OXA-48 chez les entérobactéries, le type OXA-23 et NDM-1 chez *Acinetobacter baumannii* et VIM-4 chez *Pseudomonas spp.* Cependant, les insectes qui colonisent l'environnement hospitalier peuvent héberger et transmettre des bactéries résistantes aux antibiotiques. Une seule étude a été rapportée chez les cafards en Algérie par Loucif et al en 2016.

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude qui a pour objectif de rechercher des bacilles à Gram négatifs producteurs de BLSE et/ou de carbapénémases ainsi que la recherche d'entérocoques résistants à la vancomycine chez des insectes collectés au niveau des hôpitaux de Béjaïa et Alger. A cet effet, nous avons suivi la démarche suivante :

- Isolement et identification des souches résistantes aux céphalosporinases de 3<sup>ème</sup> génération et/ou aux carbapénèmes.
- Etude de leurs sensibilités vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines.
- Détermination de leurs phénotypes de résistance.
- Isolement d'entérocoques résistants à la vancomycine.

# *Matériel et méthodes*

## I. Echantillonnage

La provenance des insectes qui ont été collectés est montrée dans le tableau ci-dessous.

**Tableau** : Provenance des insectes collectés

<b>Services</b>	<b>Hôpital</b>	<b>Lieux</b>
Laboratoire d'analyses médicales	KhelilAmrane	Béjaia
Réanimation	KhelilAmrane	Béjaia
Bloc opératoire	KhelilAmrane	Béjaia
Oncologie	Boukhalfa	Amizour
Réanimation	Boukhalfa	Amizour
Laboratoire de bactériologie	Boukhalfa	Amizour
Cuisine	Boukhalfa	Amizour
Laboratoire d'analyses médicales	Polyclinique Sidi Ahmed	Béjaia
Pavillon Widal	EI KETTAR	ALGER
Laboratoire tuberculeux	EI KETTAR	ALGER
Réanimation	AIT IDIR	ALGER
Neurochirurgie hommes	AIT IDIR	ALGER
Neurochirurgie femmes	AIT IDIR	ALGER
Neurochirurgie enfants	AIT IDIR	ALGER

L'étude a été faite pendant la période allant de Février à Juin 2018 au niveau du laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Béjaia.



## **II. Pré-enrichissement**

Chaque insecte a été placé dans un Eppendorf stérile puis conservé au congélateur. Chaque insecte est introduit dans 2ml de solution Tween 80 (tensio-actif) puis vortexé, ensuite 1ml de cette solution est ensemencé dans 5 ml de BHIB. Cette suspension servira de flore externe. L'insecte est ensuite désinfecté, 2mn dans de l'eau de javel, 2mn dans de l'eau physiologique stérile, 5 mn dans de l'alcool puis rincé avec de l'eau physiologique. Il est ensuite placé dans 2 ml de solution Tween 80 et vortexé (ou à l'aide d'un mortier) nouveau pendant 2mn pour l'éclater, puis 1ml de cette solution est ensemencé dans 5ml de BHIB. Cette suspension servira de flore interne. Les tubes sont incubés 24h à 37°C.

## **III. Recherche de Bacilles à Gram négatif**

### **III.1 Recherche de Bacilles à Gram négatif résistants aux céphalosporines de troisième génération**

L'enrichissement sélectif des bacilles à Gram négatif a été effectué en ajoutant 200µl de bouillons de pré-enrichissement dans 800µl de BHIB additionné de Céfotaxime et de Vancomycine. L'incubation a été réalisée à 37°C /24h.

L'isolement a été fait par ensemencement de 50µl sur la gélose Mac ConKey additionnée de Céfotaxime et de Vancomycine. L'incubation a été effectuée à 37°C/24h.

### **III.2 Recherche de Bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes**

L'enrichissement sélectif a été effectué en ajoutant 200µl de bouillon de pré-enrichissement dans 800µl de BHIB additionné de Méropénème et de Vancomycine. L'incubation a été effectuée à 37°C/24h.

L'isolement a été fait par ensemencement de 50µl sur la gélose Mac ConKey additionnée de Méropénème et de Vancomycine. L'incubation a été effectuée à 37°C/24h.

### **III.3 Identification**

Les souches sélectionnées ont été identifiées à l'aide de la coloration de Gram et d'après leurs aspect sur boîte ensuite en utilisant une mini galerie biochimique (tableau I).

#### **➤ Galerie biochimique**

**Tableau I** : Mini galerie biochimique (Philippon 2005)

Milieux	Ensemencement	Caractères recherchés	Interprétation
<b>Bouillon nitraté</b>	Ensemencement à l'aide d'une suspension. Incubation pendant 24h/37°C	Présence ou absence de la nitrate réductase	Virage du milieu au rouge après l'ajout des réactifs NR1 et NR2 : - Présence de l'enzyme nitrate réductase Milieu incolore, ajout de la poudre de zinc : - Virage du milieu au rouge : Absence de l'enzyme - Milieu incolore : Présence de l'enzyme nitrate réductase et réduction des nitrates au stade N2
<b>TSI</b> ( ThreeSugarIron)	Pique centrale et remonter en stries serrés sur la pente. Incubation pendant 24h/37°C	Fermentation du : - Lactose - Glucose - Saccharose Production de gaz Production d'H <sub>2</sub> S	Virage de la couleur de la pente du rouge au jaune : fermentation du lactose Virage du culot au

