

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET MICROBIOLOGIE APPLIQUEES



LBMA
Laboratoire de Biochimie
et Microbiologie Appliquée

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

Spécialité: Biologie Cellulaire et Moléculaire

THEME

**Identification et Caractérisation Moléculaire
des Agents Pathogènes Associés aux Infections
du Site Opératoire en Gynécologie Obstétrique**

Présentée par: Mme **BOUTEFNOUCHET Chahinez**

Membres de Jury :

Mme CHETTIBI Houria (Prof)	Présidente de jury	UBMA
Mme AOURAS Hayet (Prof)	Directrice de thèse	UBMA
Mme BERREDJEM Hajira (Prof)	Co-Directrice de thèse	UBMA
Mr LOUCIF Lotfi (Prof)	Examineur	Univ. Batna 2
Mr AMOURA Kamel (Prof)	Examineur	UBMA
Mme BECHEKER Imène (MCA)	Examinatrice	Univ. Skikda

Année universitaire: 2023 / 2024

'' L'obstination est le chemin de la réussite ''

Charlie Chaplin

Dédicaces

*Je dédie cette thèse, le fruit d'un travail acharné,
à mon très cher papa et ma très chère maman, ma raison
d'être, ma raison de vivre, en signe d'amour, de
reconnaissance et de gratitude pour tout le soutien et les
sacrifices qu'ils ont fait à mon égard.*

Remerciements

Au nom de Dieu clément et miséricordieux, le plus grand merci lui revient, car il m'a donné la capacité et le courage d'achever ce travail et m'a aidé à surmonter toutes les difficultés que j'ai rencontré ; je lui demande de guider mes pas dans le chemin qui méritera son approbation.

A ma directrice de thèse Professeur Hayet Aouras, médecin gynécologue et chef de service en gynécologie obstétrique a l'EHS El Bouni, Annaba. Ma profonde gratitude s'adresse à vous pour m'avoir donné l'opportunité de travailler avec vous. Merci pour l'expérience que vous m'avez transmis et le temps que vous avez consacré à diriger cette thèse.

A ma co-directrice de thèse, Professeur Hajira Berredjem, enseignante au département de Biochimie et directrice du laboratoire de recherche de Biochimie et de Microbiologie Appliquées. Je vous adresse un grand remerciement pour le savoir scientifique, les conseils judicieux et la confiance que vous m'avez accordée, me permettant ainsi, d'acquérir une rigueur scientifique et d'approfondir mes connaissances.

A ma tante Professeur Abbaci Boutefnouchet Nafissa, Professeur en Microbiologie, merci de m'avoir encouragé, soutenu et fourni beaucoup de connaissances et de conseils me permettant d'améliorer la qualité de mon travail.

J'adresse mes vifs remerciements au :

- Professeur Chettibi Houria, pour avoir honoré ce travail en l'évaluant et en acceptant de présider le jury.
- Professeur Amoura Kamel, je vous remercie de vous intéresser à ce travail et d'avoir accepté avec gentillesse de faire partie de ce jury et d'examiner notre travail malgré vos nombreuses occupations.
- Professeur Loucif Lotfi, pour m'avoir fait l'honneur en acceptant d'examiner ma thèse et de se déplacer à Annaba pour participer à mon jury.
- Docteur Becheker Imène, je vous suis profondément reconnaissante d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

A mes êtres les plus chers, Papa et Maman

Je vous remercie de m'avoir tant donné, de m'avoir tant appris, de m'avoir tant encouragé et tant soutenu même dans les moments les plus difficiles et douteux. Merci de m'avoir transmis une excellente éducation votre amour et votre affection, merci d'avoir fait de moi la personne que je suis devenu.

A mes adorables frères, merci d'être toujours là pour moi, de prendre soin de moi de me gâter.

A mes aimables belles sœurs, petits neveux et petites nièces mon chagrin de bonheur.

Une profonde gratitude s'adresse aux patientes pour avoir donné leur avis favorable et consentement pour participer à cette étude.

A tout le personnel médical et paramédical du service de gynécologie obstétrique de l'EHS El Bouni Annaba.

A tout le personnel médical du laboratoire de Biologie médicale du CAC Annaba.

Je tiens à remercier toute l'équipe de recherche de L'IHU Méditerranée infection de Marseille pour leur accueil, leur sympathie ainsi que leurs idées constructives.

Enfin, mes plus chaleureux remerciements s'adressent à toute l'équipe du laboratoire de Biochimie et de Microbiologie Appliquées, à tout le personnel du département de Biochimie de l'université Badji Mokhtar Annaba et à tous mes professeurs qui m'ont enseigné, aidé et soutenu tout au long de mon cursus.

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Résumés

Introduction..... 1

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Les infections du site opératoire en Gynécologie Obstétriques

1. Les infections du site opératoire en Gynécologie Obstétriques.....	3
1.1. Historique et épidémiologie	3
2. Définition.....	5
3. Critères diagnostiques d'une infection du site opératoire.....	6
3.1. Infection superficielle de la plaie chirurgicale	6
3.2. Infection profonde de la plaie chirurgicale	7
3.3. Infection du site opératoire d'organe ou de cavité	7
4. Facteurs de risques liés à l'apparition de l'infection du site opératoire.....	7
4.1. Facteurs liés à la procédure chirurgicale	7
4.2. Facteurs liés aux patients	9
5. Paramètres déterminants des infections du site opératoire.....	10
5.1. Pathogénèse	10
5.2. Score ASA.....	11
5.3. Critères de la classification d'Altemeier	11
6. Source et origine de contamination des ISO.....	12
7. Les infections post-chirurgicales en Gynécologie Obstétrique.....	13
7-1. Césariennes	13
7-2. Hystérectomie	15
7-3. Chirurgie du sein.....	16

Chapitre 2 : Bactéries isolées d'infections du site opératoire

1. Agents pathogènes associées.....	17
1.1. Les entérobactéries.....	17
1.1.1. <i>Escherichia coli</i>	18
1.1.2. <i>Enterobactercloacae</i>	18
1.1.3. <i>Klebsiellapneumoniae</i>	19
1.1.4. <i>Proteus mirabilis</i>	20
1.1.5. <i>Morganellamorganii</i>	21
1.2. Les bacilles à Gram négatif non fermentaires.....	21
1.2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
1.2.2 <i>Pseudomonas putida</i>	22
1.2.3 <i>Acinetobacterbaumani</i>	23
1.3. Les cocci à Gram positif	24
1.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	24
1.2.3. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	25
1.2.4. <i>Enterococcusfaecalis</i>	26
1.2.5. <i>Enterococcusfaecium</i>	27

Chapitre 3 :Mécanismes de résistances aux antibiotiques

1. La résistance bactérienne aux antibiotiques.....	28
2. Modes d'action des antibiotiques.....	30
3. Principales familles des antibiotiques	32
3.1. Les β -lactamines.....	32
3.2. Les Aminosides.....	33
3.3. Quinolones/ Fluoroquinolones.....	34
3.4. Les tétracyclines.....	34
3.5. Les macrolides et apparentes.....	35
3.6. Les polymyxines.....	36
3.7. Les glycopeptides.....	36
4. Evolution de la résistance aux antibiotiques chez l'homme.....	37
5. Surveillance de la résistance aux antibiotiques.....	37
Problématique.....	40
Hypothèse de l'étude.....	40

Objectif de l'étude.....	41
--------------------------	----

Matériel et Méthodes

1. Méthodologie	42
1.1. Description de l'étude	42
1.2. Population d'étude	42
1.3. Déroulement de l'étude	42
1.4. Collecte des données cliniques.....	43
1.5. Matériel biologique.....	43
2. Etude bactériologique des prélèvements de pus.....	45
2.1. Coloration au bleu de méthylène.....	45
2.2. Coloration de Gram.....	45
2.3. Isolement des souches bactériennes.....	46
2.4. Purification des souches bactériennes.....	46
2.5. Identification biochimique des souches par les galeries miniaturisés Api système (BioMérieux, France).....	46
3. Conservation des souches bactériennes.....	48
4. Confirmation de l'identité des souches bactériennes par la spectrométrie de masse MALDI TOF (Microflex LT).....	48
5. Tests de sensibilité aux antibiotiques.....	50
6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice par E-test.....	56
7. Caractérisation moléculaire de la résistance des souches aux antibiotiques.....	56
7.1. Extraction d'ADN total bactérien	56
7.2. Réaction de polymérisation en chaîne réalisée en temps réel.....	58
7.3. Réaction de polymérisation en chaîne standard.....	60
7.4. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	62
7.5. Séquençage de Sanger	63
7.6. Séquençage de nouvelle génération Miseq Illumina.....	65
7.6.1. Analyses bioinformatique des données brutes du séquençage sur les pipelines en ligne Galaxy (Australia).....	66
7.6.2. Alignement et réorganisation des génomes à l'aide du logiciel Mauve	67
7.6.3. Représentation graphique du matériel génétique via l'interphase Easyfig.....	67
7.6.4. Analyse BLAST sur NCBI database et représentation circulaire de	

l'environnement génétique par le logiciel CGview.....	68
---	----

Résultats

1. Caractéristiques de la population d'étude.....	69
2. Les facteurs de risque de survenue d'ISO préopératoires.....	71
2.1. Facteurs liés aux patientes.....	71
2.2. Facteurs liés à l'intervention.....	74
2.3. Facteurs liés à la prise en charge postopératoire.....	75
3. Analyse bactériologique des prélèvements de pus d'infection du site opératoire.....	77
3.1. Isolement et identification des souches bactériennes isolées.....	78
3.2. Identification biochimique.....	79
3.3. Identification par MALDI-TOF.....	79
4. Provenance des souches bactériennes	80
4.1. Résistances des <i>Enterobacteriaceae</i> aux antibiotiques	82
4.2. Résistance de <i>Pseudomonas putida</i> aux antibiotiques.....	85
4.3. Résistances d' <i>Enterococcus</i> spp aux antibiotiques.....	86
4.4. Résistance de <i>Staphylococcus spp</i> aux antibiotiques.....	89
4.5. Concentrations minimales inhibitrices (E-test)	91
5. Collecte des prélèvements sur les surfaces inertes du milieu hospitalier.....	91
5.1. MSP dendrogramme par MALDI-TOF	93
6. Caractérisation moléculaires des prélèvements.....	95
6.1. Réaction de polymérisation en chaîne réalisée en temps réel.....	95
7. Caractérisation moléculaire des souches bactériennes.....	95
7.1. Réaction de polymérisation en chaîne réalisée en temps réel	95
7.2. Réaction de polymérisation en chaîne Standard	100
7.3. Coexpression des gènes de résistance.....	100
7.4. Séquençage de Sanger et analyse des séquences des gènes qui codent pour les BLSE	102
8. Séquençage de nouvelle génération Miseq Illumina.....	104
8.1. Analyses bio-informatique des données brutes du séquençage génomique sur la pipelines en ligne Galaxy (Australia)	104
8.2. Alignement et réorganisation des génomes.....	105
8.3. Analyse BLAST sur NCBI database et reconstitution de l'environnement	

génétiq ue	106
8.4. Représentation graphique linéaire sur Easyfig	107
8.5. Représentation circulaire du plasmide et organisation de l'opéron VanA.....	108
8.6.Comparaison phylogénétique des génomes d' <i>E.faecium</i>	108
Discussion	111
Conclusion	128
Références bibliographiques	130
Annexes	
Productions scientifiques	

