

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Centre Universitaire de Mila

Institut des Sciences et de la Technologie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

N° d'ordre :

Série :



Spécialité : Biochimie

Mini-Projet

Thème :

Isolement et identification de *Staphylococcus aureus* et antibiorésistance

Présenté par :

BOUSBAA Nardjiss
OMAROUAYACHE Wafa
BOUNAMOUS Yamina

Promoteur :

BOUBENDIR Abdlhafid

Année Universitaire : 2011/2012

Remerciements

Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements à notre DIEU qui nous a donnés le courage et la volonté d'achever ce travail.

Nous voudrions remercier Monsieur Boubendir Abdlhafid directeur de notre recherche au Universitaire de Mila, pour avoir accepté de nous encadrer et pour ses conseils très importants durant toute la période de cette recherche.

Nos sentiments de reconnaissances et nos remerciements vont également à tous nos enseignants du département des sciences de la nature et de la vie pour leurs patience et leurs aides, et à toutes les personnes qui de près ou de loinnous ont aidé, conseillé et encouragé notamment.

Wafa, Nardjis, Yamina

Liste des abréviations

AAF : Aérobie Anaérobie Facultatif

a_w: activity Water

CAT: Catalase

DNase : désoxyribonucléase

MAN : mannose

OAG: Coagulase

OX: Oxydase

PA: Protéine A

PYRA : pyrrolidonyl arylamidase

R: Résistant

SARM: *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

SCN: *Staphylocoques* à Coagulase négative

S: Sensible

VP : réaction de vogues prosateur

Liste des figures

Figure 01 : Utilisation des antibiotiques et acquisition des résistances par *S. aureus*

Figure 02 : L'évolution du pourcentage de la résistance à la méthicilline de *S. aureus*

Figure 03: Protocole de recherche de *Staphylococcus* dans les produits pathologiques

Figure 04 : Résultats des cultures

Photo 01 : Aspect des colonies de *S. aureus* sur milieu Chapman

Photo 02 : Mise en évidence de la coagulase libre chez les *Staphylocoques*

Photo 03 : Souches de *S. aureus* résistante à la piperacilline

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification phylogénique des *S. aureus*

Tableau 02 : Caractères généraux des *S. aureus*

Tableau 03 : Caractères distinctifs de *S. aureus*

Tableau 04 : Caractère physiologique de *S. aureus*

Tableau 05 : Caractères enzymatiques et biochimiques

Tableau 06 : Principe facteurs de virulence des *S. aureus*

Tableau 07 : Caractères culturels

Tableau 08 : Répartition du prélèvement selon leur nature

Tableau 09 : Répartition des prélèvements et leur pourcentage

Tableau 10 : Fréquence globale de *Staphylococcus spp*

Tableau 11 : Fréquence d'isolement de *S. aureus*

Tableau 12 : Fréquence de la résistance et de la sensibilité aux antibiotiques

Tableau 13 : L'antibiorésistance de *S. aureus*

Table des matières

Introduction.....	1
PARTIE I : Recherche bibliographique	
1. Caractères généraux des <i>Staphylococcus aureus</i>.....	3
2. Caractères physiologiques.....	4
3. Caractères biochimiques.....	6
4. Caractères moléculaires.....	6
4.1. Facteurs de virulence	6
4.2. Antibiorésistance.....	8
4.3. Evolution de la résistance à la méthicilline.....	9
5. Isolement et Culture.....	10
5.1. Culture.....	10
5.2. Isolement.....	11
PARTIE II : Etude expérimentale	
1. Matériel et méthodes.....	12
1.1. Matériel.....	12
1.2. Méthodes.....	12
1.2.1. Nature du prélèvement.....	12
1.2.1.1. Liquide Céphalo-rachidien.....	12
1.2.1.2. Pus et sérosités.....	12
1.2.2. Milieux de culture et d'isolement	14
1.2.2.1. Milieux d'isolement.....	14
1.2.2.2. Milieux d'enrichissement.....	14
1.2.3. Caractéristiques des colonies.....	15
1.2.3.1. Aspect macroscopique.....	15
1.2.3.2. Aspect microscopique.....	15
1.2.4. Purification et conservation des souches isolées.....	16
1.2.5. Identification biochimique.....	16
1.2.6. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques.....	18
1.2.6.1. Technique de l'antibiogramme.....	18
1.2.6.2. Les antibiotiques testés.....	12
1.2.6.3. Application des disques d'antibiotiques.....	18
2. Résultats et discussion.....	20

2.1. Prélèvement.....	20
2.2. Culture et isolement.....	20
2.3. Taux d'isolement de <i>Staphylococcus spp</i>.....	21
2.4. Identification de l'espece <i>S. aureus</i>	22
2.5. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques	23
2.6. Historique de l'antibiorésistance de <i>S.aureus</i> (2010-2012).....	25
Conclusion et perspectives.....	30
Bibliographie.....	31
Annexe	

Introduction

L'émergence de souches de *Staphylococcus aureus* multirésistantes aux antibiotiques représente un problème majeur dans les milieux hospitaliers (Mari, 2011).

Les infections à *S. aureus* sont très polymorphes, allant d'atteintes cutanées bénignes comme les furoncles ou les panaris à des pathologies mettant en jeu le pronostic vital comme les septicémies, les endocardites, les pneumopathies et les infections du système nerveux central. C'est l'un des principaux agents étiologiques des infections suppuratives superficielles et profondes ainsi que des syndromes liés à l'action des toxines (Corne, 2004).

Il existe présentement un grand besoin de trouver une solution efficace pour combattre la bactérie *S. aureus*, et jusqu'à maintenant le traitement des infections est devenu de plus en plus difficile en raison de la prévalence élevée des souches résistantes à la méthicilline et le développement de l'émergence de souches multirésistantes aux différentes familles d'antibiotiques.

Pour toutes ces raisons, cette bactérie est considérablement étudiée de nos jours et dans tous les domaines scientifiques: biologie moléculaire, biologie cellulaire, phylogénie, génétique évolutive, etc. Cependant, en raison de son expansion continue, en particulier dans les milieux hospitaliers, chaque étude d'épidémiologie analysant une situation particulière permet non seulement de suivre et de comprendre son évolution, mais également de définir des stratégies de lutte au niveau d'un hôpital ou d'un pays.

Cette situation nous a amené à étudier l'état actuel de ce microorganisme étant donné qu'en Algérie, peu de publications ont été réalisées concernant son étude.

Le point de départ de ce travail était de réaliser une analyse phénotypique d'un échantillon de souches de *S. aureus* isolées de différents produits pathologiques pendant une période de 1 mois dans le laboratoire de microbiologie au l'hôpital des frères Meghlawa de Mila, et ensuite, nous avons étudié pour l'analyse aux antibiotiques par la technique de l'antibiogramme.

Les objectifs de notre travail sont :

- L'isolement
- L'identification
- L'antibiogramme

PARTIE I:
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Caractères généraux des *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est un germe commensal de la peau, de la muqueuse, de l'homme, et des animaux à sang chaud, cependant éliminé dans le milieu extérieur. Cette bactérie très résistante est fréquemment retrouvée dans l'environnement. Elle est responsable d'infection suppurative superficielle, et profonde ainsi que de syndromes liés à l'action de toxines (Débarras, 1998; Grosjeau, 2011).

S. aureus est le pathogène, le plus virulent du genre *Staphylococcus*, et constitue une cause majeure de mortalité (Prescott et al., 2003; Madigon et al., 2007).

On a la classification de *S. aureus* dans le **tableau 01**.