			<p>jaune : fermentation du glucose</p> <p>Virage entre la pente et le culot au jaune : fermentation du saccharose</p> <p>Absence de virage de couleur : absence de fermentation</p> <p>Apparition de bulles d'air ou décollage de la gélose du tube : production de gaz</p> <p>Noircissement du culot : production d'H<sub>2</sub>S</p>
<b>Urée-Indole</b>	<p>Ensemencer avec une suspension.</p> <p>Incubation pendant 24h/37°C</p>	<p>Uréase</p> <p>Indole</p>	<p>Virage du milieu au rose :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Uréase positive</li> <li>- Absence de virage de couleur : uréase négative</li> </ul> <p>Formation d'un anneau rouge à la surface du tube après l'ajout de quelques gouttes de réactif de Kovacs :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Indole positif</li> <li>- Absence de</li> </ul>

			l'anneau : indole négatif
<b>Citrate de Simmons</b>	Stries serrés sur la pente. Incubation entre 24h et 5 jours à 37°C	Utilisation du citrate comme seule source de carbone	Virage du milieu du vert au bleu : - Citrate positif Milieu vert : - Citrate négatif
<b>Clarck et Lubs</b>	Ensemencement à l'aide d'une suspension. Incubation 24h/37°C	Type de voie fermentaire : - RM : voie des acides mixtes - Vogues-Proskauer (VP) : voie des acétoines	Après division du milieu en deux, ajouter à l'un deux gouttes de rouge de méthyle : - Virage de la couleur au rouge : RM positif  - Milieu incolore : RM négatif  Ajouter à l'autre tube deux gouttes du réactifs VP1 et deux gouttes du réactif VP2 : - Virage de la couleur au rouge : VP positif  - Milieu incolore : VP négatif

L'identification des souches a été également faite par l'utilisation du milieu Chromagar orientation (Tableau II).

**Tableau II** : Aspect des colonies sur milieu Chromagar orientation(Singh et al. 2015)

Espèce	Couleur des colonies
<i>Escherichia coli</i>	Colonies rose à pourpre
<i>KES-C</i> ( <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Citrobacter</i> )	Colonies bleu vert à bleues avec ou sans auréole violette
<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Morganella</i> , <i>Providencia</i>	Colonies pâles à beiges, cernées d'une auréole ambre à marron.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colonies muqueuses blanches brunâtres
<i>Acinetobacterbaumannii</i>	Colonies muqueuses blanches opaque
<i>EnterococcusSp.</i>	Petites colonies bleu turquoise

### III.4 Etude de la sensibilité des souches

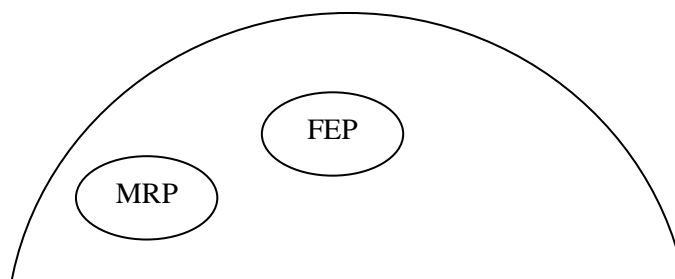
A partir d'une culture de 18-24 h, on prépare une suspension en solution saline (0,9 % NaCl) équivalente au standard McFarland 0,5 (~ 10<sup>8</sup> UFC/ml), on ensemence par écouvillonnage avec l'inoculum puis on dispose les disques d'antibiotiques et on incube pendant 18/24h à 37°C selon les recommandations de l'EUCAST 2018.

#### III.4.1 Recherche de la production d'une bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE)

##### - DD-TEST (test de synergie)

La production d'une BLSE est mise en évidence par le test de synergie qui consiste à placer des disques de CAZ et de CTX (30µg chacun) à une distance de 30mm (centre à centre) d'un disque d'AMC (AMC : amoxicilline/acide clavulanique de 20 et 10 µg, respectivement) (Figure 1). L'augmentation de la zone d'inhibition entre le disque d'AMC et les disques de CAZ, CTX indique la production probable d'une BLSE (Jarlier et al. 1988).

D'autres β-lactamines ont été testés sur la même boîte : ATM (30µg), FOX (30µg), FEP (30µg), MRP (10µg) selon EUCAST 2013 et 2018.



**Figure1** : Schéma représentant le DD\_test

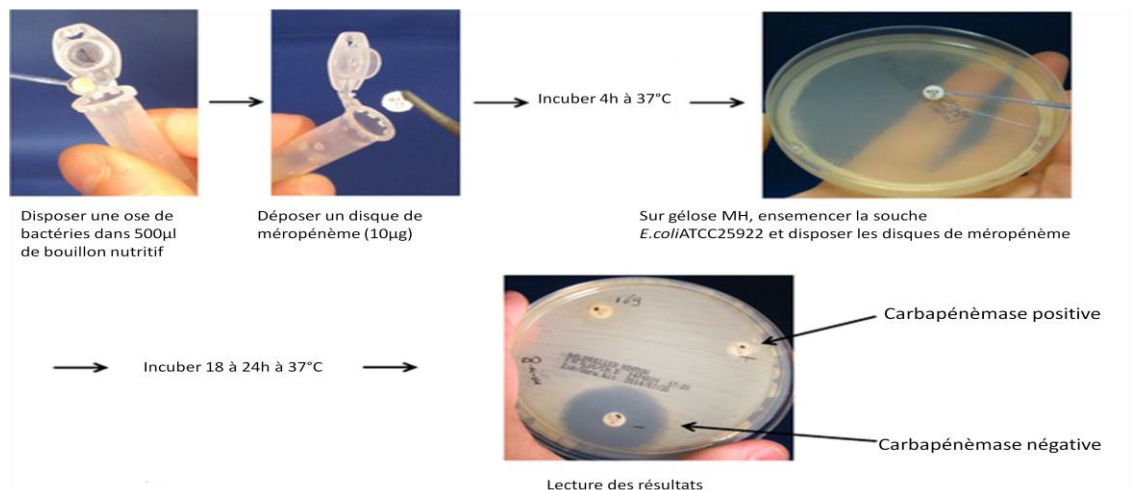
**- DD-TEST sur gélose à la cloxacilline**

La présence d'une BLSE peut être cachée par la production d'une céphalosporinase. Pour inhiber l'activité céphalosporinase, le test de synergie précédent sera refait sur gélose Mueller-Hinton additionnée de cloxacilline 250mg/l. La comparaison des diamètres des zones d'inhibition entre les boîtes avec et sans cloxacilline permet de mettre en évidence la présence d'une BLSE d'une céphalosporinase (Giske et al. 2011).