Liste des figures

Figure 1. Classification anatomique des infections du site opératoire	6
Figure 2. Sources et origines de contamination des ISO	13
Figure 3. Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques	30
Figure 4. Principaux mécanismes d'action des antibiotiques	32
Figure 5. Schéma général du traitement des prélèvements de pus	44
Figure 6. Protocole d'identification bactérienne par MALDI-TOF.....	50
Figure 7. Protocole d'extraction de l'ADN bactérien	57
Figure 8. Incidence des infections chirurgicales en gynécologie obstétrique	69
Figure 9. Répartition des patientes ayant une ISO en fonction du moment de l'intervention ..	69
Figure 10. Répartition des patientes ayant une ISO en fonction des différentes indications obstétricales d'ordre fœtal.....	70
Figure 11. Répartition des patientes ayant une ISO en fonction des différentes indications gynécologiques	70
Figure 12. Répartition des patientes selon le niveau socio-économique	71
Figure 13. Répartition selon l'âge des patientes présentant une ISO	71
Figure 14. Diagramme en boîte de la variable âge de notre cohorte d'étude	72
Figure 15. Manifestation des infections du site opératoire en Intra et Extra hospitalier.....	76
Figure 16. Les différentes associations d'antibiotiques reçus en antibiothérapie	77
Figure 17. Schéma du protocole d'identification des espèces bactériennes et des gènes de résistances	77
Figure 18. Répartition des souches bactériennes isolées des prélèvements de pus des ISO, A : répartition des espèces bactériennes à Gram négatif, B : répartition des espèces bactériennes à Gram positif	78
Figure 19. Répartition des différentes espèces bactériennes isolées selon le type de contamination microbienne (monomicrobienne : 75 % et polymicrobienne : 25 %)	79
Figure 20. Résultat de l'identification des souches par la feuille de calcul Excel	80
Figure 21. Exemple des scores d'identification bactérienne obtenus par MALDI-TOF	80

Figure 22. Profile de sensibilité des entérobactéries vis-à-vis des antibiotiques testés	84
Figure 23. Exemple du profil de résistance des entérobactéries productrices de BLSE A : <i>E.coli</i> , B : <i>E. cloacae</i> , C : <i>K. Pneumonia</i> ; D : <i>M. morgani</i> , E : <i>P. mirabilis</i>	84
Figure 24. Profile de sensibilité de <i>P. putida</i> vis-à-vis des antibiotiques testés	86
Figure 25. Exemple du profil de résistance de <i>P. Putida</i>	86
Figure 26. Profile de résistance d' <i>Enterococcuspp</i> vis-à-vis des antibiotiques testés	88
Figure 27. Exemple du profil de résistance d' <i>E. faecalis</i>	88
Figure 28. Exemple du profil de résistance d' <i>E. faecium</i>	88
Figure 29. profile de résistance de <i>Staphylococcus spp</i> vis-à-vis des antibiotiques testés	90
Figure 30. Exemple du profil de résistance de <i>Staphylococcus aureus</i>	90
Figure 31. Exemple du profil de résistance de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	90
Figure 32. Exemple de résultat de la détermination de la CMI de la vancomycine par E-test	91
Figure 33. Répartition des souches bactériennes isolées sur les surfaces inertes du milieu hospitalier	92
Figure 34. Fréquences d'isolement des espèces bactériennes sur les différentes surfaces du milieu hospitalier	92
Figure 35. A MSP Dendrogramme entre les souches d' <i>E. cloacae</i> isolées sur les surfaces inertes du milieu hospitalier et <i>E. cloacae</i> isolées de l'infection du site opératoire B MSP Dendrogramme entre les souches d' <i>E. coli</i> isolées sur les surfaces inertes du milieu hospitalier et <i>E. cloacae</i> isolée de l'infection du site opératoire	94
Figure 36. Pooling d'amplification des gènes de résistance par RT-PCR sur les prélèvements des ISO ; a : gène <i>bla_{TEM}</i> , b : gène <i>bla_{SHV}</i> , c : <i>bla_{CTX-M}</i>	96
Figure 37. Absence d'amplification des gènes de résistance par RT-PCR sur les prélèvements des ISO ; a : gène <i>bla_{NDM}</i> , b : gène <i>bla_{KPC}</i> , c : gène <i>mcr-1</i> , d: <i>bla_{aac3}</i>	97
Figure 38. Amplification par RT-PCR des gènes a : <i>bla_{TEM}</i> , b : <i>bla_{SHV}</i> , c : <i>bla_{CTX}</i>	98
Figure 39. Amplification par RT-PCR du gène <i>aac'(6)-Ib</i> chez les 3 souches <i>E. cloacae</i>	99
Figure 40. Amplification par RT-PCR du gène <i>bla_{VanA}</i>	100
Figure 41. Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR des gènes <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{CTX}</i>	101

Figure 42. Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR des gènes <i>aac'(6)-Ib</i>	101
Figure 43. Correction des séquences d'ADN obtenus par séquençage de Sanger sur le logiciel Bio Edit	102
Figure 44. Alignement des séquences génomiques complètes des deux souches d' <i>E. faecium</i> résistantes à la vancomycine par le logiciel MAUVE	106
.....	107
Figure 45. Comparaison des séquences génomiques sur NCBI Database.....	
Figure 46. Représentation du Tn1546 de la souche <i>E. faecium</i> Q7358 en comparaison avec le Tn de référence par le logiciel Easyfig	107
Figure 47. Représentation du plasmide de type <i>rep17</i> pRUM-like de la souche <i>E. faecium</i> Q7358 en comparaison avec le plasmide de référence par le logiciel Easyfig	108
Figure 48. A : Représentation circulaire du plasmide codant pour le gène <i>vanA</i> . B : Représentation schématique de l'environnement génétique du gène <i>vanA</i> situé sur le transposon 1546 et sa comparaison avec les transposons de références	109
Figure 49. Carte circulaire du chromosome <i>E. faecium_35</i> Q7358 et <i>E. faecium_38</i> Q7360 et sa comparaison génomique avec les quatre génomes d' <i>E. faecium</i> les plus proches	110

Liste des tableaux

Tableau 1. Micro-organismes à l'origine d'ISO dans les enquêtes de prévalence Européenne et nationale française et des surveillances anglaises et américaines en 2009/2010	4
Tableau 2. Incidence d'ISO dans les services de chirurgie en Algérie : données de la littérature	5
Tableau 3. Liste des antibiotiques testés pour les entérobactéries.....	52
Tableau 4. Liste des antibiotiques testés pour les entérobactéries non fermentaires	53
Tableau 5. Liste des antibiotiques testés pour les staphylocoques	54
Tableau 6. Liste des antibiotiques testés pour les entérocoques.....	55
Tableau 7. Composition des mélanges réactionnels pour la RT-PCR	58
Tableau 8. Programme de la RT-PCR.....	58
Tableau 9. Amorces utilisées en RT-PCR	59
Tableau 10. Composition des mélanges réactionnels pour les PCR standard	60
Tableau 11. Programme de PCR standard	61
Tableau 12. Amorces utilisées en PCR standard et séquençage de Sanger	61
Tableau 13. Composition des mélanges réactionnels pour la PCR BigDey	64
Tableau 14. Programme de la PCR BigDye.....	65
Tableau 15. Répartition des femmes selon les facteurs personnels liés au terrain de survenue des ISO.....	73
Tableau 16. facteurs liés aux conditions de l'intervention.....	74
Tableau 17. Répartition des femmes selon les facteurs liés à la prise en charge post-opératoire de survenue des ISO	75
Tableau 18. Provenance des souches bactériennes identifiées, isolées des patientes	

durant les deux années d'échantillonnage.....	81
Tableau 19. Résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques des souches d'entérobactéries	83
Tableau 20. Résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques des souches de <i>P. putida</i>	85
Tableau 21. Résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques des souches d' <i>Enterococcuspp</i>	87
Tableau 22. Résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques des souches de <i>Staphylococcus spp</i>	89
Tableau 23. Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des souches de BLSE isolées à partir d'ISO en gynécologie obstétrique.....	103
Tableau 24. Caractéristiques cliniques, phénotype de résistance et génotype des isolats d' <i>E. faecium</i> Q7358 et Q7360.....	105

Liste des abréviations

AARN : Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance

API 20E : Analytical profile index 20E (E= Entérobactéries).

API 20 NE :Analytical profile index 20NE (NE= Non Entérobactéries).

API Staph : Analytical profile index Staph (*Staphylococcus*)

API Strep : Analytical profile index Strep

ARG-ANNOT: Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation.

BLAST: Basic Local Alignment tool.

BMR: Bactérie multi-résistante

BGN : Bacilles à Gram négatifs

C3G : Céphalosporine de troisième génération

C4G : Céphalosporines de quatrième génération

CA-SFM : Comité d'antibiogramme- société française de microbiologie.

CC: Complexe clonal.

CDC: Center for disease control

CGP : Cocci à Gram positifs

CLIN: Comité de lutte contre les infections nosocomiales.

CLSI : Clinical and Laboratory Standard Institute.

CMI: Concentration minimale inhibitrice

CTX-M: Céfotaxime Munich

CTINILS : Comité technique de lutte contre les infections nosocomiales et les infections liées aux soins CTINILS

ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control

F: Forward

HTA: Hypertension

IPA: Institut Pasteur d'Algérie

PCR: Polymerase chain reaction

R: Reverse (inverse)

RT-PCR: Real time Polymerase Chain reaction

ST : Séquence type

SHV: Sulfhydryl variable

***Van* :** Gène de résistance à la vancomycine.

Résumé

Résumé

Les infections du site opératoire (ISO) sont l'une des infections associées aux soins de santé les plus courantes dans les pays à revenu faible. Les objectifs de ce travail consistent à estimer l'incidence de survenue des ISO en gynécologie obstétrique, l'identification des agents pathogènes associés et la caractérisation moléculaire de leurs phénotypes de résistance aux antibiotiques.

Les patientes ayant subi un acte chirurgical entre janvier 2020 et décembre 2021 au service de gynécologie obstétrique à l'hôpital Abdallah Nouaouria, El Bouni Annaba, ont été incluses. Chaque femme a été suivie pendant 30 jours post-opératoires et les données socio-démographiques ont été recueillies pour définir les différents facteurs de prédilection.

L'analyse bactériologique des prélèvements de pus des ISO, basée sur la culture en divers milieux ordinaires et spécifiques enrichis, a permis d'identifier les bactéries responsables et de déterminer leurs phénotypes de résistance aux antibiotiques. La caractérisation moléculaire par la PCR standard et la RT-PCR ont permis de détecter les gènes de résistance, suivi du séquençage de Sanger pour la détermination des variantes spécifiques de chaque gène, et d'un séquençage génomique de nouvelle génération Miseq Illumina pour le séquençage du génome complet.

Sur 2709 patientes, nous avons enregistré 52 cas d'ISO. La plupart des interventions chirurgicales avaient un motif d'urgence (69 %). Les comorbidités les plus fréquentes sont l'anémie (31 %) et un score ASA 2 (46,2 %). Parmi les 65 bactéries isolées, les entérobactéries étaient les plus fréquentes (74 %), prédominées par les souches d'*Escherichia coli* (50 %). Le phénotype de résistance majoritairement exprimé par les BGN était les BLSE (41 %). Bien que les cocci à Gram positif soient moins fréquents (26 %), une majorité d'*Enterococcus faecalis* (63 %) a été observée.