Tableau 01 : Classification phylogénique des *S. aureus* (Prescott et al., 2003; Delarras, 2007; Grosjeau et al., 2011)

Domain :	Bactérie ou Eubactérie
Phylum XIII :	<i>Firmicutes</i>
Classe :	<i>Bacilli</i>
Ordre :	<i>Bacillales</i>
Familles :	<i>Staphylococcaceae</i>
Genre :	<i>Staphylococcus</i>
Espèce :	<i>Staphylococcus aureus</i>

Les souches de *S. aureus* possèdent tous les caractères généraux, du genre *Staphylococcus*. Ce sont des Coques à gram positif, immobiles, non sporulés, parfois encapsulés (La majorité des souches sont capsulées mais perdent leur capsule par culture), d'un diamètre de 0,8 à 1 µm, se présentent de manière isolée ou groupées en diplocoques ou en amas irréguliers, Aéro-anaérobie facultatif, catalase +, oxydase -. Elles sont présentées dans le **tableau 02** (Singleton, 2004; Guy et al., 2007; Aitabelouahab, 2008; Frany-Xavier et al., 2010; Karp, 2010; Prescott et al., 2010).

PARTIE I : Recherche bibliographique

Tableau 02 : Caractères généraux des *S. aureus* (Delarras, et *al.*,2010; Berthet, 2006; Delarras, 2007; Grosjeau et *al.*, 2011)

Aspect Gram	Capsule ou spore	Mobilité	Gram	OX	CAT	Type respiratoire
Coques en amas (Cocci sphérique)	-	-	+	-	+	AAF

S. aureus est identifié par l'aspect pigmenté des colonies, la positivité des testes de : COAG, thermonucléase et de l'agglutination dans le **tableau 03** (Delarras, 1998; Larpent, 2000; Dellaras, 2010; Grosjeau et *al.*, 2011).

Tableau 03 : Caractères distinctifs de *S. aureus* (Delarras, 2007)

	<i>S. aureus</i>	D'autre espèce de <i>Staphylococcus</i>
Aspects des colonies	Pigment doré	Blanches
Test coagulas libre	+	-
Test termonucléase	+	-
Milieu de Chapman	Acidification du mannitol (jaune)	Pas d'acidification du mannitol (rouge) sauf <i>S. épidermids</i> .

S. aureus se cultive facilement sur la gélose ordinaire, sur le milieu solide, les colonies sont lisses, luisantes et bombées plus ou moins pigmentée en jaunes. Il produit dans le bouillon un trouble homogène (Prescott et *al.*, 2003; Bouguessa, 2008).

S. aureus est capable de transformer de nombreux substrats notamment les sucres ce qui n'a guère d'intérêt pratique sauf ce qui concerne le mannitol que *S. aureus* peut fermenter contrairement à la plus part des SCN (Prescott et *al.*, 2003; Delarras et *al.*, 2010).

2. Caractères physiologiques

S. aureus n'a pas d'exigences particulières si les conditions idéales de croissance sont une température de 37°C, et un pH de 7 de grande variation sont tolérées (Larpent, 2000; Prescott et *al.*, 2003; Delarras, 2007; Delarras et *al.*, 2010).

PARTIE I : Recherche bibliographique

La gamme de température pour la croissance de *S. aureus* s'étend entre 7 et 46°C et sa production d'entérotoxines serait possible entre 10 et 45°C, la croissance de *S. aureus* et sa production d'entérotoxines sont complètement inhibées à une température inférieure à 7°C, *S. aureus* survit à une température proche du 20°C dans un milieu à pH neutre (Prescott et al., 2003; Delarras, 2007; Delarras et al., 2010).

Les *S. aureus* peuvent croître à des valeurs de pH comprises entre 4,2 et 9,3 dépend des conditions d'aérobiose : elle est de pH=4 en aérobiose et 4,6 en anaérobiose dans un milieu laboratoire, l'effet du pH sur la croissance de *S. aureus* est liée à plusieurs facteurs d'environnement aux et aussi au type d'acide utilisé pour ajustée à des valeurs de pH inférieures à 5,3, elle est maximale aux valeurs de pH comprises entre 6,5 et 7 dans des milieux de laboratoire, *S. aureus* est une bactérie halotolérante (Larpen, 2000; Delarras et al., 2010).

Il se multiplie dans des milieux contenant une forte concentration de NaCl 6,5%. Il peut survivre avec 20% de NaCl en bouillon de culture les entérotoxines *Staphylococcus* ne sont pas produits à des concentrations de NaCl supérieures à 18%, la croissance de *S. aureus* et la production d'entérotoxine sont totalement inhibées à 2,4% de NaCl, des fortes concentrations en sel modifient la composition en acide gras de la membrane produisant un changement dans la perméabilité de la membrane (Prescott et al., 2010; Delarras et al., 2007).

L'activité de l'eau conditionne ainsi la croissance de *S. aureus* et son osmotolérance, en condition aérobie, l' a_w minimum pour la croissance de *S. aureus* se situe à 0,83 tandis qu'en anaérobiose, elle se situe à 0,9, une diminution de l' a_w entraîne une diminution de la quantité et des entérotoxines produites. *S. aureus* réagit à l'abaissement de l' a_w en accumulant dans la cellule des concentrations élevées de solutés tels que la proline, la taurine et la glycine. L'accumulation de ces solutés dépend du type d'humectant utilisé pour faire varier l' a_w (Prescott et al., 2003; Prescott et al., 2010).

PARTIE I : Recherche bibliographique

Le résumé de caractère physiologique dans le **tableau 04**.

Tableau 04 : Caractères physiologiques de *S. aureus* (Sitti, 2001)

3.

Facteur	Croissance	Production d'entérotoxines
Températures	7-46°C	10-45°C
Température optimale	37°C	40°C
pH	4.2-9.3	5-8
pH optimale	6-7	6.5-7 (stable)
[NaCl]	0-20%	0-10%
[NaCl] optimale	0%	0%
a_w	0.83-> 0.99	0.89-> 0.99
a_w optimale	> 0.99	> 0.99

Caractères biochimiques

S. aureus a un métabolisme aérobie prédominant facultatif. Il est catalase positive à la différence des bactéries du genre *Streptococcus* qui n'ont pas de métabolisme aérobie. Il est toutefois capable de fermenter le glucose (métabolisme anaérobie) à la différence des microcoques. Il est habituellement capable de fermenter le Mannitol, ce caractère est souvent mais pas obligatoirement associé à la pathogénicité. Il est utilisé dans le milieu de Chapman. La fermentation se traduit par le virage au jaune du milieu de culture (**Tableau 05**) (Anonyme, 2003).

Tableau 05 : Caractères enzymatiques et biochimiques (Larpent, 2000; Grojeau, 2011)

OX	CAT	Furanes	COAC libre	DNASE	COAC liée	Polymyxine	MAN	PYRA	VP
-	+	S	+	+	+	R	+	-	+

4. Caractères moléculaires

4.1. Facteurs de virulence

La virulence de *S. aureus* est due à la sécrétion de multiples toxines et enzymes qui contribuent déversément à l'expression du pouvoir pathogène (**Tableau 06**) (Prescott et al., 2003; Madigon, 2007).