**III.4.2 Recherche de la production d'une carbapénémase**

La mise en évidence de la production d'une carbapénémase s'est fait par le test MCIM modifier (modified carbapenem inactivation method). Il a été réalisé comme décrit par Pierce *et al.*, 2017 comme suit :

- Préparer les suspensions dans des tubes Eppendorf stériles contenant 500µl de bouillon nutritif stérile (souches bactériennes à tester, témoin positif : KPC, témoin négatif : *E. coli* ATCC 25922). Introduire ensuite un disque de méropénème (10µg) dans chaque Eppendorf et vortexer puis incubé pendant 4 h / 37 ° C. Après incubation, retirer le disque de la suspension à l'aide d'une anse de platine, et le déposer sur une boîte de gélose MH préalablement ensemencée avec la souche *E. coli* sensible ATCC 25922. Incuber les boîtes à 37 °C/24h (Figure 2). Le test est considéré comme positif lorsque la zone autour du disque de méropénème est inférieure ou égale à 18mm.



**Figure2** : test MCIM (Pierce et al. 2017).

## IV. Recherche d'entérocoques résistants à la vancomycine

### IV.1 Isolement

L'enrichissement sélectif a été effectué en ajoutant 200µl de bouillon de pré-enrichissement dans 800µl de bouillon hyper salé additionné de Colistine (10µg/ml) et de Vancomycine (5µg/ml). L'incubation a été effectuée à 37°C/24h.

L'isolement a été fait par ensemencement de 500µl sur la gélose BEA additionnée de Colistine (10µg/ml) et de Vancomycine (5µg/ml). L'incubation a été effectuée à 37°C/48h.

### IV.2 Etude de la sensibilité des entérocoques à la vancomycine

La sensibilité des souches d'entérocoques à la vancomycine a été déterminée par la méthode de diffusion sur gélose MH selon les recommandations de l'EUCAST 2018.

Des boîtes de gélose MH ont été ensemencées par écouvillonnage à partir d'une suspension bactérienne à 0,5 Mac Ferland puis un disque de vancomycine (VAN : 30µg) a été déposé sur la boîte et incubée pendant 24h/37°C.

Lorsque le diamètre est inférieur à 12 mm la souche est considérée comme étant résistante à la vancomycine.

### IV.3 Caractérisation phénotypique

#### - Coloration de Gram

La coloration de Gram est une coloration différentielle qui permet de différencier entre deux grands groupes bactériens : bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. L'aspect microscopique des bactéries après la coloration de Gram révèle des formes cellulaires en cocci, disposées en paire (diplocoque) ou en courtes chainettes de couleur violet (Toit et al., 2000).

#### - Test de la catalase

La mise en évidence de l'activité de la catalase se fait par la dilution d'une colonie bactérienne dans une goutte d' $H_2O_2$  sur une lame propre. Le résultat positif se traduit par l'apparition d'une effervescence ( $2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$ ). Les entérocoques sont catalase négatif (Reiner 2010).

#### - Croissance sur bouillon hyper salé

Les entérocoques sont capables de croître en présence d'une concentration élevée de chlorure de sodium (NaCl), cela permet de les différencier des streptocoques. Le principe de ce test est basé sur l'ensemencement de colonies dans des tubes contenant 5ml de bouillon hyper salé (6.5% NaCl). L'incubation a été faite à 37°C pendant 48h. L'apparition d'un trouble indique la présence d'éventuel entérocoque (Devriese et al. 1987).

#### - Test au tellurite de potassium

La croissance en présence de tellurite de potassium est une caractéristique des souches d'*E. faecalis*. Afin de mettre en évidence ce test, nous avons additionné 1ml de tellurite de potassium à 249ml d'eau distillée, puis 0,5ml de cette solution est ajoutée à 4,5ml de bouillon nutritif. Le tube a été ensemencé par la bactérie à tester puis incubé à 37°C pendant 24h. L'apparition de colonies noires indique la présence *E. faecalis* (Fazli and Hanifian 2014).



# *Résultats*

## I. Souches bactériennes

Sur 162 échantillons, un total de 111 souches ont été isolées sur gélose MacConkey additionné de méropénème, 81 souches sur MacConkey additionné de céfotaxime et 30 souches sur BEA additionné de vancomycine. Les résultats d'identification des souches retenues sont donnés dans le tableau II (Annexe VI)

## II. Bacilles à Gram négatif

### II.1 Recherche de la production de $\beta$ -lactamases à Spectre Etendu

#### - DD-test

Ce test a été effectué sur les souches isolées à partir de la gélose MacConkey additionnée de céfotaxime. Les résultats obtenus ont montré une image de synergie chez 22 souches (Figure 3).



**Figure 3** :Image de synergie pour la souche *E. coli* 139I

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau III ci-dessous

**Tableau III** : Souches présentant une BLSE

Souches	CAZ 30µg	CTX 30µg	AMC 30µg	FOX 30µg	FEP 30µg	ATM 30µg	MRP 10µg
<b>R081 E/I</b>	19mm R	9 mm R	9 mm R	21mm S	16mm R	16mm R	25mm S
<b>L122 E</b>	25mm R	19mm R	13mm R	22mm S	27mm I	22mm R	24mm S
<b>L128 E</b>	11mm R	11mm R	9 mm R	25mm S	26mm I	20mm R	25mm S

Résultats

<b>C131 E</b>	13mm R	10mm R	10mm R	20mm S	20mm R	20mm R	26mm S
<b>R132 I</b>	15mm R	15mm R	6 mm R	25mm S	20mm R	25mm I	28mm S
<b>R133 E</b>	13mm R	12mm R	6 mm R	21mm S	20mm R	17mm R	26mm S
<b>L135 E/I</b>	14mm R	11mm R	6 mm R	22mm S	20mm R	20mm R	26mm S
<b>C136 I</b>	17mm R	13mm R	10mm R	23mm S	20mm R	19mm R	30mm S
<b>C137 I</b>	11mm R	6 mm R	9 mm R	20mm S	18mm R	16mm R	30mm S
<b>C138 I</b>	14mm R	11mm R	6 mm R	24mm S	19mm R	20mm R	26mm S
<b>C139 I</b>	13mm R	8 mm R	8 mm R	21mm S	18mm R	18mm R	28mm S
<b>C140 E/I</b>	13mm R	10mm R	6 mm R	26mm S	18mm R	16mm R	27mm S
<b>L141 E</b>	14mm R	6 mm R	9 mm R	25mm S	18mm R	17mm R	28mm S
<b>C142 I</b>	12mm R	6 mm R	9 mm R	20mm S	18mm R	19mm R	25mm S
<b>R143 E/I</b>	12mm R	6 mm R	6 mm R	21mm S	12mm R	18mm R	26mm S
<b>R144E/I</b>	16mm R	12mm R	9 mm R	23mm S	20mm R	15mm R	26mm S
<b>O145 E/I</b>	10mm R	6 mm R	11mm R	27mm S	18mm R	16mm R	30mm S
<b>P146 E</b>	15mm R	8 mm R	8 mm R	23mm S	20mm R	19mm R	29mm S
<b>C147 I</b>	10mm R	6 mm R	6 mm R	23mm S	17mm R	15mm R	24mm S
<b>O148 E</b>	10mm R	6 mm R	6 mm R	20mm S	11mm R	14mm R	23mm S
<b>O149 E/I</b>	8 mm R	6 mm R	6 mm R	22mm S	14mm R	14mm R	30mm S
<b>O150 E/I</b>	9 mm R	6 mm R	9 mm R	26mm S	17mm R	18mm R	29mm S