L'assemblage du génome des isolats d'*E. faecium* Q7358 et d'*E. faecium* Q7360 résultants du séquençage génomique donne une longueur chromosomique totale de 2 923 802 pb (37,76 % CG) et de 2 927 224 pb (37,74 % CG) respectivement. L'annotation du génome révèle la présence du gène de résistance à la vancomycine *VanA* dans un système opéron. Le génotypage effectué par MLST montre qu'ils appartiennent au clone ST80. De plus, l'analyse génomique comparative a révélé un plasmide *Rep17* avec un élément de type Tn1546 rapporté pour la première fois en Algérie.

Pour conclure, cette étude met à jour une faible fréquence des ISO en gynécologie obstétrique à l'EHS El Bouni d'Annaba. Une faible fréquence n'exclut pas l'absence totale du risque infectieux, de ce fait une surveillance extensive des populations à risque et un dépistage rapide et régulier des profils de résistance devraient être incorporés systématiquement dans les programmes de contrôle.

Mots clés : ISO, gynécologie obstétrique, BLSE, *vanA*, plasmide PRUM *rep17*

Abstract

Surgical site infections (SSIs) are one of the most common healthcare-associated infections in low-income countries. The objectives of this study are to estimate the incidence of SSIs in obstetric gynaecology, to identify the associated pathogens and to characterize their antibiotic resistance phenotype.

Patients who underwent surgery between January 2020 and December 2021 in the obstetrics gynaecology department at the AbdallahNouaouria Hospital, el Bouni Annaba, were included. Each woman was followed for 30 days postoperatively and sociodemographic data were collected to define the different predilection factors. Bacteriological analysis of SSI pus samples based on culture in various ordinary and specific enriched media were used to identify the bacteria responsible and determine their antibiotic resistance phenotypes. Molecular characterisation using standard PCR and RT-PCR was used to detect the resistance genes, followed by Sanger sequencing to determine the specific variants of each gene, and IlluminaMiseq next-generation genomic sequencing to sequence the complete genome.

Out of 2709 patients, we recorded 52 cases of SSI. Most of the surgical procedures were performed as emergencies (69%). The most frequent comorbidities were anaemia (31%) and an ASA 2 score (46.2%). Of the 65 bacteria isolated, *Enterobacteriaceae* were the most common (74%), predominated by *Escherichia coli* strains (50%). The resistance phenotype predominantly expressed by BGN was ESBL (41%). Although Gram-positive cocci were less frequent (26%), a majority of *Enterococcus faecalis* (63%) were observed.

Genome assembly of *E. faecium* Q7358 and *E. faecium* Q7360 isolates resulting from genomic sequencing gave a total chromosome length of 2,923,802 bp (37.76%CG) and 2,927,224 bp(37.74%GC) respectively. Genome annotation revealed the presence of the vancomycin resistance gene *vanA* in an operon system. MLST genotyping showed that they belonged to the ST80 clone. In addition, comparative genomic analysis revealed a rep17 plasmid with a Tn1546-type element reported for the first time in Algeria.

In conclusion, this study reveals a low frequency of SSIs in obstetrics and gynaecology at the EHS El bouni in Annaba. A low frequency does not exclude the total absence of infectious risk, so extensive surveillance of at-risk populations and rapid, regular screening for resistance profiles should be systematically incorporated into control programmes.

Key words: SSI, obstetrics and gynaecology, ESBL, *vanA*, PRUM rep17 plasmid.

ملخص

تعد التهابات الموقع الجراحي (SSIs) واحدة من أكثر أنواع العدوى المرتبطة بالرعاية الصحية شيوعًا في البلدان المنخفضة الدخل. تتكون أهداف هذا العمل من تقدير حدوث حدوث SSI في أمراض النساء والتوليد، وتحديد مسببات الأمراض المرتبطة بها والتوصيف الجزيئي لأنماطها الظاهرية المقاومة للمضادات الحيوية.

تم إدراج المرضى الذين خضعوا لعمليات جراحية في الفترة ما بين يناير 2020 وديسمبر 2021 بقسم أمراض النساء والتوليد بمستشفى عبد الله النوارية بالبونى عنابة. تمت متابعة كل امرأة لمدة 30 يومًا بعد العملية الجراحية وتم جمع البيانات الاجتماعية والديموغرافية لتحديد عوامل الميل المختلفة.

إن التحليل البكتريولوجي لعينات القيح من مباحث أمن الدولة، استنادًا إلى الثقافة في مختلف الوسائط المخصبة العادية والمحددة، جعل من الممكن تحديد البكتيريا المسؤولة وتحديد أنماطها الظاهرية المقاومة للمضادات الحيوية. أتاح التوصيف الجزيئي بواسطة PCR و RT-PCR القياسي اكتشاف جينات المقاومة، يليها تسلسل Sanger لتحديد متغيرات محددة لكل جين، والتسلسل الجينومي للجيل القادم من Miseq Illumina لتسلسل الجينوم الكامل.

من بين 2709 مريضًا، سجلنا 52 حالة من SSI. معظم التدخلات الجراحية كانت لأسباب طارئة (69%). الأمراض المصاحبة الأكثر شيوعًا هي فقر الدم (31%) ودرجة ASA 2 (46.2%). (من بين 65 نوعًا من البكتيريا المعزولة، كانت البكتيريا المعوية هي الأكثر شيوعًا (74%)، وتهيمن عليها سلالات الإشريكية القولونية (50%). كان النمط الظاهري للمقاومة الذي تم التعبير عنه بشكل رئيسي بواسطة BGN هو ESBL (41%) (على الرغم من أن المكورات إيجابية الجرام كانت أقل شيوعًا (26%)، فقد لوحظت أغلبية المكورات المعوية البرازية (63%).

تجميع الجينوم لـ E. Q7358 البراز و E. Q7360 يعطي الناتج عن التسلسل الجيني إجمالي طول كروموسوم يبلغ 2,923,802 نقطة أساس (37.76% CG) و2,927,224 نقطة أساس (37.74% GC) على التوالي. يكشف شرح الجينوم عن وجود جينة مقاومة الفانكوميسين vanA في نظام التشغيل. يُظهر التنميط الجيني الذي أجراه MLST أنهم ينتمون إلى نسخة ST80 علاوة على ذلك، كشف التحليل الجينومي المقارن عن بلازميد ريب 17 مع عنصر شبيه بـ Tn1546 تم الإبلاغ عنه لأول مرة في الجزائر.

في الختام، تكشف هذه الدراسة عن انخفاض وتيرة SSI في EHS البونى لا يستبعد التكرار المنخفض الغياب التام لخطر العدوى، لذلك يجب دمج المراقبة الشاملة للسكان المعرضين للخطر والفحص السريع والمنظم لملفات المقاومة في برامج مكافحة بشكل منهجي

الكلمات المفتاحية:

ISO, أمراض النساء والتوليد, vanA, ESBL, PRUM rep17, البلازميد.

Introduction

Les infections du site opératoire (ISO) sont des infections importantes associées aux soins (IAS) (**Control et Prévention, 2012**). Elle regroupent l'infection nosocomiale (IN), au sens de «contracter dans un établissement de santé » ou l'infection du site opératoire au sens de «contracter dans les centres de soins ou à domicile à la suite des interventions chirurgicales» (**Amazian et al., 2010**).

Les IAS semblent être un problème sous-estimé dans les régions du monde en voie de développement dont le risque sanitaire, social et économique semble être négligé. La prise de conscience de ce phénomène dans un contexte d'amélioration de la qualité des soins a conduit à donner la priorité à la gestion du risque infectieux nosocomial et post-opératoire (**Amazian et al., 2010; Bocoum et al., 2020**).

La chirurgie tient une place centrale dans toutes les structures de soins, or le risque des ISO est présent après chaque intervention représentant la conséquence de diverses manœuvres préopératoires, per-opératoires ou postopératoires (**Birgand, 2014; Brahimi et Belkaid, 2017**). Les ISO varient en fonction des différents facteurs de risque qui peuvent être liées aux patients, à l'intervention, à la pathogénèse de l'infection et au traitement antibiotique. Selon les données disponibles du *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) aux États-Unis, environ 2 à 5% des patients subissant une intervention chirurgicale développent une infection du site opératoire (**Control et Prévention, 2012**). Selon le Programme national Français de lutte contre les IN, les ISO représentent 13,5% des IN (**Birgand, 2014**). En Afrique les études établies montrent un taux élevé des ISO dans les hôpitaux allant de 6,8 à 26% (**Ngah et al., 2016**). En Algérie, très peu d'études ont été réalisées (**Brahimi et Belkaid, 2017**) dont les principales rapportent une incidence respective de 5,4% en chirurgie général (**Atif et al., 2015**) et 4,2 % en chirurgie orthopédique (**Zerouki et al., 2015**).

La gynécologie obstétrique est une discipline qui connaît différentes situations à risque infectieux. En effet, toutes les interventions chirurgicales intéressant l'appareil génitale que ce soit d'ordre obstétricale comme les césariennes, touchés endo-cervicaux répétés pendant le travail, tocographie interne, délivrance artificielle, interruption de grossesse en obstétrique, ou d'ordre gynécologique comme les hystérectomies, l'aparotomie, exploration endocavitaire, etc... exposent à l'infection, du fait que la flore vaginale comporte des bactéries commensales à haut risque infectieux (**Dechoux, 2007; Bocoum et al., 2020**).

A Menuet al.(2011) ont rapporté une incidence des ISO post-césariennes qui varie de 3 à 24 %, en rapport avec l'inflation du nombre des césariennes qui est estimé à 18,5 millions chaque année dans le monde (**Gibbons et al., 2010**). Il est à noter que la gynécologie obstétrique est

historiquement, la première discipline médicale à avoir fait l'objet d'une recherche en prophylaxie efficace de l'infection nosocomiale (**Hartmann, 2005; Dechoux, 2007**).

Sur le plan microbiologique, les ISO surviennent par contamination du site opératoire. Cette contamination a lieu essentiellement en peri-opératoire. Les voies de transmission des micro-organismes sont diverses et pas parfaitement connues. Elles peuvent être aériennes, manuportées ou de contiguïté à partir de la flore endogène du patient (cutanée, digestive, etc...). Mais les sources peuvent aussi être exogènes, notamment le personnel chirurgical, l'environnement du bloc opératoire (y compris l'air, les instruments et les dispositifs médicaux) (**Birgand, 2014**). La survenue d'ISO se manifeste selon une pathogénèse complexe, de nature microbienne diverse. Globalement, les bactéries Gram négatif représentent 60 % des espèces isolées; les cocci Gram positif représentent 25 % des espèces bactériennes isolées des ISO (**Control et Prévention, 2012**).

L'antibioprophylaxie est une technique probabiliste qui a pour but de participer à la réduction de la fréquence voire même de la gravité du risque infectieux lié aux interventions chirurgicales. Les antibiotiques ciblés doivent être soigneusement choisis en fonction de leur spectre d'action, leur pharmacodynamie et leur cinétique (**Dechoux 2007 ; WHO 2016**). De nos jours, les maladies infectieuses constituent plus que jamais un problème de santé en raison du développement continu des résistances bactériennes aux antibiotiques (**Horan et al., 2008; Fournel, 2017**).