PARTIE I : Recherche bibliographique

Tableau 06 : Principe facteurs de virulence des *S. aureus* (Kenneth et *al.*, 2004; Stephen, 2005; Alomar, 2007)

Facteurs de virulence	Propriétés - Fonction
Toxines	
Hémolysines α , β , γ , δ	Action sur la membrane cellulaire. Effet cytotoxique et/ou cytolytique.
Leucocidine panton-valentin	Action lytique sur les leucocytes induction de nécrose cellulaire.
Exfoliative A et B	Epidermolyse, activité mitogène sur les lymphocytes T, responsables de <i>Staphylococcies</i> cutanées butinées bulleuses.
Toxine du syndrome de choc toxique (TSST)	Activité super antigénique responsable du syndrome du choc toxique.
Entérotoxines A-E (SEA-SEE)*	Activité superantigénique et émétique impliqués dans les intoxications alimentaires.
Enzymes	
Coagulas libre	Coagulation du plasma,rôle protecteur contre la phagocytose.
Fatty Acid Modify enzyme (FAME)	Estérification des acides gras
Lipase /estérase	Hydrolyse des lipides, rôle nutritionnel.
Staphylokinase	Active la plasminogène en plasmine et provoque la lyse de la fibrine.
Nucléase	5`- phosphodistérase exo et endonucléasique active, sur les acide nucléique, rôle nutritionnel.
Hyaluronidase	Lyse des tissus conjonctifs tissulaire de <i>S. aureus</i> .
PI. phospholipase C	Activité lipasique
Staphopaine	Cystéine protéase
Cystéine potasse	Activité protéinique
Composés de surface	
Protéine A	Fixe le Fragment Fc des immunoglobulines, résistance à la phagocytose.
Fibronectin binding A et B	Liaison à la Fibronectine adhésion et Colonisation.
Protéine de liaison au Fibrinogène	Fixation au Fibrinogène adhésion colonisation.
Protéine de liaison au collagène	Fixation à la collagène colonisation
Capsule polysaccharide type 5 et 8	Lutte contre phagocytose

*Les entérotoxines sont détaillées dans le **Tableau 06.**

4.2. Antibiorésistance

Les souches de *S. aureus* sont résistantes à la pénicilline G, de fait de la production d'une pénicillinase un pourcentage important de souches résistant à autres antibiotiques tels que tétracycline (20–80%), érythromycine, lincomycine et aminosides. Ces résistances sont plasmidiques, par sécrétion d'enzymes inactivant les antibiotiques (Prescott et *al.*, 2003; Prescott et *al.*, 2010).

Le plasmide porteur plusieurs gènes de résistance (plasmide R), contient trois classes de nouveaux ilots de pathogénicité :

- ❖ Un ilot de toxine de la famille du toxicshock syndrome.
- ❖ Des ilots d'exotoxines.
- ❖ Des ilots d'entéotoxines.

Un antibiotique type de résistance d'origine chromosomique, et transmissible à été décrit, liée à la modification de la cible d'action de l'antibiotique. C'est le cas de résistance à la méthicilline, (20 à 40% des souches de *S. aureus*), qui entraîne une réaction croisée avec toute les pénicillines, et les céphalosporines (Berche et *al.*, 2003).

S. aureus a développé des résistances quasiment à tous les antibiotiques mis sur le marché dont les classes d'antiStaphylococciques majeurs (**Figure 01**).

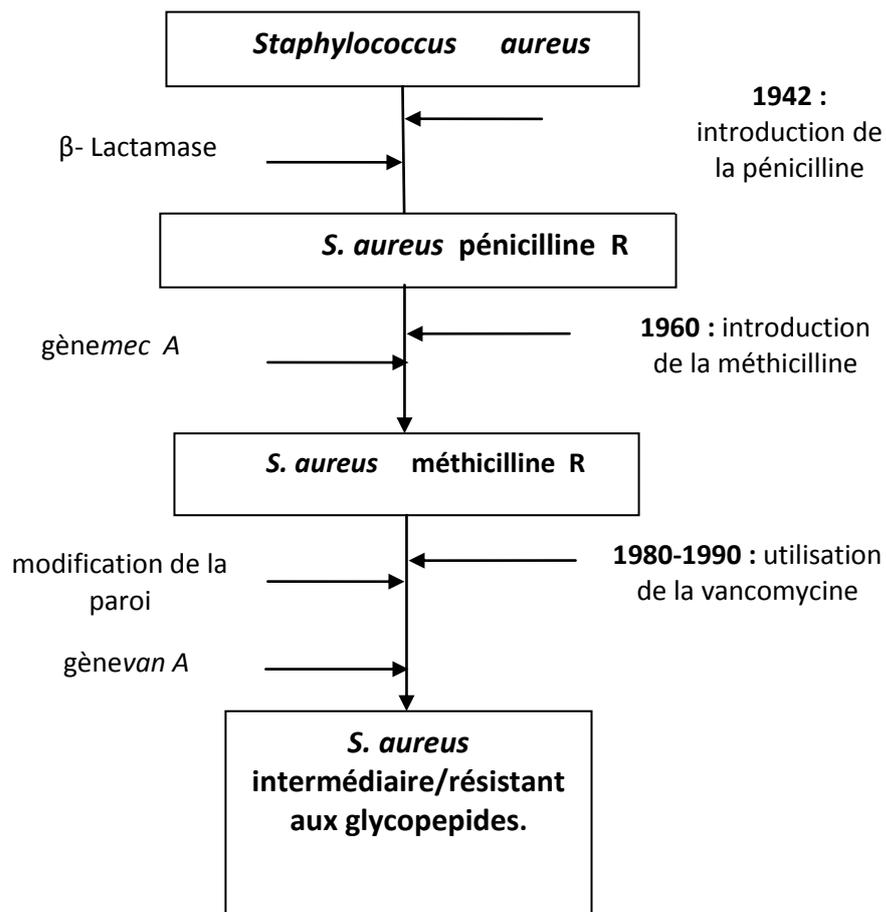


Figure 01 : Utilisation des antibiotiques et acquisition des résistances par *S. aureus* (Corne, 2004)

4.3. Evolution de la résistance à la méthicilline

La figure présente l'évolution du pourcentage de la résistance à la méthicilline de *S. aureus*, depuis 1989 jusqu' à 2001 (Madigron, 2007).

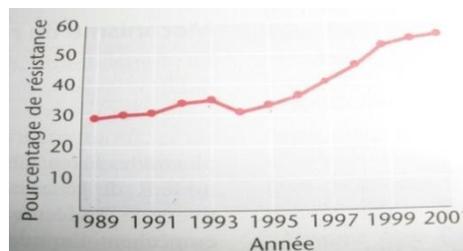


Figure 02 : L'évolution du pourcentage de la résistance à la méthicilline de *S. aureus* (Madigron, 2007)

PARTIE I : Recherche bibliographique

C'est le cas d'infection nosocomiale due à des *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline rencontrés dans des unités de soins intensifs de 1989 à 2001. Données du Nationale Nosocomial Infections Surveillance (NNIS), des centres de contrôle et de prévention des maladies (CDC, Centres For Disease Control and Prevention), Atlanta, Géorgie, Etats-Unis.

La figure montre que, sur une période de treize ans, un doublement de la résistance à la méthicilline a été observé. Puisque les isolats de *S. aureus* peuvent être résistants à un certain nombre d'autres molécules les souches de *S. aureus* résistantes au couple oxacilline méthicilline (MRSA) limitant le choix des molécules thérapeutiques efficaces (Madigon et al., 2007).

5. Isolement et Culture

5.1. Culture

Comme tous les germes très répandus dans la nature, *S. aureus* se cultive facilement sur les milieux usuels à des conditions de pH et de température variables. Il est même capable de pousser dans des conditions hostiles, par exemple en présence de 7% de NaCl. Ce caractère est mis à profit dans le milieu de culture sélectif hyper salé de CHAPMAN (**Tableau 07**) (Prescott et al., 2003).

Tableau 07 : Caractères culturels (Grosjean et al., 2011)

Type respiratoire	Géloses permettant la croissance	Aspect des colonies
Aéro-Anaérobie	Géloses nutritive Au sang A l'acide nalidixique Géloses de Chapman	Colonies souvent Hémolytiques Pigment jaune Orange, Mannitol +

5.2. Isolement

Pour isoler le *Staphylococcus* d'un prélèvement polymicrobien (Prescott et *al.*, 2003; Delarras, 2007; Anonyme, 2003).

❖ En bouillon :

S. aureus donne un trouble uniforme en quelques heures.

❖ Sur gélose ordinaire :

Les colonies sont lisses, rondes, bombées, brillante, opaques de 1 mm de diamètre.