	R	R	R	S	R	R	S
--	---	---	---	---	---	---	---

**Légende :** BGNNF : bacille à Gram négatif non fermentaire, **R** : résistant, **S** : sensible, **I** : intermédiaire

- **DD-test avec cloxacilline**

Ce test a été réalisé pour les souches avec absence d'image de synergie et qui sont résistantes aux C3G et à la céfoxitine pour déterminer la présence d'une BLSE masquée ou d'une céphalosporinase. La présence d'une céphalosporinase se traduit par une récupération de diamètres de 5mm ou plus. Les résultats obtenus ont montré une récupération de diamètre pour 13 souches (figure 4).



(A) Absence de synergie

(B) Récupération de diamètres

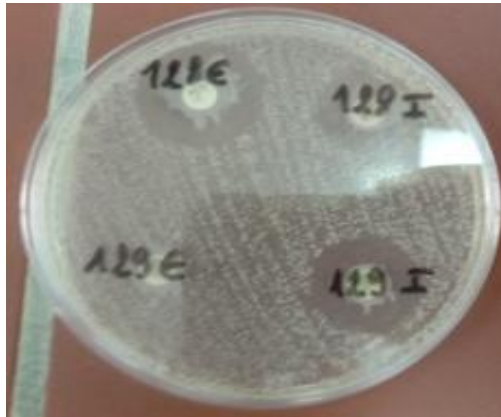
**Figure 4 :** DD-test sans cloxacilline (A) et avec cloxacilline (B) pour la souche *E.coli* 130E

Aucune souche n'a présenté une image de synergie après le DD-test avec cloxacilline. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau IV ci-dessous.

## II.2 Recherche de la production de carbapénèmases

- **Test de CIM modifié**

Le test est effectué sur les souches isolées sur gélose MacConkey additionnée de méropénème et les souches résistantes ou intermédiaires au méropénème. Le test a été positif pour 9 souches, ce qui traduit une présence probable d'une carbapénémase (Figure 5).



**Figure 5** : Exemple de souche positive au test MCIM : *Pseudomonas* sp129E

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau V.

**Tableau V** : Souches positives au test CIM modifié

Souches	Date de prélèvement	Service	Hôpital	Diamètres au test CIM (mm)
L068 E1''	20/03/2018	Laboratoire	KhelilAmraneBéjaia	17 mm R
L069 II	20/03/2018	Laboratoire	KhelilAmraneBéjaia	14 mm R
L069 I2''	20/03/2018	Laboratoire	KhelilAmraneBéjaia	15 mm R
R081 E	02/04/2018	Réanimation	AIT Idir Alger	17 mm R
R081 I	02/04/2018	Réanimation	AIT Idir Alger	17 mm R
NH97		Neurochirurgie hommes	AIT Idir Alger	16 mm R
L123 E	20/05/2018	Laboratoire	KhelilAmraneBéjaia	17 mm R
L129 E	20/05/2018	Laboratoire	KhelilAmraneBéjaia	6 mm R
L130 E	20/03/2018	Laboratoire	KhelilAmraneBéjaia	17 mm R

**Légende** : R : résistant, BGNNF : Bacille à Gram négatif on fermentaire

#### - Antibiogramme avec cloxacilline

Un antibiogramme a été fait pour toutes les souches positives au test MCIM afin de vérifier si la résistance est due à une présence probable d'une carbapénémase ou à l'hyper

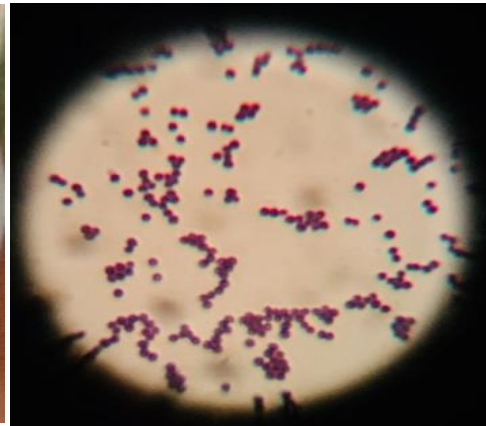
production d'une céphalosporinase. Une souche a eu une nette récupération de diamètres et a été ajoutée aux souches présentant une probable céphalosporinase.

### III. Les entérocoques

L'identification des entérocoques s'est faite en premier lieu sur la base de leurs aspects sur gélose BEA, leurs aspects microscopiques et le test de catalase (Figure 6, 7). Cette identification a aussi été réalisée en se basant sur les tests au téllurite de potassium et sur bouillon hyper salé (Figure 8, 9).



**Figure 6 :** Aspect des entérocoques sur BEA



**Figure 7 :** Aspect microscopique des entérocoque



**Figure 8 :** Croissance et réduction de téllurite de potassium pour *E. faecalis*



**Figure 9:** Croissance sur bouillon hyper salé

Au cours de cette étude, nous avons isolé et identifié 12 souches d'entérocoques sur milieu BEA additionnée de vancomycine (tableau VII).