Ainsi, les ISO représentent un enjeu majeur en termes de santé consécutif à la morbidité postopératoire, le surcoût pour le système de soins lié à la prolongation de la durée du séjour hospitalier et le coût de soins complémentaires (**Bocoum et al., 2020**). Malgré l'abondance bibliographique portant sur les ISO à l'échelle internationale, les études nationales Algériennes restent rarissimes. En conséquence, ce travail de thèse a pour objectif de déterminer la caractérisation moléculaire du profil microbiologique des agents pathogènes et leur sensibilité aux antibiotiques ainsi que le profil épidémiologique et clinique d'une cohorte de patientes prises en charge pour une infection du site opératoire dans le service de gynécologie obstétrique de l'EHS El Bouni- Annaba.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1

Les infections du site opératoire en Gynécologie

Obstétriques

1. Historique et épidémiologie des ISO

Le thème de l'hygiène hospitalière n'est pas du tout nouveau. La naissance de l'infectiologie au XIXe siècle et les travaux de Pasteur ont permis de codifier les règles d'hygiène, d'asepsie et d'antisepsie, avec le progrès de l'anesthésie et de la chirurgie (Avril et Carlet, 1998). L'antisepsie n'a pas été introduite dans la pratique médicale jusqu'à ce qu'un médecin obstétricien hongrois, Ignaz Semmelweis, qui a travaillé sur l'hygiène des mains découvre la cause de la fièvre puerpérale (Dechoux, 2007). Plusieurs pays européens ont commencé à mettre en place des réseaux de surveillance des infections acquises à l'hôpital dans les années 1990. La plupart de ces réseaux étaient basés sur le modèle du Système de Surveillance des Infections Nosocomiales (SSIN) des *Centers for Disease Control and Prevention* des États-Unis (Guertarni, 2014).

Les infections du site opératoire (ISO) sont l'une des causes les plus fréquentes de morbidité postopératoire (WHO, 2016). Dans les pays à revenu élevé, environ 2 % des patients sont touchés par les ISO (WHO, 2016; Rosenthal et al., 2013). Il s'agit du deuxième type d'IAS le plus fréquent, malgré les faibles taux d'ISO aux États-Unis et dans les pays européens. Les ISO sont le type d'IAS le plus fréquemment rapporté dans les pays à faible et moyen revenu (11 épisodes d'ISO pour 100 interventions chirurgicales) (WHO, 2016).

Dans les pays à revenu élevé, les taux d'ISO pour les chirurgies gynécologiques sont similaires à ceux des autres procédures chirurgicales (Black et al., 2014). L'hystérectomie, pour des raisons gynécologiques, aurait un taux d'ISO de 1,7 % selon les données du *Centre for Disease Control* (CDC), USA (Black et al., 2014; Olsen et al. 2008). Avec un taux de 3 à 15 % aux États-Unis et un taux cumulé de 2,9 % dans les données du centre européen de contrôle des maladies pour 20 pays, les ISO sont la deuxième complication la plus fréquente dans les accouchements par césarienne après les infections des voies urinaires (Tableau 1) (Krieger et al., 2017; Shree et al., 2016).

Cependant, dans les études réalisées dans les pays à faible ou moyen revenu, le taux d'ISO après une césarienne varie de 10 à 20 % (WHO, 2016; Tran et al., 1998). En Tunisie, par exemple, le taux d'infection liée aux soins post-opératoires a été augmenté à 11,7 % et la densité d'incidence a été de 2,1 cas d'IAS pour 100 jours d'hospitalisation dans le service de chirurgie générale (Hamza, 2010).

Tableau 1. Micro-organismes à l'origine d'ISO dans les enquêtes de prévalence Européenne et nationale française et des surveillances anglaises et américaines en 2009/2010 (Sievert et al., 2013; Brahimiet Belkaid, 2017).

Micro-organismes	ENP France 2012	ECDC 2012	NHS GB 2012	NHSN EU 2009-2010
Cocci Gram positif	34	46,3	46,3	47
<i>Staphylococcus aureus</i>	15,9	17,9	33,9	30,4
Staphylocoques Coagulase négative	6,1	9,6	-	11,7
Entérocoques	5,6	14,6	-	5,9
Entérobactéries	45,5	32,5	33,1	22,4
Gram négatif non fermentant	11	12,8	-	6,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8,4	7,6	-	5,5
Bacilles anaérobies	4	2,5	-	
Fongiques	3,7	4,2	0,6	1,8

ENP: Enquête nationale de prevalence; ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control; NHS: National Health Service; NHSN : National Health care Safety Network.

En Algérie les données en matière d'incidence proviennent toutes des enquêtes réalisées dans le cadre d'un programme de surveillance des ISO. Toutes les études se concentraient sur l'ISO dans les services de chirurgie, l'incidence cumulative variait de 3,8 % à 17,4%. Peu d'études, sur les ISO chez les parturientes césarisées, ont été retrouvées en consultant les bases de données ; celle réalisée dans le service de Gynécologie Obstétrique au CHU de Béni Messous rapporte une incidence de 4,2% et celle réalisée à l'EHS de Tlemcen en 2010 rapporte un taux d'incidence de 7,87% (Tableau 2) (Brahimi and Belkaid, 2017).

Tableau 2. Incidence d'ISO dans les services de chirurgie en Algérie : données de la littérature (Brahimi et Belkaid, 2017).

Auteurs	Etablissements	Spécialités chirurgicales	Années	Taux d'ISO (%)
Belkaid et al. 2008	CHU de Béni Messous	ORL	2006	4,9
			2007	6,8
Benmami et al. 2007	CHU de Mustapha Bacha	Chirurgie digestive	2003	5,3
			2005	10,3
Bezzaoucha et 2007	CHU de Blida	Service de chirurgies	2005	0,9
			2007	0,4
Belkaid et al. 2008	CHU de Beni Messous	Ophthalmologie	2006	6,2
Tarfani et al. 2005	CHU de Bab El Oued	Service de chirurgies	2002	8,8
Toudefte et al. 2009	CHU de TiziOuzou	Chirurgie digestive et infantile	2004	7,56
			2007	5,56
Tayeb et al. 2010	EHS de Tlemcen	Gynécologie Obstétrique	2010	7,87

2. Définition

Une ISO désigne toute infection se développant suite à un acte chirurgical dans les 30 jours qui suivent l'opération ou dans l'année qui suit l'opération dans le cas de la mise en place d'une prothèse ou d'un implant chirurgical (**Control et Prevention, 2012**).

Les définitions d'ISO ont été modifiées en mai 2007 par le comité technique de lutte contre les infections nosocomiales et les infections liées aux soins (CTINILS) (**Brahimi et Belkaid, 2017**). Ces nouvelles définitions excluent l'avis du chirurgien de la surveillance des ISO. De ce fait l'incidence des ISO pourrait donc être artificiellement diminuée par la suppression de ce critère diagnostique. Or, l'actualisation récente des définitions du CDC a maintenu l'avis du chirurgien parmi les critères diagnostiques d'ISO. Sa suppression nuirait à la comparabilité internationale des données (**Brahimi et Belkaid, 2017**). En plus de ce critère, l'infection de la plaie opératoire peut être définie par la présence de pus au niveau de l'incision chirurgicale, qu'il s'agisse de pus sur les points de ponction cutanée, des fils de suture ou d'une béance de

la plaie opératoire avec émission de pus pouvant s'accompagner d'une nécrose cutanée, voir même d'une phlébite septique (Birgand, 2014).

3. Critères diagnostiques d'une infection du site opératoire

Selon le CDC, l'ISO peut intéresser une ou toutes les couches de tissus touchées par l'intervention (Figure 1), et être classée selon le niveau de profondeur.

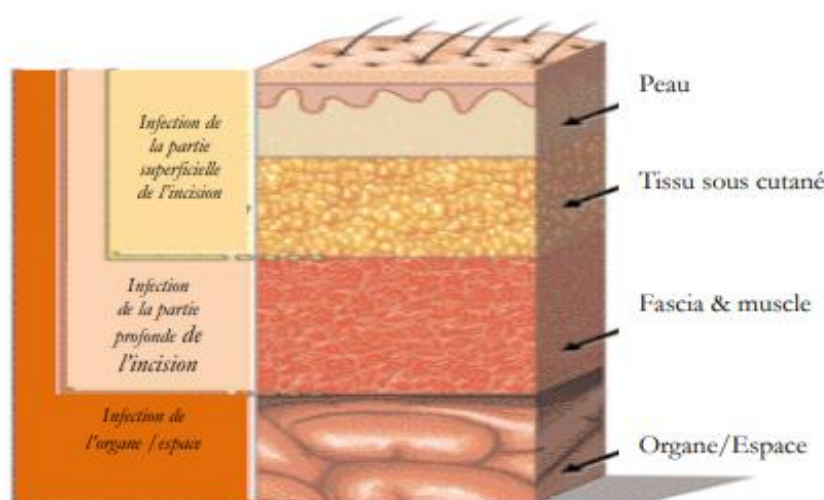


Figure 1. Classification anatomique des infections du site opératoire (Pear, 2007).

3.1. Infection superficielle de la plaie chirurgicale

L'infection concerne uniquement la peau ou les tissus sous-cutanés de l'incision avec présence d'au moins un des critères suivants :

- Sécrétion purulente, avec ou sans confirmation microbiologique, de l'incision superficielle ;
- Isolement de microorganismes dans une culture de liquide ou de tissu de l'incision superficielle obtenue sous asepsie ;
- Au moins un des signes ou symptômes d'infection suivants : douleurs spontanées ou à la palpation, tuméfaction localisée, rougeur ou chaleur, incision superficielle délibérément ouverte par le chirurgien, à moins que la culture des prélèvements microbiologiques de l'incision soit négative ;
- Diagnostic d'une infection superficielle de la plaie chirurgicale établi par un chirurgien ou le médecin impliqué (Di Benedetto et al., 2013) ;

3.2. Infection profonde de la plaie chirurgicale

L'infection implique les tissus mous et profonds de l'incision (fascia, couches musculaires) et au moins un des points suivants:

- Sécrétion purulente de l'incision profonde, mais ne provenant pas d'un organe ou d'une cavité profonde qui font partie du site opératoire ;
- Déhiscence spontanée d'une incision profonde ou ouverture délibérée par le chirurgien si le patient présente au moins un des signes ou symptômes suivants: fièvre (38°C), douleur localisée spontanée ou à la palpation, à moins que la culture des prélèvements microbiologiques du site chirurgical ne soit négative (prélèvement stérile) ;
- Abscess ou autre évidence d'infection qui implique l'incision profonde à l'évaluation directe, lors de réintervention, ou à l'examen histopathologique ou radiologique ;
- Diagnostic d'une infection profonde de la plaie chirurgicale établi par un chirurgien ou le médecin impliqué (Di Benedetto et al., 2013) ;

3.3. Infection du site opératoire d'organe ou de cavité

L'infection implique n'importe quelle partie du site chirurgical (organe ou cavité), en dehors de l'incision, qui a été ouverte ou manipulée durant l'opération et au moins un des points suivants:

- Sécrétion purulente par un drain à travers la peau dans un organe ou une cavité ;
- Présence d'organismes dans une culture de liquide ou de tissu d'un organe ou d'une cavité obtenue de manière aseptique ;
- Abscess ou autre évidence d'infection, impliquant l'organe ou la cavité, détecté lors d'une évaluation directe, une réintervention ou par un examen histopathologique ou radiologique ;
- Diagnostic d'une infection d'organe ou de cavité du site opératoire établi par un chirurgien ou le médecin impliqué (Di Benedetto et al., 2013) ;

4. Facteurs de risques liés à l'apparition de l'infection du site opératoire

4.1. Facteurs liés à la procédure chirurgicale

- **La durée de séjour préopératoire** : doit être la plus brève possible. Il existe une relation directe entre la durée de l'hospitalisation précédant l'intervention et le risque de survenue d'une infection puisque le taux d'infection après chirurgie « propre » passe

de 1,2 % lorsque l'intervention est effectuée le jour de l'admission à 2,1 % après une semaine d'hospitalisation et à 3,4 % après plus de deux semaines d'hospitalisation (Elek et Conen, 1957).