Elles se pigmentent habituellement en jaune doré, Parfois en jaune citron, et parfois sont non pigmentées.

❖ En géloses profonde :

S. aureus pousse dans la zone d'aérobiose et dans la zone d'anaérobiose, c'est donc une bactérie AAF, capable de se multiplier, à la surface de la peau, en aérobiose dans les tissus mal oxygénés, plaie profonde par exemple (Anonyme, 2003; Prescott, 2003; Delarras, 2007).

PARTIE II:

ETUDE EXPERIMENTALE

1. Matériel et méthodes

Durant la période s'étalant du 15 Mars au 21 Avril, 33 prélèvements ont été analysés, provenant de sujets hospitalisés dans différents services de l'Hôpital des frères Maghlawa de Mila et de sujets non hospitalisés venus en consultation externe.

1.1. Matériel

Le matériel utilisé dans notre travail :

- ❖ Matériel de prélèvement : aiguille, seringue et écouvillon.
- ❖ Etuves d'incubation.
- ❖ Autoclaves.
- ❖ Milieux de culture : Gélose au Sang Cuit, Gélose Nutritive, Gélose Chapman, Muller Hinton.
- ❖ Verrerie.
- ❖ Bec Bunsen, Microscope (OPTIKA).

1.2. Méthodes

1.2.1. Nature du prélèvement

1.2.1.1. Liquide Céphalo-rachidien

Dans des conditions très rigoureuses d'asepsie, le liquide est prélevé au niveau lombaire, entre les espaces vertébraux L4-L5 ou L5 et S1, à l'aide d'une aiguille à ponction lombaire (PL) et recueilli dans des tubes stériles accompagnés d'un minimum de renseignements cliniques (en particulier l'âge, le diagnostic présumé, les traitements antibiotiques antérieurement reçus par le malade). La quantité moyenne collectée par écoulement en goutte du LCR suffisante pour la majorité des examens à réaliser est de 3ml.

1.2.1.2. Pus et sérosités

Le prélèvement de pus est effectué par écouvillonnage pour les infections superficielles et par ponction à l'aide d'une seringue pour les infections profondes, il doit porter exclusivement sur le pus et éviter toute contamination.

PARTIE II : Etude expérimentale

Ce produit pathologique étant souvent polymicrobien et est lui-même un excellent milieu de culture.

Le protocole de recherche de *Staphylococcus* dans les produits pathologiques est présenté dans la **figure 03**.

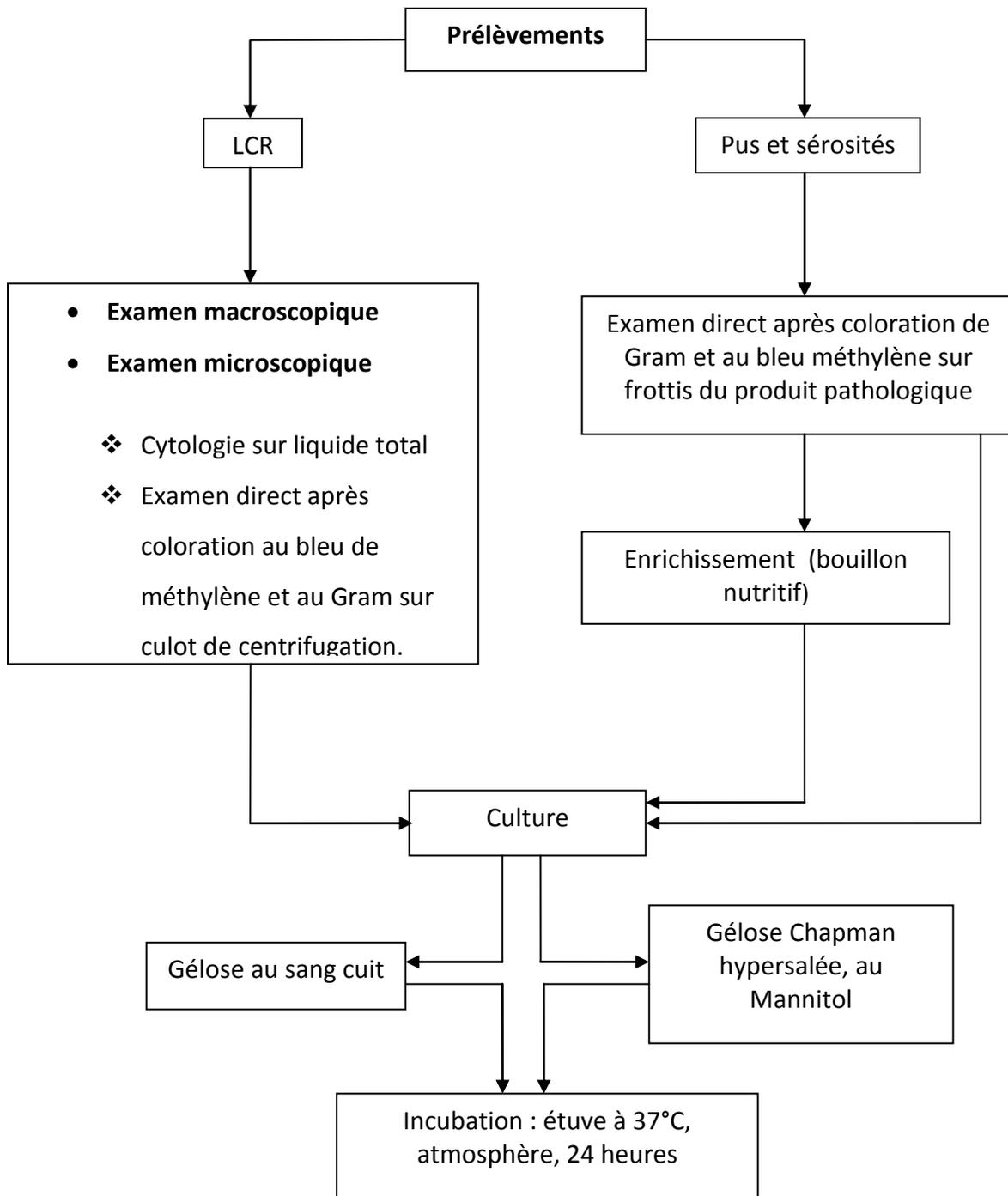


Figure 03: Protocole de recherche de *Staphylococcus* dans les produits pathologiques

1.2.2. Milieux de culture et d'isolement

Dans un but d'isoler les *Staphylocoques*, chaque échantillon est cultivé sur le milieu gélose hypersalée au Mannitol (Chapman) et le milieu gélose au sang cuit.

De plus, un bouillon d'enrichissement est ensemencé. Tous les milieux ensemencés sont incubés à 37°C.

Il faut noter qu'en plus de ces milieux, la gélose nutritive peut servir également à la culture du *Staphylocoque*, utilisée dont le but de la purification.

La composition et le mode de préparation des milieux qui ont servi à notre étude sont rapportés en détail dans l'**Annexe 01**.

1.2.2.1. Milieux d'isolement

❖ Isolement direct

L'isolement direct est pratiqué sur le milieu sélectif (Chapman) et sur le milieu riche (GSC). A l'aide d'une anse de platine ou d'une pipette Pasteur on prélève une portion (pus) ou une quantité (liquide) du prélèvement que nous ensemençons par épuisement sur gélose en boîte de Pétri, de façon à obtenir des colonies bien isolées après une incubation à 37°C pendant 24 heures. L'incubation pour le milieu d'enrichissement peut être faite pendant 24 heures et plus lorsque cela est nécessaire.

❖ Isolement après enrichissement

A partir du tube contenant le bouillon nutritif, un échantillon du prélèvement est ensemencé sur le milieu d'isolement. L'incubation est faite à 37°C pendant 18 à 24 heures.