**Tableau VII : Caractérisation phénotypique des entérocoques isolés**

<b>Souches</b>	<b>Noircissement sur BEA</b>	<b>Catalase</b>	<b>Croissance sur bouillon hyper salé</b>	<b>Croissance sur bouillon au téllurite de potassium</b>	<b>Gram</b>	<b>Vancomycine (30µg)</b>	<b>Espèce probable</b>
<b>L045E</b>	+	-	+	-	Cocci violette s en amas ou en chaînette	6 mm (R)	<i>Enterococcus</i> <i>ssp</i>
<b>L045 I</b>	+	-	+	+	Cocci violette s en amas ou en chaînette	6 mm (R)	<i>E.faecalis</i>
<b>L046E</b>	+	-	+	-	Cocci violette s en amas ou en chaînette	6 mm (R)	<i>Enterococcus</i> <i>ssp</i>
<b>L046 I</b>	+	-	+	-	Cocci violette s en	6 mm (R)	<i>Enterococcus</i> <i>ssp</i>

Résultats

					amas ou en chaînet te		
<b>L047E</b>	+	-	+	+	Cocci violette s en amas ou en chaînet te	6 mm (R)	<i>E.faecalis</i>
<b>L047 I</b>	+	-	+	-	Cocci violette s en amas ou en chaînet te	6 mm (R)	<i>Enterococcu ssp</i>
<b>L048E</b>	+	-	+	+	Cocci violette s en amas ou en chaînet te	6 mm (R)	<i>E.faecalis</i>
<b>L048 I</b>	+	-	+	+	Cocci violette s en amas ou en chaînet te	6 mm (R)	<i>E.faecalis</i>
<b>L049E</b>	+	-	+	+	Cocci violette	6 mm (R)	<i>E.faecalis</i>



Résultats

					s en amas ou en chaînet te		
<b>R081 E/I</b>	+	-	+	-	Cocci violette s en amas ou en chaînet te	6 mm (R)	<i>Enterococcu ssp</i>
<b>P146 I</b>	+	-	+	+	Cocci violette s en amas ou en chaînet te	6 mm (R)	<i>E.faecalis</i>
<b>C147 I</b>	+	-	+	+	Cocci violette s en amas ou en chaînet te	6 mm (R)	<i>E.faecalis</i>

**Légende :** (R) : Résistante ; (+) : Positif ; (-) : Négatif

*Discussion et  
conclusion et  
perspectives*

Dans ce travail nous, avons étudié la flore externe et interne de différents insectes : mouches, moustiques, fourmis noires, drosophiles et cafards collectés dans des structures hospitalières.

La résistance aux antibiotiques chez les isolats des insectes étant acquise à partir des aliments qu'ils consomment d'après l'expérience de Zurek and Ghosh, 2014 et de l'environnement(Macovei and Zurek 2006).

Des études ont montré que les cafards peuvent héberger des bactéries productrices de BLSE et/ou carbapénémase. En Algérie, l'étude réalisée par Loucif et *al.*, en 2016 a signalé des entérobactéries productrices de BLSE de type CTX-M-15 isolées chez les cafards (*Blattellagermanica*) au niveau du CHU de Batna.

L'étude de Bouamama et *al.*, en 2010 au Maroc réalisée sur des cafards (*Periplanetaamericana*) et des mouches (*Muscadomestica*) a montré l'isolement de 184/251 bactéries à Gram négatifs et 29/251 d'Entérocoques. En Malaisie, en 2005, Pai et *al.*, ont montré l'isolement d'une *Klebsiellapneumoniae* productrice d'une BLSE chez un cafard.

Le mécanisme le plus fréquemment incriminé dans la résistance aux C3G, après la production de BLSE, est la production de  $\beta$ -lactamases de type AmpC. Elles ont émergé à travers le monde dans diverses espèces des bacilles à Gram négatif comme un mécanisme de résistance acquis ou naturelle à la céfoxitine(Gharout-Sait et al. 2015). Dans la présente étude, nous avons isolées 3 souches ayant probablement une AmpCplasmidique.

La dissémination des bacilles à Gram négatif producteurs de carbapénémase chez les insectes en particulier retrouvées dans l'environnement hospitalier est un phénomène émergent. Il y a eu peu de travaux internationaux publiés à ce sujet. En Algérie, une seule étude a été publiée en 2016 par l'équipe de Loucif et *al.*, sur les cafards allemands. Le rôle important des cafards comme réservoir potentiel de bactéries multirésistantes a été démontré dans cette étude et dans des études antérieures avec leur présence dans des milieux hospitaliers(Menasria et al. 2014; Loucif et al. 2016).

La résistance des entérobactéries aux antibiotiques, en particulier aux  $\beta$ -lactamines, est en croissance continue (Iredell et al. 2016). Les bactéries à Gram négatif non fermentaires sont considérées comme des pathogènes opportunistes, émergents et multirésistants. Le plus souvent, ils sont responsables d'infections nosocomiales difficiles à contrôler et à traiter, en particulier dans les unités des soins intensifs (Peleg, et al. 2008).

Plusieurs études ont rapporté la fréquence d'isolement des entérocoques résistantes aux antibiotiques chez les mouches par Macovei et Zurek en 2006 aux États-Unis, également chez les fourmis montré par Fowler, et al., en 1993 au Brésil.

Les entérocoques peuvent acquérir la résistance aux antibiotiques soit par l'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques codés par des plasmides ou des transposons provenant d'autres microorganismes, soit par des mutations spontanées leur donnant ainsi un niveau de résistance plus élevée (Kak and Chow 2002).

La résistance à la vancomycine chez *E. faecalis* est rare. Aucun isolat d'*E. faecalis* ayant une résistance à la vancomycine n'a été observé chez les mouches dans l'étude réalisée par Macovei et Zurek en 2006 aux États-Unis. Ahmad et al., 2011 dans leur étude portant sur la recherche d'entérocoques virulents chez les insectes aux États-Unis, ont rapporté l'absence de souches d'ERV chez les mouches et les cafards.

Bourafaet al., en 2016 ont rapporté dans leur étude portant sur la caractérisation moléculaire de la résistance des souches d'*Enterococcus* isolées dans les hôpitaux du nord-est Algérien (2010, 2013), l'absence de souches résistantes à la vancomycine.