- **Préparation cutanée** : la peau est couverte naturellement par des germes saprophytes, et de poils qui peuvent être des gîtes bactériens importants. Plusieurs agents antiseptiques peuvent être utilisés. Selon certaines études, la chlorhexidine gluconate semble plus efficace que l'iodophore dans le cas des douches antiseptiques préopératoires pour la réduction du taux d'ISO. D'autre part, il est également établi, depuis 1971, que le rasage est considéré comme un facteur de risque d'ISO, d'autant plus que le délai entre rasage et incision est long (Dechoux, 2007).
- **La durée de l'intervention** : la prolongation du temps de l'acte opératoire peut augmenter la chance de contracter les infections. En effet, la flore du patient est susceptible de subir des modifications à l'occasion d'une période opératoire trop longue et ce risque est d'autant plus important en cas des chirurgies contaminées, sales ou infectées (Guetarni, 2014).
- **La technique chirurgicale, la dextérité et l'expérience du chirurgien** : jouent un rôle fondamental dans la survenue d'une ISO. Par ailleurs, l'absence de faute d'asepsie et de lésions viscérales accidentelles, une hémostase correcte, une manipulation douce des tissus et organes, l'exérèse soigneuse de tout tissu dévitalisé ainsi qu'une durée d'intervention réduite réduit considérablement le risque de survenue des ISO (Dechoux, 2007).
- **Asepsie et technique chirurgicale** : la technique chirurgicale joue un rôle central dans le risque infectieux. Elle est étroitement dépendante de l'expérience et l'habilité de l'opérateur. En effet, plusieurs études ont montré qu'il existe une relation significative entre les bonnes manœuvres de l'opérateur et un taux d'infection élevé. Aussi, d'autres facteurs rentrent en considération; il peut s'agir de la qualité techniques de l'intervention par apport au traumatisme, la qualité de l'hémostase, le type de drainage, etc...(Guetarni, 2014).
- **La présence de matériel étranger** : Le bloc opératoire et le matériel utilisé présentent un danger infectieux en cas d'une mauvaise stérilisation du matériel. Comme par exemple des fils de suture, ou en présence de matériel étranger en sous

cutané, certaines bactéries comme les staphylocoques qui adhèrent au matériel puis synthétisent un polysaccharide (biofilm) qui leur sert de protection contre les cellules phagocytaires et les antibiotiques (Ritter et Campbell, 1988; Yoshimura et al., 2003).

- **La notion d'urgence de l'intervention** : doit être prise en compte, car il est nécessaire que l'intervention soit effectuée rapidement. Plus la phase de préparation préopératoire est prolongée, plus cela augmente le risque d'apparition d'une ISO (Guetarni, 2014).

4.2. Facteurs liés aux patients

- **Age extrême** : l'âge influence le taux d'infection du site opératoire qui augmente aux âges extrêmes de la vie, au-dessous d'un an et au-dessus de 65 ans, en raison de la défaillance dans le système immunitaire (Dechoux, 2007).
- **La malnutrition** : elle fait partie des facteurs de risque préopératoires intrinsèques les plus importants dans la mesure où elle affaiblit l'activité des cellules impliquées dans le processus de phagocytose et crée un environnement favorable à défaut de cicatrisation (Braga et al., 1999; Yoshimura et al., 2003).
- **Le tabagisme** : La littérature témoigne des prévalences considérables des patients tabagiques développant une infection en post-opératoire. Durant-Pourre, dans son analyse multivariée, a conclu que le tabac est un facteur de risque de survenue d'une infection sur matériel prothétique (Waldvogel et al., 1991).
- **L'obésité** : les déhiscences qui en résultent en plus de l'excès des graisses recouvrant les muscles peuvent retarder ou troubler la bonne cicatrisation de la plaie. Ce qui classe l'excès de poids parmi les facteurs de risque personnels qui peuvent être évités en pré opératoire (Kitzis et Andreassian, 1993; Mangram et al., 1999).
- **Le diabète insulino-dépendant ou non** : un équilibre glycémique correct reste un préalable essentiel dans le cadre préventif des interventions chirurgicales. Cependant, le diabète sucré est considéré classiquement dans le premier rang des facteurs de risques des infections par les souches de Staphylocoques résistants à la méticilline (Krieger et al., 2017).

- **L'immunodépression** : est un état où le système immunitaire est affaibli et ne peut pas fonctionner normalement. Les personnes immunodéprimées sont plus susceptibles de contracter des infections et de développer des complications graves liées au déficit des défenses immunitaires surtout dans le cas d'un traitement corticoïdes, chimiothérapeutique et radiothérapeutique (**Rice, 2019**).
- **Infection à distance** : l'atteinte infectieuse d'un tractus à distance du site opératoire chez un sujet opéré, à savoir les infections dentaires ou le portage préopératoire de *Staphylococcus aureus* au niveau nasal, a été reconnu comme facteur de risque de survenue d'une ISO et peut être à l'origine d'une extension locale, régionale ou d'une dissémination hématogène des infections (**Birgand, 2014**).

5. Paramètres déterminants des infections du site opératoire

5.1. Pathogénèse

La contamination microbienne est un préalable indispensable à la survenue d'ISO (**Pittet et al., 2004**). Le Risque Infectieux Nosocomial (RIN) peut être défini comme la probabilité de survenue d'une infection suite à l'exposition de l'hôte à un micro-organisme potentiellement pathogène à l'une des étapes de l'intervention chirurgicale (préopératoire, peropératoire, postopératoire). D'une manière générale, le risque de survenue d'une ISO augmente avec le degré de contamination de la plaie. Il est de l'ordre de 1 à 2% pour la chirurgie propre, 5 à 10% pour la chirurgie propre-contaminée, 10 à 20% pour la chirurgie contaminée, et 30 à 40% pour la chirurgie sale (**Culve et al., 1991**). Il est communément admis qu'un site opératoire contaminé avec plus de 10^5 microorganismes par gramme de tissu, présente un risque accru d'ISO. Parfois, la dose de micro-organismes requise pour le processus infectieux peut être amplement plus faible mais une infection localisée pourrait éventuellement survenir. C'est le cas, lorsqu'un matériel étranger est posé dans le site opératoire (exp: 100 Staphylocoques par gramme de tissu introduit sur le fil de suture) (**Brahimi et Belkaid, 2017**).

Le risque d'infection du site chirurgical dépend également des facteurs suivants :

- La contamination du site opératoire par des germes, en fonction de leurs doses et virulences ;
- La résistance de l'hôte/facteurs dépendant du patient ;
- Les facteurs opératoires ;

5.2. Score ASA

Utilisé en médecine pour exprimer l'état de santé préopératoire d'un patient en tenant compte de son histoire et ses pathologies sous-jacentes. Il permet d'évaluer le risque anesthésique et d'obtenir un paramètre prédictif de mortalité et morbidité péri-opératoire. Son utilisation offre également la possibilité d'étudier et de déterminer les facteurs interférant dans l'infection post-opératoire et les mesures préventives :

- **ASA1** : Pas d'atteinte autre que celle justifiant l'intervention ;
- **ASA 2** : atteinte modérée et sans retentissement d'une grande fonction ;
- **ASA 3** : atteinte sévère et avec retentissement d'une grande fonction ;
- **ASA4** : atteinte d'une grande fonction avec risque vital ;
- **ASA 5**:Patient moribide (**Bjorgulet al., 2010**).

5.3. Critères de la classification d'Altemeier

La classification d'Altemeier est une classification des interventions chirurgicales selon le risque de contamination et d'infection post-opératoire. Ce facteur est étroitement dépendant du degré de contamination du site opératoire et à l'origine du schéma de classification des différents types de chirurgies(**Altemeier, 1984**). Cette classification est comme suit :

a) Classe propre :

- Plaie opératoire non infectée ;
- Pas d'inflammation ;
- Tractus respiratoire, alimentaire, génital ou urinaire ne sont pas touchés ;
- Plaie propre fermée et si nécessaire drainé par drainage clos ;
- Traumatisme fermé s'ils correspondent aux critères ;

b) Classe propre contaminée :

- Plaie opératoire qui pénètre les tractus respiratoire, alimentaire, génital ou urinaire sous contrôle et sans contamination inhabituelle ;
- Opérations impliquant le tractus biliaire, l'appendice, le vagin et l'oropharynx ;

c) Classe contaminée :

- Plaie accidentelle récente ;
- Opération avec faute d'asepsie majeur (massage cardiaque ouvert) souillage par le contenu du tractus gastro-intestinal ;
- Incision de zone inflammatoire non purulente ;

d) Classe sale/infectée :

- Ancienne plaie traumatique avec tissu dévitalisé et celle qui implique une infection clinique existant ou une perforation des viscères ;
- Le micro-organisme à l'origine de l'ISO doit être présent dans le champ opératoire avant l'incision ;

6. Source et origine de contamination des ISO

L'origine de l'infection constitue le premier maillon de la chaîne du déclenchement d'une infection. Cette origine est constituée par un agent infectieux et un réservoir dans lequel l'agent infectieux trouve les conditions nécessaires à sa multiplication (Figure 2). L'inoculation du site opératoire se fait dans la très grande majorité des cas en peropératoire, entre l'ouverture et la fermeture cutanée. La contamination post-opératoire, se fait soit par la cicatrice elle-même (qui est considérée comme étanche dès les 24 à 48 h post-opératoires), soit par voie hématogène à partir d'un foyer infectieux à distance, ce qui est beaucoup plus rare. Les pathogènes inoculés en peropératoire peuvent provenir de 2 types de réservoirs (Dechoux, 2007):

- **Réservoir endogène** : il s'agit de la flore des patientes présentes au niveau ou à contiguïté du site opéré. Ils sont abondants sur la peau et les muqueuses à haut risque de contaminer le site opératoire durant l'incision ou les manipulations chirurgicales. Ces micro-organismes sont inégalement répartis sur notre peau selon les zones concernées allant de 10^2 micro-organismes/cm² dans les zones sèches jusqu'à 10^7 dans les zones humides. Ce qui fait des chirurgies contaminées ou sur peau colonisée les plus susceptibles à développer les infections du site opératoire (Astagneau, 2009).
- **Réservoir exogène** : tout ce qui est autour du malade est colonisé par des microorganismes qui peuvent contaminer le site opératoire. L'hygiène des mains l'utilisation des masques naso-pharyngiens et des gants semblent être la condition principale avant d'initier n'importe quelle intervention chirurgicale et même la plupart des manipulations médicales. En effet la flore exogène est principalement constituée par des bactéries aérobies (bactéries à Gram négatif ou à Gram positif) présentes dans l'environnement hospitalier du bloc opératoire, dans la salle de soin et qui sont

transportées et véhiculées principalement par le personnel soignant et ou le matériel non stérile (Creanor et al., 2012).