1.2.2.2. Milieux d'enrichissement « Infusion cœur-cervele »

L'infusion cœur-cervele est un milieu liquide, suffisamment riche pour permettre la culture d'un maximum d'espèces microbiennes. Un échantillon du prélèvement est introduit dans 5 ml de bouillon nutritif (cœur-cervele), Il permet après une incubation à 37°C pendant 24 heures d'obtenir une multiplication des micro-organismes (même si initialement dans le prélèvement ils sont en faible nombre).

1.2.3. Caractéristiques des colonies

1.2.3.1. Aspect macroscopique

❖ Milieu de Chapman

Sur le milieu de Chapman, les colonies sont souvent pigmentées et entourées d'une aréole jaune, la plupart des souches de *S. aureus* fermentent le Mannitol et font virer le milieu du rouge au jaune orangé.

❖ Gélose Nutritive (GN)

Sur gélose nutritive, en 24 heures, les colonies sont lisses, les souches *S. aureus* produisant en général un pigment jaune.

❖ Gélose au Sang Cuit (GSC)

Sur gélose au sang cuit, en 24 heures, les colonies sont circulaires, volumineuses, opaques éventuellement pigmentées et de couleur jaune doré et légèrement bombées ou aplaties, elles présentent une surface luisante et humide. Les colonies produites sur GSC sont de plus grand diamètre que celui des colonies produites sur GN.

1.2.3.2. Aspect microscopique

❖ Coloration de Gram

La coloration de Gram est effectuée à partir des colonies cultivées sur gélose au sang cuit présentant l'aspect caractéristique du *Staphylocoque*. Aussi, elle peut être réalisée à partir du milieu Chapman, pour confirmer la présence de Cocci en diplocoque et en grappes de raisin (Gueylan, 2010).

➤ Méthode de la coloration de Gram

Les réactifs utilisés sont présentés dans l'**annexe 02**.

- Préparer la lame et les échantillons bactériens à examiner, issus d'une culture de *S. aureus*.

- L'étalement doit se faire en couche mince et régulière avec une pipette Pasteur, sur une lame propre dégraissée.

PARTIE II : Etude expérimentale

- Laisser sécher à l'air libre, ou approcher la lame à 15-20 cm au-dessus de la flamme du bec bunsen. Le frottis doit devenir terne mais ne doit ni brunir, ni brûler.

- L'étape de fixation qui suit, consiste à tuer les bactéries, à rendre les membranes plus perméables, à fixer les structures sans trop insister sous peine de carboniser le frottis ; sinon tenir la lame avec une pince et écraser trois fois la flamme avec la lame, le frottis est prêt à subir une coloration.

- Couvrir la lame de violet de gentiane et laisser agir 2 min. Jeter l'excès de colorant.

- Egoutter sans rincer et faire deux bains de lugol dont chacun dure 45 secondes.

- Egoutter et plonger la lame dans l'alcool 96°C durant 30 secondes exactement. La décoloration trop forte comme la décoloration trop faible étant des sources d'erreurs.

- Arrêter la différenciation par un lavage doux et abondant à l'eau distillée.

- Recolorer les germes décolorés par le différenciateur, en faisant agir sur la préparation un colorant de contraste, la fuchsine ou la safranine filtrée pendant 2 minutes.

- Laver à l'eau distillée et sécher la lame au-dessus de la flamme.

- Observer à l'objectif à immersion et dessiner les bactéries se trouvant dans un champ microscopique moins riche, dans la périphérie de la préparation (Guezlane-Tebibal, 2010).

1.2.4. Purification et conservation des souches isolées

Après la période d'incubation, les colonies sont ensemencées, sur les milieux adéquats (GN ou milieu de Chapman), selon leurs caractéristiques macroscopiques et microscopiques, celles qui présentent un aspect caractéristique à celui des *Staphylocoques* sont rissolées à l'aide d'une pipette Pasteur, et sont ensemencées en stries selon la méthode des quatre cadrant de telle manière à obtenir des colonies bien isolées. Une coloration de Gram est refaite chaque fois pour contrôler la pureté des souches. La conservation est réalisée sur gélose de conservation (**Annexe 01**) (Aouati, 2009).

1.2.5. Identification biochimique

En plus des caractères morphologiques, l'identification est aussi effectuée sur la base de quelques caractères biochimiques.

❖ Catalase

Ce test permet de différencier les *Staphylocoques* des *Streptocoques*.

Une petite quantité de culture bactérienne est prélevée du haut des colonies à l'aide d'une pipette Pasteur à partir de la gélose au sang cuit, les colonies sont prélevées soigneusement, en évitant les érythrocytes qui présentent une catalase positif (sur milieu contenant le sang), puis placée sur une lame, et à l'aide d'une pipette Pasteur sont ajoutées quelque gouttes du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Une réaction positive se traduit par le dégagement de bulles de gaz (oxygène).

Ce test, peut être réalisé en tube contenant 0,5 ml de H_2O_2 . A l'aide d'une pipette Pasteur des colonies sont prélevées et introduites dans le tube. Le résultat est identique à celui obtenu lors du test sur lame.

❖ Staphylocoagulase

Le plasma de lapin lyophilisé est utilisé pour la détection de la coagulase libre produite par *S. aureus* (**Annexe 02**).

La production de la coagulase libre par *S. aureus* provoque une coagulation du plasma qui se traduit par la formation d'un caillot de coagulation.

A partir d'une culture pure de 18 heures de la souche à étudier, nous réalisons une subculture en bouillon nutritif (cœur-cervelle).

Dans un tube à hémolyse contenant 0,5 ml de plasma sont introduit 0,5 ml de la suspension bactérienne déjà préparée, puis on incube à 37°C pendant 1 à 2 heures voire 24 heures. Un témoin négatif est préparé en mélangeant le bouillon nutritif au plasma du lapin. Ces témoins ne sont pas ensemencés (Delarras, 2010).

La prise en masse recherchée par inclinaison du tube est observée au point que le tube peut être retourné. Un caillot moins compact, visible avant la 24^{ème} heures doit être

considéré comme positif, car il peut être suivi de redissolution provoquée par la fibrinolysine entraînant une fausse réaction négatif (Delarras, 2010).

La souche de contrôle est l'espèce: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Aouati, 2009).

1.2.6. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme est effectué selon la méthode classique de diffusion de l'antibiotique sur gélose à partir de disques d'antibiotiques selon les recommandations du National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) (Monteil H, 1996).

1.2.6.1. Technique de l'antibiogramme

Un inoculum est préparé à partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement (gélose nutritive, Chapman). Quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont raclées à l'aide d'une anse de platine, déchargée dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.

Le milieu Mueller-Hinton (MH) (**Annexe 01**), coulé en boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre sur une épaisseur de 4 mm est utilisé, l'enrichissement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum.

Un écouvillon stérile est trempé dans la suspension bactérienne, essoré en le pressant fermement sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum, puis frotté sur la totalité de la surface gélosée sèche, de haut en bas, en stries serrées.

L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'une boîte de Pétri est ensemencée.

1.2.6.2. Les antibiotiques testés

Pour l'étude de la sensibilité du *S .aureus* aux antibiotiques, dix antibiotiques connus pour être actifs sur cette bactérie sont testés.

1.2.6.3. Application des disques d'antibiotiques

Six disques d'antibiotiques sont appliqués par boîte, ils sont espacés de 24 mm, centre à centre.

Chaque disque d'antibiotique est appliqué à l'aide d'une pince stérile ou à l'aide d'un distributeur. Une fois appliqué, le disque ne doit pas déplacé.

Les boîtes sont, ensuite, incubées immédiatement pendant 18 heures en atmosphère ordinaire à 37°C.

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse.

Les résultats sont comparés aux valeurs critiques figurant dans la table de lecture, puis la bactérie est classée dans l'une des catégories: sensible, intermédiaire ou résistante.