Les insectes peuvent être des réservoirs et des vecteurs et jouer un rôle dans la transmission de ces résistances (Onwugamba et al. 2018). Les résultats que nous avons obtenus confirment ces hypothèses car nous avons retrouvé des résistances dans la flore interne et externe chez le même insecte.

En conclusion, l'utilisation massive d'antibiotiques en médecine humaine, vétérinaire et même dans l'agriculture, pourrait constituer une pression sélective pour la propagation des bactéries résistantes aux antibiotiques. Ceci est devenu une menace majeure pour la santé humaine dans le monde. Les insectes peuvent être considérés comme des vecteurs importants à la diffusion généralisée des gènes de résistance aux antibiotiques, vu leur contacts directs et constants avec l'homme, et représentent un réservoir considérable des souches résistantes aux antibiotiques. La connaissance des origines de la résistance aux antibiotiques chez les insectes

est importante pour la santé humaine surtout en milieu hospitalier, en raison de l'importance croissante des maladies infectieuses ainsi, que pour la prédiction de l'émergence des pathogènes résistants.

Nous recommandons des mesures d'hygiène spécifiques pour limiter la présence des insectes en milieu hospitalier, par exemple en favorisant l'usage des plantes repoussantes d'insectes, des lampes UV et ultras sons anti-moustiques.

Avec le peu d'études concernant les souches multirésistantes aux antibiotiques isolées chez les insectes du milieu hospitalier en Algérie. En perspectives, les résultats obtenus restent préliminaires et exploratoires et peuvent être mieux étudiés et approfondis par :

- Confirmation de l'identification des souches.
- Caractérisation moléculaires des gènes de résistances.
- Elargir l'étude par rapport aux espèces d'insectes et aux niches étudiées.

-

# *Références bibliographiques*

## Références bibliographiques

- Adams, D. J., M. D. Eberly, A. Goudie, and C. M. Nylund. 2016. "Rising Vancomycin-Resistant Enterococcus Infections in Hospitalized Children in the United States." *Hospital Pediatrics* 6 (7): 404–11.
- Aggoune, N., A. Chabani, D. Tiouit, M. Naim, and K. Rahal. 2008. "[First case of vancomycin-resistant Enterococcus faecalis in Algeria]." *Medecine et maladies infectieuses* 38 (10): 557–58.
- Antunes, Nuno T., Toni L. Lamoureaux, Marta Toth, Nichole K. Stewart, Hilary Frase, and Sergei B. Vakulenko. 2014. "Class D  $\beta$ -Lactamases: Are They All Carbapenemases?" *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (4): 2119–25.
- Bush, Karen, and George A. Jacoby. 2010. "Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (3): 969–76.
- Devriese, L. A., A. Van De Kerckhove, R. Kilpper-Bälz, and K. H. Schleifer. 1987. "Characterization and Identification of Enterococcus Species Isolated from the Intestines of Animals." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 37 (3): 257–59.
- Galleni, Moreno, Josette Lamotte-Brasseur, Gian Maria Rossolini, Jim Spencer, Otto Dideberg, Jean-Marie Frère, and The Metallo- $\beta$ -Lactamase Working Group†. 2001. "Standard Numbering Scheme for Class B  $\beta$ -Lactamases." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (3): 660–63.
- Gharout-Sait, Alima, Abdelaziz Touati, Thomas Guillard, Lucien Brasme, and Christophe de Champs. 2015. "Molecular Characterization and Epidemiology of Cefoxitin Resistance among Enterobacteriaceae Lacking Inducible Chromosomal AmpC Genes from Hospitalized and Non-Hospitalized Patients in Algeria: Description of New Sequence Type in Klebsiella Pneumoniae Isolates." *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 19 (2): 187–95.
- Giske, C. G., L. Gezelius, Ø. Samuelsen, M. Warner, A. Sundsfjord, and N. Woodford. 2011. "A Sensitive and Specific Phenotypic Assay for Detection of Metallo- $\beta$ -Lactamases and KPC in Klebsiella Pneumoniae with the Use of Meropenem Disks Supplemented with Aminophenylboronic Acid, Dipicolinic Acid and Cloxacillin." *Clinical Microbiology and Infection* 17 (4): 552–56.
- Hleba, Lukáš, Vladimír Kmeť, Tomáš Tóth, and Miroslava Kačániová. 2017. "Resistance in Bacteria and Indirect Beta-Lactamase Detection in *E. Coli* Isolated from *Culex Pipiens* Detected by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry." *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 52 (1): 64–69.
- Iredell, Jon, Jeremy Brown, and Kaitlin Tagg. 2016. "Antibiotic Resistance in Enterobacteriaceae: Mechanisms and Clinical Implications." *BMJ* 352 (February): h6420.

## Références bibliographiques

- Jarlier, V., M.-H. Nicolas, G. Fournier, and A. Philippon. 1988. "Extended Broad-Spectrum -Lactamases Conferring Transferable Resistance to Newer -Lactam Agents in Enterobacteriaceae: Hospital Prevalence and Susceptibility Patterns." *Clinical Infectious Diseases* 10 (4): 867–78.
- Kak, Vivek, and Joseph W. Chow. 2002. "Acquired Antibiotic Resistances in Enterococci." *The Enterococci*, January, 355–83.
- Laurentiaux, DANIEL. 1953. "Classe Des Insectes." *Traité de Paléontologie* 3: 397–527.
- Logan, Latania K., and Robert A. Weinstein. 2017. "The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace." *The Journal of Infectious Diseases* 215 (suppl\_1): S28–36.
- Loucif, Lotfi, Djamila Gacemi-Kirane, Zineb Cherak, Naima Chamlal, Nadia Grainat, and Jean-Marc Rolain. 2016. "First Report of German Cockroaches (*Blattella Germanica*) as Reservoirs of CTX-M-15 Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase- and OXA-48 Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Batna University Hospital, Algeria." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60 (10): 6377–80.
- Macovei, Lilia, and Ludek Zurek. 2006. "Ecology of Antibiotic Resistance Genes: Characterization of Enterococci from Houseflies Collected in Food Settings." *Applied and Environmental Microbiology* 72 (6): 4028–35.
- Menasria, Taha, Fatima Moussa, Souad El-Hamza, Samir Tine, Rochdi Megri, and Haroun Chenchouni. 2014. "Bacterial Load of German Cockroach (*Blattella Germanica*) Found in Hospital Environment." *Pathogens and Global Health* 108 (3): 141–47.
- Monnet, D. L. 2000. "Consommation d'antibiotiques et Résistance Bactérienne\*1Travail Présenté Au Club d'infectiologie En Anesthésie-Réanimation, 23 Septembre 1999." *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 19 (5): 409–17.
- Nordmann, Patrice. 2010. "Résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif." *médecine/sciences* 26 (11): 950–59. <https://doi.org/10.1051/medsci/20102611950>.
- Nordmann, Patrice, Thierry Naas, and Laurent Poirel. 2011. "Global Spread of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*." *Emerging Infectious Diseases* 17 (10): 1791–98.
- Onwugamba, Francis C., J. Ross Fitzgerald, Kateryn Rochon, Luca Guardabassi, Abraham Alabi, Stefan Kühne, Martin P. Grobusch, and Frieder Schaumburg. 2018. "The Role of 'Filth Flies' in the Spread of Antimicrobial Resistance." *Travel Medicine and Infectious Disease* 22 (March): 8–17.
- Peleg, Anton Y., Harald Seifert, and David L. Paterson. 2008. "Acinetobacter Baumannii: Emergence of a Successful Pathogen." *Clinical Microbiology Reviews* 21 (3): 538–582.