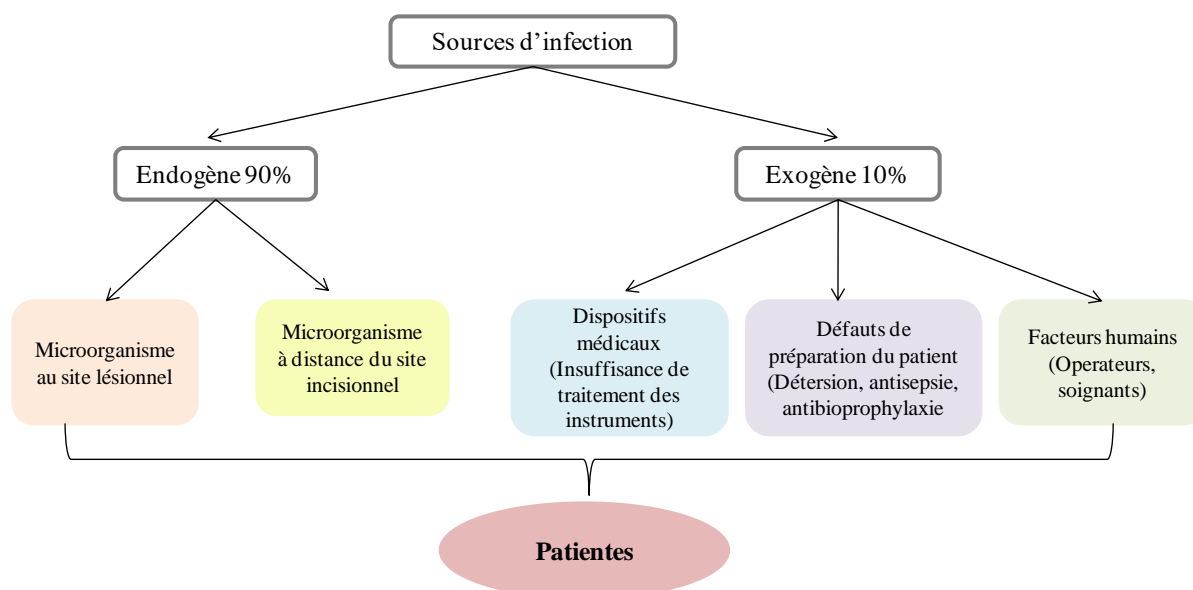


Figure 2. Sources et origines de contamination des ISO (Francioli et al., 1996).

7. Les infections post-chirurgicales en Gynécologie Obstétrique

La gynécologie obstétrique est historiquement la première discipline médicale à avoir fait l'objet d'une recherche d'une prophylaxie efficace de l'infection nosocomiale. C'est le hongrois Semmelweis (1818-1865) qui décrit, pour la première fois, le mode de transmission de la fièvre puerpérale et le moyen de l'interrompre en faisant déduction que la cause de cette maladie était ce qu'il appela le « poison cadavérique ». Il conclut que des parcelles cadavériques adhérentes aux mains des étudiants en médecine étaient introduites dans les voies génitales des femmes lors de l'examen obstétrical. Il fit alors installer des cuvettes contenant du chlorure de chaux et exigea aux accoucheurs un lavage méticuleux des mains avant tout examen (Dechoux, 2007).

Effectivement, diverses situations à risque infectieux sont reconnues qui peuvent être liées aux différentes interventions obstétricales.

7.1. Césariennes

La césarienne est une incision abdominale qui appartient à la classe 2 d'Altemeier. Ses indications sont multiples; elles peuvent être faites soit dans le cadre d'un programme froid ou dans le cadre d'urgence d'ordre maternel à savoir prééclampsie, diabète, HTA, utérus

cicatriciel, dystocie dynamique, ou d'ordre fœtal à savoir asphyxié fœtal, dépassement de termes, virage du liquide amniotique, présentation du siège, etc...

Le risque infectieux lié à la césarienne est essentiellement l'endométrite et ses complications à partir des bactéries vaginales. Le taux global d'endométrites post-césariennes a été estimé entre 10 et 45 % selon les diverses circonstances obstétricales, soit 5 à 20 fois plus important que pour l'accouchement normal. Ce risque peut atteindre jusqu'à 95 % lorsque l'utérus a été préalablement et abondamment contaminé par la flore vaginale contre 10% quand le liquide amniotique est stérile. Au total, la morbidité infectieuse post-césarienne toucherait une femme sur trois en l'absence d'antibioprophylaxie (**Gomaa et al., 2021**).

Selon Awadalla et al.(**1986**) :

- Le risque infectieux est multiplié par 3,6 quand les cultures bactériennes faites lors de la césarienne sur le segment inférieur après expulsion sont positives ;
- Le risque infectieux est multiplié par 2,7 après rupture prématurée des membranes de plus de six h avant la césarienne ;
- Le risque infectieux est multiplié par 1,75 quand la femme est en travail ;
- Le risque infectieux est multiplié par 2,9 quand il y a eu tocographie interne ;

D'après Hagglun, la césarienne en travail ou en urgence est davantage à risque que la césarienne programmée (25 % d'infection contre 9 %). Les facteurs de risque qu'il décrit sont les suivants :

- Une culture positive de la plaie opératoire (prélèvement sur la plaie utérine) ;
- Un arrêt de la progression du travail ;
- Des signes infectieux ou des facteurs de risque infectieux peropératoires: fièvre supérieure à 38°C, rupture prématurée des membranes, terme supérieur à 42 semaines et manœuvres telles qu'apparaît une rupture artificielle de la poche des eaux et tocographie interne ;
- Une durée d'intervention supérieure à 1'heure et une perte sanguine supérieure à 800 ml ;

Les agents pathogènes en cause sont d'une grande variété et sont issus le plus souvent de la flore vaginale maternelle:

- Des bactéries à Gram négatifs aéro-anaérobies (*E.coli*, *Klebsiella*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter*) dans 10 à 20 % des cas ;
- Des bactéries anaérobies dans 45 % des cas ;
- Le staphylocoque doré jouerait un rôle non négligeable ;

- Les streptocoques aussi : *S. agalactiae* (19 % des cas), streptocoques du groupe G et *S. pyogenes* ;
- Les mycoplasmes seraient responsables de 5.6 % des infections après césarienne ;

L'agent pathogène *Haemophilus influenzae* est plus rarement trouvé mais sa présence induit une endométrite du post-partum même chez les femmes asymptomatiques à l'accouchement.

Par ailleurs, d'autres situations obstétricales ont été aussi incriminées dans la survenue d'ISO : la rupture prématurée des membranes, ouverture prématurée du col, touchés répétés en fin de grossesse et pendant le travail, tocographie interne, pose de prostaglandines et délivrance artificielle.

D'autres situations à risque infectieux sont reconnues qui peuvent être liées aux différentes interventions gynécologiques : hystérectomie et mastectomie.

7.2. Hystérectomie

L'hystérectomie, est une intervention chirurgicale qui appartient à la classe 2 de la classification d'Altemeier «chirurgie propre contaminée». Pour ce type d'intervention chirurgicale le risque infectieux est double, car il peut être lié à la flore vaginale lorsque le vagin est ouvert ou à la flore cutanée lorsque la voie est abdominale. Certaines études ont estimé le risque d'infection post-hystérectomie à des taux qui varient entre 12 à 64 % pour l'hystérectomie par voie vaginale, et 0 à 38 % pour l'hystérectomie par voie abdominale en l'absence d'une antibioprophylaxie (Sweet et Gibbs, 2009). Cette procédure chirurgicale réunit également d'autres facteurs qui peuvent influencer la survenue d'une infection du site opératoire à savoir :

- La durée d'hospitalisation préopératoire ;
- La préparation cutanée ;
- La durée de l'intervention : le risque infectieux augmente au-delà de 2 h d'intervention pour l'hystérectomie quelle que soit la voie vaginale ou abdominale ;
- La pathologie d'origine : le traitement des cancers utérins, par exemple, augmente le risque infectieux en raison de la durée de l'intervention, des délabrements tissulaires parfois importants et des curages lymphatiques ;

Quant aux agents pathogènes identifiés, on note essentiellement *S.aureus* en particulier au niveau de la paroi, suivi par les entérobactéries, les entérocoques, *Streptococcus agalactiae* et

les bactéries anaérobies *Bacteroides*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus* (EleketConen, 1957; Sweet et Gibbs, 2009).

D'autres interventions peuvent également exposer à un risque infectieux tel que : les manœuvres trans-cervicales, la pose de stérilet, l'exploration endo-utérine, l'hystéroscopie, l'hystérogaphie, la biopsie de l'endomètre et le curetage utérin.

7.3.Chirurgie du sein

La chirurgie du sein, considérée comme une chirurgie propre, peut être partielle (tumorectomie) ou radicale (mastectomie) (Lilani et al., 2005). Le risque infectieux lié à une telle procédure reste faible et semble être lié essentiellement à l'état d'immunodépression des patientes. En effet, les traitements de chimiothérapie et de radiothérapie fournissent un terrain favorable aux agents pathogènes opportunistes(Nkondjock et Ghadirian, 2005). La nature des lésions préexistantes et l'état du revêtement cutané de la glande mammaire augmentent également le risque et diversifient la nature des bactéries en cause.Selon les donnée de la littérature,les bactéries isolées lors des infections des plaie mammaires sont respectivement *S. aureus* (45 %), les entérobactéries (22 %), *Pseudomonas aeruginosa* (11 %) et des agents infectieux divers dans 22 % des cas (Dechoux, 2007).

Nous remarquons une large diversité des agents pathogènes liées aux complications infectieuses. Cette diversité dépend principalement de la nature de la procédure chirurgicale du site opératoire, de l'environnement hospitalier, de la rigueur de l'opérateur mais très souvent aussi de la façon dont sont réalisés les prélèvements pour étayer le diagnostic (prélèvement vaginal, endocervical, aspiration transcervicale,etc...), les critères d'interprétation de ceux-ci et les moyens de diagnostic utilisés modifient considérablement la part attribuée à ces différents agents étiologiques.

Chapitre 2

Bactéries isolées d'infections du site opératoire

1. Agents pathogènes associés

Les maladies infectieuses, considérées comme une préoccupation planétaire, sont causées par des microorganismes vivants, au même titre que les virus et les champignons. Elles ont été découvertes à la fin du 17^{ème} siècle par Anthoni Van Leeuwenhoek, naturaliste hollandais, qui inventa la microscopie (**Boutibonnes, 2003**). Ce sont des organismes procaryotes qui ne possèdent pas de noyau, mais un ADN chromosomique circulaire situé dans le cytoplasme. De nombreuses bactéries peuvent contenir une autre structure d'ADN extra-chromosomique, appelée plasmide transféré d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice par divers mécanismes génétiques. Les bactéries sont entourées d'une paroi complexe et possèdent souvent des flagelles. Ces microorganismes peuvent être classés et identifiés en fonction de plusieurs paramètres, notamment la morphologie microscopique, la morphologie macroscopique, le besoin nutritionnel, le besoin respiratoire, mobilité et présence de spores. La principale inquiétude soulevée par ces microorganismes, est la résistance aux antibiotiques qui exige une attention particulière et nécessite la prise de mesures spécifiques. Pour la suite de notre travail, il semble important de souligner quelques caractéristiques de certaines bactéries qui font partie de notre volet de recherche.

1.1. Les entérobactéries

Les entérobactéries sont des bactéries ubiquitaires retrouvées partout, dans le sol, dans l'eau, dans certaines denrées alimentaires (**Moussa et Moussaoui, 2016; Sara, 2020**), mais aussi comme leurs noms l'indiquent, elles se trouvent principalement dans le tube digestif plus exactement dans le côlon de l'homme et des animaux. Elles recouvrent également d'autres cavités du corps humain comme la cavité buccale et la cavité vaginale (**Avril et al., 2000**). Ces microorganismes sont très hétérogènes, pour ce qui est de leur pathogénicité et de leur écologie. Les espèces qui composent la famille des entérobactéries sont en effet soit parasites (*Shigella*, *Yersinia pestis*), soit commensales (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*), soit saprophytes (*Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*). Sur le plan taxonomique la classification récente (hybridation ADN-ADN) recense 31 genres et plus de 140 espèces. Parmi tous les genres et espèces décrits, une vingtaine est associée aux pathologies humaines (**Avril et al., 2000; Joly et Reynaud, 2003**).