La souche de contrôle de qualité est *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 traitée dans les mêmes conditions que la souche à tester. Ce contrôle valide le résultat du test et permet de contrôler les disques d'antibiotiques et la qualité du milieu Mueller-Hinton.

2. Résultats et discussion

2.1. Prélèvement

Au cours de la période d'étude s'étalant du 15 Mars au 21 Avril 2012, 33 prélèvements ont été analysés au laboratoire de microbiologie de l'hôpital des frères Maghlawa de Mila. Il s'agit de pus et sérosité, et de ponction comme le montre le **tableau 08**.

Tableau 08 : Répartition du prélèvement selon leur nature

Type de prélèvement	Nombre de prélèvement	Pourcentage
LCR	16	48,48%
Pus et sérosité	17	51,51%
Total	33	100%

Les examens les plus demandés sont le LCR (48,48%) dont 16 demandes les pus et sérosité arrivent en 2^{ème} position avec plus de 51,51%.

2.2. Culture et isolement

Les résultats des cultures des 33 prélèvements sont présentés sur le **tableau 09**.

Tableau 09 : Répartition des prélèvements selon leur culture

Culture	Nombre	Pourcentage
Positive	20	60,60%
Négative	11	33,33%
Contaminée	2	6,01%
Total	33	100%

Sur 33 prélèvement analysés, 20 se sont positifs (développement bactérien). Soit un taux de 60,60 % alors que 33,33% sont négatifs, nous considérons comme positif les prélèvements qui, après culture sur les différents milieux utilisés montrent un développement bactérien ce taux de positivité est assez-élevé, mais il faut noter que l'interprétation des résultats est parfois difficiles.

PARTIE II : Etude expérimentale

Nous constatons aussi, que 2 prélèvements se sont révélés contaminés (6,01%) (Un prélèvement est déclaré contaminer si nous isolons 03 germes et plus). Cette contamination peut avoir 02 origines ; soit au niveau du patient donc au cours du prélèvement lui-même, soit au laboratoire au cours du traitement.

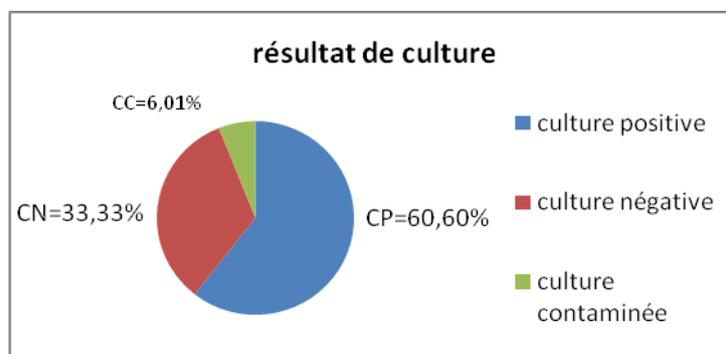


Figure 04 : Résultats des cultures

2.3. Taux d'isolement de *Staphylococcus spp*

A partir des cultures positives sur les deux milieux de culture (Chapman, gélose au sang cuit). Les colonies présentant l'aspect macroscopiques caractéristique du genre *Staphylococcus* ont été prélevées. Sur le milieu du Chapman les colonies de *Staphylococcus* apparaissent souvent pigmentées et entourées d'une aréole jaune dans le cas où le Mannitol est fermenté, sinon les colonies sont de couleur blanche. Ces colonies sont arrondies à bords réguliers de 1 à 2 mm de diamètre après 24 heures d'incubation 37°C (**Photo 01**) .



Photo 01 : Aspect des colonies de *S.aureus* sur milieu Chapman (Hôpital de Mila)

PARTIE II : Etude expérimentale

La totalité des souches de *Staphylococcus spp* isolées répondent aux caractéristiques macroscopique et microscopique du genre *Staphylococcus*.

Nous notons, que sur 20 prélèvements positifs, 5 souches appartiennent au genre *Staphylococcus* soit une fréquence de près de 25%. Ainsi, plus du ¼ des souches isolées sont des *Staphylocoques*. ce taux élevé démontre l'importance de l'infection par ce germe, le **tableau 10** présente leur fréquence par rapport à la totalité des cultures positives.

Tableau 10: Fréquence globale de *Staphylococcus spp*

Total des cultures positives	Total des <i>Staphylococcus</i> isolées	Pourcentage
20	05	25%

2.4. Identification de l'espèce *S.aureus*

Sur les 05 souches appartenant au genre *Staphylococcus*, 04 souches pures non redondantes ont été identifiées à l'espèce *S. aureus* par la mise en évidence de la coagulase libre (utilisation du plasma de lapin) (**Photo 02**), ce qui représente un taux de 80% sur la totalité des prélèvements qui se sont avérés positifs et 12,12% sur la totalité des prélèvements examinés (**Tableau 11**). Le reste des souches appartient aux espèces à coagulase négative.

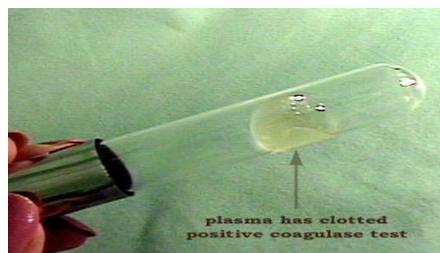


Photo 02 : Mise en évidence de la coagulase libre chez les *Staphylocoques*

PARTIE II : Etude expérimentale

Tableau 11 : Fréquence d'isolement de *S. aureus*

Prélèvements	Culture positives	Nombre de souches <i>Staphylocoque</i>	Nombre de souches <i>Staphylococcus aureus</i>	%de <i>S.aureus</i> par rapport à la culture positive	%de <i>S.aureus</i> par rapport aux prélèvements	%de <i>S.aureus</i> par rapport aux souches de <i>Staphylococcus</i>
33	20	5	4	20%	12,12%	80%

2.5. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

Les tests d'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques ont été réalisés selon la méthode classique de diffusion de l'antibiotique en gélose à partir de disque imprégnés d'antibiotiques selon les recommandations du NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, USA). Le **tableau 12** montre la fréquence de la résistance aux antibiotiques.

Tableau 12: Fréquence de la résistance et de la sensibilité aux antibiotiques de *S. aureus*

Antibiotique testé	Nombre de souches résistantes	Nombre de souches sensibles
OX₅	1	3
AK₁₀	0	4
CN₁₀	0	4
FF₅₀	0	4
IPM₁₀	0	4
FC	0	4
PC₁₀₀	1	3
CZ	1	3
CTX	0	4
SXT	0	4

(OX): Oxacilline, (AK₁₀): Amikacine, (CN₁₀):Cefalexine, (FF₅₀):Fosfomycine, (IPM₁₀): Imipeneme, (FC):Fusidique acide, (PC₁₀₀):Piperacilline, (CZ):Cefazoline, (CTX):Cefotaxine, (SXT):Trim+Sulfamides.

Il existe 07 antibiotiques (Amikacine, Cefalexine, Fosfomycine, Imipeneme, Fusidiqueacide, Cefotaxine, Trim+sulfamides) pour les quels aucune résistance n'a été observées. Les antibiotiques pour lesquels des résistances ont été observées sont :

Oxacilline, piperacilline, Cefazoline.

Le choix des antibiotiques étudiés concerne des molécules disponible en thérapeutique sensibilité naturelle de *S. aureus*.

On va présenter la résistance au piperacilline dans La **photo 03**.



Photo 03 : Souches de *S. aureus*
résistante à la piperacilline (Hôpital de Mila)

On trouve 06 antibiotiques qui sont : **AK₁₀**, **CN₁₀**, **FF₅₀**, **IPM**, **OX₅**, **FC**, ont été Constamment actifs et peuvent être de bonnes alternatives thérapeutiques.