## Références bibliographiques

- Philippon, A., and G. Arlet. 2006. "Î<sup>2</sup>-Lactamases de Bacilles À Gram NÃ©gatif : Le Mouvement PerpÃ©tuel !" *Annales de Biologie Clinique* 64 (1): 37–51.
- Philippon, Alain. 2005. "Place des atuomates (culture, identification, antibiogramme) en 2005." *BioTribune Magazine* 16 (1): 28–30.
- Pierce, Virginia M., Patricia J. Simner, David R. Lonsway, Darcie E. Roe-Carpenter, J. Kristie Johnson, William B. Brasso, April M. Bobenchik, et al. 2017. "Modified Carbapenem Inactivation Method for Phenotypic Detection of Carbapenemase Production among Enterobacteriaceae." *Journal of Clinical Microbiology* 55 (8): 2321–33.
- Reiner, Karen. 2010. "Catalase Test Protocol." Text. November 11, 2010. <http://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3226>.
- Singh, Atul K., and Arun K. Bhunia. 2015. "Optical Scatter Patterns Facilitate Rapid Differentiation of E Nterobacteriaceae on CHROMagar™ Orientation Medium." *Microbial Biotechnology* 9 (1): 127–35.
- Toit, M. Du, C. M. a. P. Franz, L. M. T. Dicks, and W. H. Holzapfel. n.d. "Preliminary Characterization of Bacteriocins Produced by Enterococcus Faecium and Enterococcus Faecalis Isolated from Pig Faeces." *Journal of Applied Microbiology* 88 (3): 482–94.
- Touati, A., K. Zenati, L. Brasme, S. Benallaoua, and C. de Champs. 2010. "Extended-Spectrum ß-Lactamase Characterisation and Heavy Metal Resistance of Enterobacteriaceae Strains Isolated from Hospital Environmental Surfaces." *Journal of Hospital Infection* 75 (1): 78–79.
- Vodovar, D., G. Marcadé, L. Raskine, I. Malissin, and B. Mégarbane. 2013. "Entérobactéries Productrices de Bêta-Lactamases à Spectre Élargi : Épidémiologie, Facteurs de Risque et Mesures de Prévention." *La Revue de Médecine Interne* 34 (11): 687–93.
- Werner, Guido, Sabine Gfrörer, Carola Fleige, Wolfgang Witte, and Ingo Klare. 2008. "Tigecycline-Resistant Enterococcus Faecalis Strain Isolated from a German Intensive Care Unit Patient." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61 (5): 1182–83.
- Zahar, J. R., I. Grall, and A. T. Kouatchet. 2010. "Carbapénèmes: Nouvelles Molécules, Différentes Indications?" *La Lettre de l'infectiologue* 25 (4): 142–146.
- Zahar, Jean-Ralph, Emmanuelle Bille, David Schnell, Fanny Lanternier, Frédéric Mechai, Virginie Masse, Xavier Nassif, and Olivier Lortholary. 2009. "Diffusion communautaire des entérobactéries sécrétrices de ß-lactamase à spectre élargi (EBLSE)." *médecine/sciences* 25 (11): 939–44.

## Références bibliographiques

- Zenati, K., A. Touati, S. Bakour, F. Sahli, and J. M. Rolain. 2016. "Characterization of NDM-1- and OXA-23-Producing *Acinetobacter Baumannii* Isolates from Inanimate Surfaces in a Hospital Environment in Algeria." *Journal of Hospital Infection, Multi-drug Resistant Gram Negative Bacteria*, 92 (1): 19–26.
- Zurek, Ludek, and Anuradha Ghosh. 2014. "Insects Represent a Link between Food Animal Farms and the Urban Environment for Antibiotic Resistance Traits." *Applied and Environmental Microbiology* 80 (12): 3562–67..

# *Annexes*

## Annexe I

### Composition des milieux

#### Gélose nutritive :

Extrait de viande.....	5g
Peptone.....	10g
Chlorure de sodium.....	5g
Agar.....	20g

PH = 7

#### Gélose Mueller Hinton :

Infusion de viande de boeuf .....	2g
Hydrolysate de caséine .....	17.5g
Amidon .....	1.5g
Agar .....	17g

PH = 7,4

#### Gélose Mac Conkey

Peptone de caséine .....	17g
Peptone de viande .....	3g
Lactose .....	10g
Mélange de sels biliaire .....	1.5g
Chlorure de sodium .....	5g
Rouge neutre .....	0.03g

PH = 7,3

#### Gélose EMB :

Peptone.....	10g
Lactose.....	10g
Hydrogénophosphate de potassium .....	2g
Eosine.....	0.4g
Bleu de méthylène .....	0.065g
Gélose .....	15g