1.1.1. *Escherichia coli*

a) Habitat

Escherichia coli (*E.coli*) découverte depuis 1885, communément appelée « colibacille », hôte normal du tube digestif, est l'espèce bactérienne qui a été le plus étudiée pour des travaux de physiologie et de génétique. Elle représente l'espèce type du genre *Escherichia* (Avril et al., 2000).

b) Caractères bactériologiques

Ce bacille de 2 à 3 µm de long sur 0,5 µm de large, généralement polymorphe dans ses conditions optimales et sur les milieux de culture sélectifs, se multiplie rapidement entre 18 et 24 h. Les colonies obtenues sont rondes, plates et à bords réguliers. Ce sont des bactéries mésophiles avec une température de croissance de 37 °C et un pH optimal compris entre 7,2 et 7,4 (Miliotis et Bier, 2003). Les caractéristiques biochimiques d'*E. coli* permettent de la distinguer des autres espèces par la fermentation de lactose, la production d'indole, l'absence d'uréase, l'absence de production d'oxydase, l'absence de croissance sur le citrate et de production d'H₂S (Le Minor et Richard, 1993).

c) Pouvoir pathogène

E. coli est l'une des espèces bactériennes le plus souvent rencontrée en pathologie humaine, responsable des pathologies intestinales comme les diarrhées aiguës (Freney et al., 2007). Elle est également responsable d'infections nosocomiales, notamment des infections des plaies chirurgicales et des bactériémies. Les souches d'*E.coli* pathogènes peuvent être séparées en deux grands groupes en fonction du type d'infection dont elles sont à l'origine; il s'agit des *E. coli* entéro-toxinogènes, entéro-hémorragiques, entéro-agrégatives, à adhésion diffuse, entéro-pathogènes et entéro-invasives (Boucher et al., 2011)

1.1.2. *Enterobacter cloacae*

a) Habitat

Enterobacter cloacae (*E. cloacae*) fait partie de la flore normale du tractus gastro-intestinal de l'homme et des animaux. Elle est largement présente dans l'environnement; on la trouve dans les eaux, sur le sol, sur la peau et les muqueuses (Boudjemaa, 2015; Keller et al., 1998; Avril et al., 2000).

b) Caractères morphologiques

Ce bacille a Gram négatif anaérobie facultatif, mesurant 0,6 à 1 µm de diamètre et 1,2 à 3 µm de longueur, mobile grâce à des flagelles péritriches, est doté de pilus de classe 1 non sporulé. Dans des conditions optimales de croissance et sur gélose nutritive, *E. cloacae* forme des colonies rondes avec un diamètre de 2 mm, légèrement plates avec des bords irréguliers, donnant l'aspect classique des colonies d'entérobactéries (**Garrity, 2007**). Les caractéristiques biochimiques se révèlent par une réaction positive au test de Voges-Proskauer, production du citrate, absence d'indole et production d'acide à partir de la fermentation du glucose, et donnent une réaction négative à l'épreuve au rouge de méthyle (**Hart, 2006; Rayane et Elhouda, 2022**).

c) Pouvoir pathogène

Ce pathogène opportuniste a pris une importante croissance du fait de son implication dans diverses infections nosocomiales y compris les bactériémies, les infections urinaires, les infections respiratoires, les infections intra-abdominales ou encore les infections tissulaires après une plaie souillée par de la terre. Il est également responsables des infections du système nerveux central et des infections ophtalmiques (**Rayane et Elhouda, 2022**). Les infections à *Enterobacter* peuvent nécessiter une hospitalisation prolongée avec multiples études d'imagerie et de tests de laboratoire et l'utilisation d'agents antimicrobiens puissants et coûteux (**Lockhart et al., 2007**).

1.1.3. *Klebsiella pneumoniae***a) Habitat**

Connue autrefois sous le nom de pneumobacille de Friedlander, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) fait partie des bacilles a Gram négatif. C'est une bactérie commensale de l'intestin et saprophytes des voies respiratoires supérieures (**Freney et al., 2007; Garrit, 2007**).

b) Caractères bactériologiques

K. pneumoniae se développe sur les milieux de culture d'isolement pour entérobactéries à savoir gélose Hektoen, gélose Mac Conkey et milieu Eosine bleu de méthylène (EMB). Dans des conditions d'incubation optimales, les bactéries donnent un aspect de colonies de type mucoïde; elles sont volumineuses avec un diamètre de 3 à 4 mm, bombées, brillantes, opaques et parfois filantes à l'anse de platine. En milieu liquide (bouillon nutritif, eau

peptonée), elles forment un dépôt muqueux et une collerette visqueuse en surface (**Freney et al., 2007**). Cette espèce se caractérise par une réaction de VP positive, nitrate réductase positive, uréase positive et qui fermente le glucose avec production de gaz (**Janda et Abbott, 2006**).

c) **Pouvoir pathogène**

K. pneumoniae est un pathogène opportuniste responsable d'infections communautaires, d'infections nosocomiales et d'infections intra-abdominales. Il occupe une place importante dans la pathologie infectieuse du nouveau-né et les infections nosocomiales à *K. pneumoniae* fréquentes dans les services de néonatalogie, notamment dans les unités de soins intensifs et chez les prématurés. Cette bactérie, aussi décrites parmi la cause des infections suppuratives, urinaires, respiratoires et biliaires peut être à l'origine de bactériémie et surtout de septicémie de pronostic sévère (**Gadou, 2019**).

1.1.4. *Proteus mirabilis*

a) **Habitat**

C'est une bactérie commensale de l'intestin de l'homme et des animaux. Fréquemment retrouvée aussi dans les sols et les eaux usées, elle possède la caractéristique de décomposer la matière organique (**Garrity, 2007**).

b) **Caractères bactériologiques**

Cette bactérie a Gram négatif prend la forme de bacille mobile, ne possède pas de caractères culturels exigeants et pousse bien sur les milieux ordinaires sélectifs aux entérobactéries. A une température de 37 °C et après 24 h d'incubation, les bactéries donnent l'aspect de grosses colonies, non hémolytiques, envahissant la surface de la gélose au sang en ondes concentriques (cette propriété est liée à la mobilité exceptionnelle que lui confèrent plusieurs centaines de flagelles) (**Zerrouki, 2020**). Sur BCP, les colonies sont petites, transparentes en 24 h, lactose négatives, ne formant pas de nappe. Le métabolisme respiratoire est aéro-anaérobie et parmi les caractéristiques différentielles de *P. mirabilis* on cite l'uréase positive, capable de transformer l'urée en ammoniac, alcalinisant l'urine.

c) **Pouvoir pathogène**

P. mirabilis est à l'origine de 90% de toutes les infections par *Proteus spp* chez l'homme. Hormis les infections urinaires qu'elle peut provoquer, elle peut être aussi à l'origine des infections de plaies et des infections des voies respiratoires inférieures mais rarement des

septicémies. Des méningites à *Proteus* ont été décrites chez le nourrisson. Ces bactéries sont aussi isolées de produits pathologiques variés : sécrétions trachéo-bronchiques, brûlures et pus divers. Ces espèces sont souvent présentes en grande quantité dans les selles lors des diarrhées par dysmicrobisme intestinal (Avril et al., 2000b; Frenod, 2006).

1.1.5. *Morganellamorganii*

a) Habitat

Morganella morganii (*M. morganii*) se trouve dans l'environnement et dans les voies intestinales des humains, des mammifères et des reptiles (O'Hara et al., 2000).

b) Caractères bactériologiques

M. morganii est un BGN mobile qui se présente sous forme de colonies plates et qui mesure 0,6 à 1 µm de diamètre et 1 à 3µm de longueur (Klebsiella, Serratia, et Cedecea 2016). Les Morganelles ont la capacité de produire l'uréase et le tryptophane désaminase. Elles fermentent le glucose, réduisent le nitrate en nitrite et métabolisent le tryptophane en indole (O'Hara et al., 2000).

c) Pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène de cette bactérie se manifeste par des infections des voies urinaires, des voies hépatobiliaires, des infections de la peau et des tissus mous. Elle occasionne des infections opportunistes chez des patients immunodéprimés telles que les infections extra-intestinales ou encore les infections materno-fœtales (O'Hara et al., 2000). Par conséquent, la plupart des cas de bactériémie à *M. morganii* sont des infections opportunistes acquises dans la communauté (Lee et Liu, 2006).

1.2. Les bacilles à Gram négatif non fermentaires

Les bacilles à Gram négatif non fermentant sont des bactéries de l'environnement responsables d'infections opportunistes chez les patients immunodéprimés. En plus de leur multirésistance naturelle aux antibiotiques, d'autres mécanismes de résistance acquis peuvent être observés. La taxonomie de ces genres bactériens a évolué en parallèle des progrès technologiques. Le séquençage des génomes permet aujourd'hui d'appréhender les schémas évolutifs. L'adaptation de certaines souches à l'Homme constitue, par ailleurs, un modèle d'étude pour corréler les modifications génétiques avec d'éventuelles conséquences phénotypiques. Au-delà des genres *Pseudomonas* et *Acinetobacter*, d'autres genres bactériens

émergent au cours d'infections aiguës survenant chez des patients immunodéprimés et/ou porteurs de dispositifs invasifs, ou lors d'infections chroniques (Lucet et Birgand, 2011).

1.2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

a) Habitat

P. aeruginosa est une bactérie ubiquitaire, comme toutes les espèces du genre *Pseudomonas* ou apparenté. Ces bactéries ont des exigences nutritives peu importantes et sont capables de survivre dans l'environnement (eaux, surface, air et aliments) et particulièrement en milieu humide (Garrity, 2007).

b) Caractères bactériologiques

Ces bacilles à Gram négatif, non capsulés, mobiles, se multiplient sur des milieux non enrichis ou sélectifs. Les colonies poussent en 24 h et sont plates, à bord irrégulier prenant un aspect irisé métallique avec le temps. Cette espèce a un caractère biochimique différentiel d'oxydase positive et un pigment vert brillant diffusable caractéristique qui est dû à la présence du pigment pyocyanine (Trépout, 2008).

c) Pouvoir pathogène

P. aeruginosa est classée dans les pathogènes opportunistes. Dans les infections communautaires, elle est responsable principalement de broncho-pneumopathies évoluant sur un mode chronique dans la mucoviscidose et les affections respiratoires. Dans les infections nosocomiales, elle est impliquée dans les pneumopathies chez les malades sous respirateurs, les infections urinaires, les infections cutanées secondaires à des brûlures, et les infections ostéoarticulaires sur matériels (Trépout, 2008).

1.2.2. *Pseudomonas putida*

a) Habitat

P. putida a comme principal habitat le sol, l'eau, les plantes et les denrées alimentaires avariées. Elle peut être aussi présente dans la flore oropharyngée.

b) Caractères morphologique

Espèce psychrophile, elle peut contaminer le sang utilisé en transfusion (lors du prélèvement ou par du matériel mal stérilisé) (Volkeet al., 2020). Les méthodes moléculaires ont apporté un bouleversement dans le genre *Pseudomonas* avec la création de cinq groupes

d'homologie tout à fait distincts. *P. putida* appartient au groupe I: Genre *Pseudomonas* stricto-sensu (118 espèces répertoriées en 2005) (Garrity, 2007). Sur le plan biochimique, elle se caractérise par un métabolisme respiratoire aérobie strict et une production de la pyoverdine, pigment jaune/vert fluorescent. La plupart des souches peuvent croître à 4°C (Avril et al., 2000).

c) Pouvoir pathogène

C'est un pathogène opportuniste qui peut être isolé de plaies, d'infections urinaires, de salpingites et de bactériémies. Sa virulence est quasiment nulle chez un individu sain; sa mise en cause dans un processus pathogène ne se fera qu'en fonction du contexte clinique (Volke et al., 2020).