2.6. Historique de l'antibiorésistance de *S. aureus* (2010- 2012) (tableau 13)

Tableau 13 : L'antibiorésistance de *S. aureus* (février 2010–mars 2012) (Hôpital de Mila)

Date	Sensibilité	Intermédiaire	Résistances	Origine de prélèvement
16/02/2010	AM PC	PM	CTX OX A	Pus
16/02/2010	SR AM QK		OX A CO CZ	Pus
04/05/2010	SP A	OX Aup		Pus
17/05/2010	NA PM CZ	OX	A CL	LCR
07/06/2010	AM PC		OX P CTX PM AK E CN	P.V
13/07/2010	AM AMX CTX		P AMX PC OX CM	Pus
15/07/2010	PC AM FC PM CTX CZ NA		QK AMX	Pus
15/07/2010	P NO CW CTX AM A		OX CLN A	Pus
01/10/2010	CZ SPR AK		AC OX CTX FC	Pus
12/10/2010	AMC CZ AK GN CN		OX CTX FOS	P.V
19/10/2010	SXT AN GN CTX		OX SP P AMP AMC CZ CL PIP	Pus
08/11/2010	GM CTX SPR P AK		CL	Pus

PARTIE II : Etude expérimentale

21/11/2010	CZ AK G	AC OX FC	CE	P.V
25/11/2010	CS NA GN		AMC CZ CTX AM	P.V
06/01/2011	CZ	AMC CTX	OX AN G FC	Pus
23/01/2011	IMP	NO	AMP CZ CTX SXT PC AK AMC OX CL GN	P.V
09/02/2011	AC CZ AM CE OX	PC A		Pus
13/02/2011	CE CZ	PC	OX AC A AM	Pus
16/02/2011	CE CZ AM	AC OX PC	A	Pus
20/02/2011	CE PC CZ AM AC AK		OX	P.V
23/02/2011	AM CZ CE AK	OX AC	PC	Pus
13/03/2011	CE		OX A AC AM P PC	P.V
20/03/2011	AM CZ CE CL G AC		OX A	P.V
03/04/2011	AC LE		P NA LO L	P.V
03/04/2011	OX LE SR L FC VA		P	Pus
05/04/2011	AM CZ	AC	PC OX P A	Pus

PARTIE II : Etude expérimentale

17/04/2011	CZ G	CTX	CL OX AC PC	Hémoculture(A)(B)
19/04/2011	NO CF G L CL		NA	P.V
24/04/2011	I CZ G CTX A		P CL AC	Pus
25/04/2011	G CZ E		CL PC OX	Pus(Abcès)
25/04/2011	CZ CL G		OX PC E	Pus
27/04/2011	AM		G OX CE CZ A P	Pus
27/04/2011	G AM CZ AC CE	A P	OX	Pus
28/04/2011	G CE	AM	P A CZ OX	Pus
02/05/2011	LE AK G CF	AM	P FC	P.V
09/05/2011	CZ CE AK G CL		P FC	P.V
16/05/2011	NE AM G	CZ CE	AC A OX	P.V
23/05/2011	AM NE CZ G	A AC	CL OX	Pus
23/05/2011	G AM NO CL		OX AC CZ A	P.V
06/06/2011	VA FC		OX P L AC AK	P.V
09/06/2011	AM AC	P	A	Liquide d'acite

PARTIE II : Etude expérimentale

12/06/2011	NA AK G CZ PC CE		FC	P.V
12/06/2011	CE AM A		AC P OX	Pus
16/06/2011	AK		OX AC A CZ CE	Pus
23/06/2011	AM		CO CE G AC AN OX	P.V
24/07/2011	CE AK G		CZ AC OX CO	Pus
26/07/2011	CL G AK		CO CE CZ AC	P.V
26/07/2011	CZ CE AC NA		NO	P.V
16/10/2011	CTX A AMC P GN CZ CL			Pus
17/10/2011	IMP		P OX AMX PC CL	Pus
21/11/2011	GN	CTX	P AM CZ CS	Pus
21/11/2011	AMX CL		P AM P CZ CTX OX	Pus
08/12/2011	AM OX GM L	CTX	CZ AMC	B.A
09/02/2012	IMP(TR) SR L CTX		AMC GM OX	Pus

PARTIE II : Etude expérimentale

19/02/2012	AK IMP GN E SP LI		PC	P.V
19/02/2012	CIP SR L E IMP AK		PC	Pus
21/02/2012	CIP IMP AK OX PC AM E SR L			Pus
12/03/2012	IPM AK FOS GM		P OX	P.V
14 /3/2012	FS OX FPM AN GM FOS	P		Pus

Conclusion et perspectives

Nous avons isolés 04 souches de *Staphylococcus aureus* à partir de 33 échantillons de différents produits pathologiques.

La résistance des *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques met en jeu des mécanismes différents selon les familles d'antibiotiques : production d'enzymes inactivatrices et modification de la cible. Quant au déterminisme génétique de la résistance de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques, différents gènes de résistance ont été mis en évidence avec une nature chromosomique ou plasmidique.

Nous résultats ont montrés qu'il existe 07 antibiotiques (Amikacine , cefalexine ,fosfomycine, imipeneme, acidefusidique, cefotaxine , trim-sulfamides) pour les quels aucune résistance n'a été observée. Les antibiotiques pour les quels existe des résistances sont : oxacilline (25%), piperacilline (25%) et cefazoline (25%).

Notre travail ouvre de nombreuses perspectives :

- Etude d'un nombre plus important d'isolats, pendant une période plus longue.
- La pathologie surveillée doit comprendre essentiellement les infections septicémiques et les infections profondes chez les patients à risque dans les services à haute prévalence par une étude épidémiologique des isolats d'hémocultures.
- Mettre en évidence la diatribution clonale des SARM isolés par génotypage en électrophorèse en champs pulsés pour avoir une image plus exacte de la situation épidémiologiques.
- Mettre en place un réseau de la surveillance l'infections à SARM.
- Etudier par des analyses statistiques les résultats de l'antibiorésistancede *S.aureus* depuis Février 2010 jusqu'à Mars 2012.

Bibliographique

1. **Aitabelouhab N. (2008)**. Microbiologie alimentaire. Office des Publications Universitaires. 147 p.
2. **Alomar J., (2007)**. Etude de propriété physiologiques de lactococcus lactis et lactococcus gravieae pour la maitrise de *Staphylococcus aureus* en Technologie fromagère. Ecole nationale supérieure d'agronomie et des industries (ENSAIA). 115 p.
3. **Anonyme (2003)**. Bactériologie. DCEM1. Université PARIS-VI pierre et Marie Curie Faculté de Médecine pitié- Salpêtrière. 122 p.
4. **Aouati H. (2009)**. Isolement des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline. Etude de leur sensibilité aux autres familles d'antibiotiques. université mentouri. Constantine. 94p.
5. **Berche P., Kayal S., Nassif X., Poyart C. (2003)**. Bactériologie systématique. D.C.E.M.1. Faculté de Médecine Necker-Enfants malades. 94 p.
6. **Berthet J. (2006)**. Dictionnaire de biologies 1^{ère} édition de Boeck université. paris. 829 p.
7. **Bouguessa N.R., Belouni R., Seghier M., Benslimani A. (2010)**. Manuel de Microbiologie à l'usage des étudiants en 3^{ème} année de Médecine. 2^{ème} Edition. 277p.
8. **Corne PH. (2004)**. *Staphylococcus aureus* dans un service de réanimation. Etude génétique, phénotypique et épidémiologique. Université montpellier I.U.F.R. de MEDECINE. 174 P.
9. **Delarras C. (1998)**. Microbiologie 90 Heures de travaux pratique. paris. P. 177 ,265.
10. **Delarras C. (2007)**. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition Médical internationales. Paris. 476 p.
11. **Delarras C. avec la participation de trébaol B., Durand J. (2010)**. Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux. 2^{ème} Edition TEC et DOC, Paris. 542 p.
12. **Frany-Xavier et al. (2010)**. Guide pratique de toxicologie. 2^{ème} édition de Boeck Université .paris. 343 p.