PH = 7

**Gélose BEA**

Casein enzymic hydrolysate.....	17,0 g
Proteose piptone.....	3,0 g
Beefextrat .....	5,0 g
Oxgall.....	10,0g
Sodium chloride.....	5,0g
Agar .....	15,0 g
Esculine.....	1,0g
ferric ammonium citrate.....	0,5g
Soduimazide.....	0,15g

PH = 7,1

**Gélose TSI**

Extrait de viande de boeuf.....	3 g
Extrait de levure .....	3 g
Peptone trypsique.....	20 g
Chlorure de sodium .....	5 g
Citrate ferrique .....	0.3g
Thiosulfate de sodium .....	0.3 g
Lactose .....	10 g
Glucose .....	1 g
Saccharose .....	10 g

PH = 7,4

**Milieu Citrate de simmons**

Sulfate de magnésium .....	0.2g
Phosphate monoammonique.....	1g
Phosphate bipotassique.....	1g
Chlorure de sodium .....	5g
Citrate de sodium .....	2g
Bleu de bromothymol.....	0.08g
Agar .....	15g

PH = 7,1

**Milieu Urée-Indole**

L-tryptophane .....	3 g
---------------------	-----

## Annexes

Phosphate monopotassique.....	1 g
Phosphate bipotassique.....	1 g
Chlorure de sodium .....	5g
Urée .....	20 g

PH = 7

### Milieu Clark-Lubs

Peptone tryptique de viande .....	5 g
Phosphate bipotassique.....	5 g
Glucose.....	6 g

PH = 7

### Bouillon nitraté

Infusion de coeur cervelle.....	25g
Nitrate de sodium .....	10g

PH = 7,2

### Composition des réactifs utilisés :

#### NR1 :

Acide sulfanilique.....	0,8ml
Acide acétique.....	5N 100ml

#### NR2 :

Diméthylamine.....	0,6ml
Acide acétique.....	5N 100ml

### Réactif de Kovacs :

p-diméthylaminebenz aldéhyde.....	10ml
acidechloridrique.....	50ml
alcoolamylique.....	150ml

#### VP1 :

a-naphtol.....	6g
alcool à 90°.....	100ml

Annexes

□ **VP2 :**

NaOH 4N

**Rouge de méthyle(RM) :**

Rouge de méthyle.....0,5g

Alcool éthylique à 60% .....100ml

## Annexe II

Tableau I : Liste des antibiotiques testés

Antibiotique	Abréviation	Marque d'ATB	Charge de disque	Diamètre critique	
				≥S	<R
Amoxicilline/AC. Clavulanique	AMC	CYPRESS	30µg	21	16
Céfoxitine	FOX	HIMEDIA+ CYPRESS	30µg	19	19
Ceftazidime	CAZ	HIMEDIA+ CYPRESS	30µg	26	21
Céfotaxime	CTX	HIMEDIA+ CYPRESS	30µg	26	23
Aztréonam	ATM	HIMEDIA+ CYPRESS	30µg	27	21
Méropénème	MEM	BIORAD	10µg	22	15
Ertapénème	ERT	BIORAD	10µg	28	26



## Résumé

**Objectif :** La dissémination mondiale de bactéries multirésistantes représente une menace de santé publique majeure dans l'environnement hospitalier. Le but de cette étude était de rechercher des bactéries productrices de BLSE, de carbapénèmases et aussi des ERV dans l'environnement hospitalier, isolées chez les insectes au niveau de l'hôpital de Bejaia et d'Alger.

**Méthode :** Un total de 162 échantillons ont été collectés. Après isolement et identification, les phénotypes de résistance aux antibiotiques ont été déterminés par l'utilisation des tests phénotypiques incluant le DD-test, test à la cloxacilline et le test MCIM. La détermination de la sensibilité des souches d'entérocoques vis-à-vis de la vancomycine est réalisée par la méthode de diffusion sur gélose MH puis l'identification par une série de tests classiques.

**Résultats :** Sur un total des 56 souches isolées, la production probable des BLSE était déterminée chez 22 souches isolées chez les insectes de type moustique et 1 fourmi. La résistance aux C3G par la production des AmpC plasmidique était détectée chez 3 souches isolées chez les moustiques et 1 drosophile. Le test MCIM a montré un résultat positif pour 9 souches isolées chez les moustiques et 1 drosophile. La résistance vis-à-vis de la vancomycine des entérocoques, était déterminée chez 6 souches *Enterococcus faecalis* isolées chez les moustiques et 4 souche d'*Enterococcus* isolées chez des moustiques et une fourmi.

**Conclusion :** Les insectes peuvent être considérés comme des vecteurs importants à la diffusion généralisée des gènes de résistance aux antibiotiques, vu leur contacts direct et constant avec l'homme, et représentent un réservoir considérable des souches résistantes aux antibiotiques.

**Mots-clés :** Résistance aux antibiotiques, Bacilles à Gram négatif, Entérocoques, milieux hospitalier, Insecte.

## Abstract

**Background:** The global spread of multidrug-resistant bacteria represents a major public health threat in the hospital environment. The aim of this study was to search for ESBL producing *Enterobacteriaceae*, carbapenemases and also VRE in the hospital environment, isolated from insects at Bejaia hospital and Algiers.

**Method:** A total of 162 samples were collected. After isolation and identification, antibiotic resistance phenotypes were determined by the use of phenotypic assays including DD-test, cloxacillin test and MCIM test. Susceptibility of enterococci strains to vancomycin is carried out by the MH agar diffusion method and then by a series of standard tests.

**Results:** Of the 56 isolated strains, the probable ESBL production was determined in 22 strains isolated from mosquito-like insects and 1 ant. Plasmid AmpC production was detected in 3 strains isolated in mosquito and 1 *Drosophila*. The MCIM test showed a positive result for 9 isolated strains in a mosquito and 1 *Drosophila*. Vancomycin resistance in enterococci was determined in 6 strains *Enterococcus faecalis* isolated from mosquitoes and 4 strains of *Enterococcus* isolated from mosquitoes and ant.

**Conclusion:** Insects can be considered as important vectors for the widespread spread of antibiotic resistance genes, given their direct and constant contact with humans, and represent a considerable reservoir of antibiotic-resistant strains.

**Keywords:** Antibiotic resistance, Gram-negative bacilli, Enterococci, hospital environments, Insect.