13. **Grosjean J., Clavé D., Archamdoud M., pasquier CH. (2011).** Bactériologie et virologie pratique. Edition de Boeck Université. Paris 2^{ème} édition. 290 p.
14. **Guezlane-Tebibel N., Kahlouche B., Atmani-guemouri S. (2010).** Microbiologie Travaux pratique. 3^{ème} édition corrigée office des publications universitaires. 139 p.
15. **Guy L., vierlino E.(2007).** Microbiologie et Toxicologie des aliments Hygiène et sécurité alimentaire 4^{ème} édition doin éditeurs. 287 p.
16. **Karp. (2010).** Biologie Cellulaire et moléculaire. 3^{ème} édition de Boeck Université. Paris. 108 p.
17. **Kenneth J., Ryan MD., George Ray, MD. (2004).** Sherris Médical. Microbiology. Fourth 4TH Edition 2004. P. 219, 221, 225, 251, 263.
18. **Larpant J. P., (2000).** Introduction à la nouvelle classification bactérienne. les principaux groupes bactériens. Edition université. p. 106, 108,164-165, 192,194.
19. **Madigon M., Martinko J. (2007).** Brock Biologie des micro-organismes. 11^{ème} Edition Pearson Education France. 1047 p.
20. **Mari B. (2011).** Recherche des effets de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques sur le *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM). Université du Québec A Montréal. Mais 2011. P. 2, 4,7.
21. **Monteil H. (1996).** L'interprétation de antibiogramme. Laboratoire de bactériologie. Faculte de Médecine Hopitoux Universitaires de Strasbourg. Février 1996. 63 p.
22. **Prescott., Harley., Klein. (2003).** Microbiologie. 2^{ème} Edition Française de Boeck Université. 1137 p.
23. **Prescott ., Harley., Klein .,Wiley ., Sherwood ., Woolvetion. (2010).** Microbiologie. 3^{ème} Edition de Boeck Universities. Paris. 1088 p.
24. **Singleton P. (2004).** Bactériologie pour la médecine la biologie et les bacte chnologie. 6^{ème} Edition DUNOD. 542 p.
25. **Sitti AH., (2001).** Contribution à l'étude de l'évolution de la qualité Bactériologique des produits de la pêche destinent à l'exportation de 1997 A 2000. 57 p.
26. **Stephen H., GILLespiet., Peter M., Hawkey. (2005).** Principe and practice of clinical. Bacteriology. Jolm Wilcy. &.Sons Ltd. P. 66, 68, 73-76, 78,79,87,88.

ANNEXES

Annexe 1 : Composition de certains milieux de culture

❖ Le bouillon nutritif : (milieu de base, complexe, liquide)

- extrait de viande sec5g
- Bacot-peptone10g
- Chlorure de sodium.....5g
- Eau distillée.....1000ml
- pH.....7, 2_ 7,4
- Stérilisation par autoclavage pendant 15 min à 120 °C

❖ La gélose Chapman (milieu complexe gélosé, à la fois sélectif et différentiel)

- Peptone10g
- Extrait de viande de bœuf1g
- Chlorure de sodium75g
- Mannitol.....10g
- Agar agar.....15g
- Eau distillée1000ml
- pH.....7, 4
- Stérilisation par autoclavage, à 110°C pendant 30 min.

❖ Gélose nutritif

- Peptone10g
- Extrait de viande4g
- Chlorure de sodium5g
- Agar13g
- pH.....7.2

Préparation

29g par litre d'eau distillée, stérilisation par autoclavage, à 120°C pendant 20 min.

❖ Gélose. Meilleur-Hinton

- Infusion de viande de bœuf 300ml
- Peptone de caséine17.5g
- Amidon de maïs1.5g
- Agar10g
- pH.....7.4

Préparation ,37g par litre de l'eau distillée stérilisation par l'autoclavage à 116°C pendant 15min.

❖ **Gélose pour la conservation**

- Peptone.....10g
- Extrait de viande5g
- Chlorure de sodium..... 5g
- Agar.....10g
- pH.....7.3

Préparation

Prêt à l'emploi en petits tubes fins

❖ **Base pour gélose au sang**

- Mélange spéciales de peptone23g
- Amidon1g
- Chlorure de sodium5g
- Agar..... 0.7g
- pH.....7.3

Préparation

42.5g /l'eau distillée, stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20min le sang est ajouté stérilement dans le milieu stérile en surfusion.

Annexe 2 : Les réactifs utilisés

❖ Le violet phéniqué (colorant primaire)

- Violet de gentiane (Crystal violet).....1g
- Alcool absolu10ml
- Eau phéniquée à 190ml

❖ Liquide de lugol (mordant)

- Iode1g
- Iodure de potassium.....2g
- Eau distillée300g

❖ Alcool 96° (agent de décoloration)

❖ Solution de fuchsine ou de safranine (colorant de contraste)

- Solution de fuchsine saturée à l'alcool 10ml
- Eau distillée.

❖ Plasma de lapin

- Plasma de lapin lyophilisé 1 flacon : 10ml
- Diluant (oxalate de sodium 1 ampoule : 10ml)

Résumé

Quatre souches de *Staphylococcus aureus* ont été isolées et testées par la méthode des disques vis-à-vis de 10 antibiotiques (Amikacine, cefalexine, fosfomycine, imipeneme, oxacilline, acide fusidique, piperacilline, cefazoline, cefotaxine et trim+sulfamides). Il existe 07 antibiotiques (Amikacine, cefalexine, fosfomycine, imipeneme, acide fusidique, cefotaxine, trim-sulfamides) pour les quels aucune résistance n'a été observée. Les antibiotiques pour les quels il existe des résistances sont : oxacilline (25%), piperacilline (25%), cefazoline (25%). Une souche est sensible à tous les antibiotiques testés.

Mots clés : *Staphylococcus aureus*, antibiotiques, antibiorésistance.

Summary

Antimicrobial resistance of 04 strains of *Staphylococcus aureus* isolated was investigated in vitro (diffusion technique) with a range of 10 antibiotics (Amikacine, cefalexine, fosfomycine, imipeneme, oxacilline, fusidique acide, piperacilline, cefazoline, cefotaxine, trim+sulfamides). All isolates were sensitive to 07 antibiotics (Amikacine, cefalexine, fosfomycine, imipeneme, fusidique acide, cefotaxine, trim-sulfamides). 25% of were resistant to oxacilline, 25% piperacilline, 25% to cefazoline. One strain was susceptible to all antibiotics.

KEY-WORDS: antimicrobial resistance, antibiotics, *Staphylococcus aureus*.

المخلص

تم عزل 04 سلالات من المكورات العنقودية الذهبية (*Staphylococcus aureus*) وسمحت طريقة الاقراص واختيار الفرزل 10 مضادات الحيوية (Amikacine, cefalexine, fosfomycine, imipeneme,) (oxacilline, fusidique acide, piperacilline, cefazoline, cefotaxine, trim+sulfamides). فظهرت حساسية ل 07 انواع من المضادات الحيوية (Amikacine, cefalexine, fosfomycine, imipeneme,) (fusidique acide, cefotaxine, trim-sulfamides). ونتاجت مقاومة ل 03 انواع من المضادات الحيوية (oxacilline, (25%) piperacilline, (25%) cefazoline). كما ظهرت سلالة حساسة لجميع المضادات الحيوية.

الكلمات المفتاحية : المقاومة للمضادات الحيوية , المضادات الحيوية. (*Staphylococcus aureus*)