1.2.3. *Acinetobacter pittii*

a) Habitat

Le genre *Acinetobacter* appartient à la famille des *Moraxellaceae*. La taxonomie de ce genre est complexe et sa réorganisation a été initiée en 1986 (Garrity, 2007). Les hybridations ADN-ADN ont permis d'individualiser des groupes d'hybridation à l'intérieur du genre (5 groupes sont clairement individualisés) mais ce genre est très hétérogène et certaines espèces pourraient appartenir à des genres différents. À l'heure actuelle, 32 espèces génomiques sont décrites. Les bactéries du genre *Acinetobacter* sont des bactéries ubiquistes (eau, sol, végétaux) (Gribi, 2016). Chez l'homme, les *Acinetobacter* font partie de la flore cutanée de la peau saine, et sont souvent retrouvés dans les localisations humides (creux axillaires, aines et espaces interdigitaux) (Avril et al., 2000).

b) Caractères bactériologiques

Ces Bacilles à Gram négatif, immobiles, non sporulés, parfois capsulés, trapus, souvent associés en paire ou en courtes chaînes, donnent des formes filamenteuses dans les cultures âgées. Aérobie stricts, ils se cultivent facilement sur milieux usuels; leur température d'incubation peut atteindre les 44°C (Gribi, 2016).

c) Pouvoir pathogène

Concernant le pouvoir pathogène, *A. pittii* est responsable principalement d'infections nosocomiales (environ 10% des infections nosocomiales), septicémies, méningites, suppurations diverses, infections urinaires et pneumopathies. Leur grande résistance aux

antibiotiques rend le traitement de ces infections difficile (Garnacho-Monte et al., 2010; Gribi, 2016).

1.3. Les cocci à Gram positif

Les cocci à Gram positif ont de tout temps occupé une place importante dans les infections aussi bien communautaires qu'hospitalières. Ces infections surviennent sur tous les terrains et sont responsables des tableaux cliniques très divers et de gravité très variable (Falcone et al., 2002; He et al., 2005). Elles sont toujours préoccupantes par leur survenue, leur gravité sur certains terrains et leur augmentation considérable au cours de la dernière décennie de la résistance des cocci à Gram positif aux antibiotiques, aussi bien anciens que récents, avec l'apparition de souches multirésistantes, particulièrement en milieu hospitalier. Parmi les cocci Gram positif, tout particulièrement *Staphylococcus spp*, *Enterococcus spp* et *Streptococcus pneumoniae*, sont responsables d'infections redoutables dans les pays industrialisés comme dans les pays en voie de développement, et sont au tout premier rang des bactéries responsables d'infections nosocomiales (Ouedraogo, 2020).

1.3.1. *Staphylococcus aureus*

a) Habitat

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) est un pathogène humain majeur qui a été mis en évidence en 1881 par Alexander Ogston (Ogston, 1881). L'Homme est le principal réservoir, qu'il soit malade ou porteur sain hébergeant des staphylocoques au niveau des fosses nasales, de l'intestin, de la peau ou de ses annexes glandulaires (aisselles, périnée). Les staphylocoques contaminent également les surfaces, l'air et l'eau. Leur transmission est avant tout interhumaine directe et manu portée (Alioua, 2015).

b) Caractères bactériologiques

Après une analyse microscopique d'infections purulentes, Ogston a découvert des bactéries rondes, groupées en forme de grappes de raisin d'où la nomination grecs *staphyle* de grappe de raisin. Il est maintenant établi que *S. aureus* est une bactérie Gram-positive, aéro-anaérobie facultative qui produit une catalase et une coagulase, Dans des conditions optimales, *S. aureus* est capable de croître sur une large gamme de milieux de culture, sélectifs (ex. les géloses Chapman, et Baird Parker), ou non sélectifs (ex. un milieu gélosé enrichi au sang, une gélose nutritive, ou une gélose cœur-cervelle). Sur une gélose au sang,

les souches typiques de *S. aureus* donnent des colonies lisses, convexes avec des diamètres de 1 à 3 mm, de couleur jaune dorée due aux caroténoïdes, et sont souvent hémolytiques (α -hémolysine) (Freney et al., 2007).

c) **Caractères bactériologiques**

S. aureus est typiquement porté de façon asymptomatique par l'homme et les animaux. Cependant, il est responsable d'une large gamme d'états pathologiques nécessitant un traitement. La susceptibilité de l'hôte et la voie d'entrée déterminent la nature et l'étendue de la maladie, parmi lesquels on cite les infections de la peau et des tissus mous (SSTIs) comprenant la folliculite, le furoncle, l'anthrax, l'abcès, la cellulite, l'impétigo, les plaies postopératoires et les ostéomyélites (Cohen, 2007). Les souches portant des toxines particulières peuvent être associées à des états pathologiques spécifiques, y compris le syndrome staphylococcique de la peau ébouillantée SSSS pour «Staphylococcal Scalded Skin syndrome», le syndrome du choc toxique TSS pour « Toxic Shock Syndrome » (Novick et Subedi 2007), la toxi-infection alimentaire (Le Loir et al., 2003), et la pneumonie nécrosante (Labandeira-Rey et al., 2007). Cette bactérie peut aussi provoquer une septicémie ou sepsis, lorsque le flux sanguin est infecté. A titre d'exemple entre 1995 et 2002, 20% de septicémie nosocomiales aux États-Unis ont été causées par *S. aureus* (Alioua, 2015).

1.3.2. *Staphylococcus epidermidis*

a) **Habitat**

S. epidermidis fait partie des Staphylocoques à coagulase négative qui constituent l'essentiel de la flore résidente de la peau de l'homme et des animaux et peut être une bactérie transitoire dans d'autres flores humaines (Arasu et al., 2008).

b) **Caractères bactériologiques**

L'amélioration des techniques d'identification des Staphylocoques a permis de mieux différencier les espèces de Staphylocoques à coagulase négative. Ce sont des bactéries ubiquitaires, cocci à Gram positive, qui donnent sous microscope un aspect en amas immobiles. Comme tous les Staphylocoques, cette espèce n'a pas d'exigence nutritive particulière. Son métabolisme respiratoire est aéro-anaérobie facultatif. Les colonies apparaissent lisses, rondes, bombées, non pigmentées, non hémolytiques sur gélose au sang et sur milieu de Chapman; les colonies sont mannitol négatif. Les caractères biochimiques se

caractérisent par une catalase +, uréase +, ADH arginine dihydrolase+, pas d'oxydase et mannitol- (Arasu et al., 2008).

c) Pouvoir pathogène

Concernant le pouvoir pathogène chez l'homme, *S. epidermidis* a été décrite comme responsable d'infections ostéoarticulaires, notamment sur prothèses, de bactériémies, d'endocardites, de péritonites chez des patients en dialyse péritonéale et de méningite sur matériel de dérivation du LCR. Bien souvent ces infections apparaissent chez des patients ayant du matériel étranger. Des études ont montré sa capacité d'adhésion et de formation de biofilm (Frappier et al., 1955).

1.3.3. *Enterococcus faecalis*

a) Habitat

Enterococcus faecalis (*E. faecalis*) est l'espèce du genre *Enterococcus*, la plus fréquemment isolée chez l'homme. Cette bactérie fait partie de la flore digestive de l'homme et des animaux. Il peut, par contamination de voisinage, coloniser la peau notamment la région périnéale et le vagin. Elle peut également se rencontrer dans l'environnement : eaux usées, eau douce, sol et aliments (Toledo-Arana et al., 2001).

b) Caractères bactériologiques

Les caractères morphologiques de cette bactérie à Gram positif se présentent par une coque d'aspect ovoïde en courtes chaînes, immobile en bouillon et capsulée. Elle possède un profil respiratoire anaérobie facultatif et aérobie tolérant (Porter, 2021). En culture, elle pousse sur gélose au sang, nécessite une incubation à 45 °C pendant 24 h et engendre des colonies opaques blanchâtres et sans hémolyse. Le métabolisme biochimique spécifique des entérocoques leur permet de pousser dans des milieux hypersalés composés d'une teneur en sel de 6,5% et de 40% de bile (Facklam et al, 2002).

c) Pouvoir pathogène

Leur pouvoir pathogène est connu principalement par des infections urinaires, le plus souvent secondaires après exploration urologique, d'endocardites évoluant sur un mode subaigu, sur valves natives ou sur prothèse (Sava et al., 2010). *E. faecalis* peut aussi causer des infections post-chirurgicales de la paroi abdominale, la méningite, et la bactériémie

(Frimow, 1994). Il a été, de plus en plus, isolé dans un grand nombre de cas de lésions cancéreuses orales et dans les cancers du côlon humain (Strickertsson et al., 2013).

1.3.4. *Enterococcus faecium*

a) Habitat

Enterococcus faecium (*E. faecium*) est, après *E. faecalis*, une des espèces du genre *Enterococcus*, la plus fréquemment isolée chez l'homme (Devriese et al., 2006). *E. faecium* est un agent pathogène ubiquitaire qui fait partie de la flore digestive de l'homme et des animaux. Il peut par contamination de voisinage coloniser la peau, notamment la région périnéale et le vagin. Il se rencontre aussi dans l'environnement : eaux usées, eaux douces, sol et contamine les aliments (Klein, 2003).

b) Caractères bactériologiques

Cette bactérie est unecocci à Gram positif ayant les mêmes caractéristiques bactériologiques qu'*Enterococcus faecalis*, retrouvée majoritairement dans des échantillons d'urines, d'hémoculture, et de pus.

c) Pouvoir pathogène

Cette bactérie est isolée d'endocardite, d'infections intra-abdominales, d'infections abdomino-pelviennes, d'infections de la peau et des parties molles et d'infections néonatales. Lors d'une pathologie infectieuse, le caractère polymicrobien des surinfections à *E. faecium* est souvent associé à des bactéries d'origine digestive (entérobactéries et anaérobies) (Sava et al., 2010).

Chapitre 3

Mécanismes de résistances aux antibiotiques

1. La résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance bactérienne aux antibiotiques a été reconnue par l'OMS comme l'une des plus graves menaces pesant sur la santé mondiale. Son développement et sa propagation change la médecine au fil des années. Cette problématique prend des proportions alarmantes au niveau diagnostique et thérapeutique, induite par l'utilisation abusive et irrationnelle des antibiotiques en santé humaine et animale. L'augmentation de la résistance bactérienne aux antibiotiques depuis plusieurs décennies est un enjeu de santé publique majeur, engendrant des difficultés à traiter les patients. Parmi les conséquences engendrées, on cite l'augmentation de la durée des soins et de la morbidité associée aux infections, ainsi que la mise en cause du pronostic vital. De nombreux travaux s'intéressent à la résistance aux antibiotiques, mais peu d'entre elles se basent sur des données de vie réelle pour une meilleure prise en charge de cette problématique.

Au milieu du siècle dernier, la proposition de nouveaux antibiotiques par des firmes pharmaceutiques a permis de traiter largement de nombreuses infections. Les antibiotiques ont été largement utilisés en médecine humaine et animale au cours des décennies suivantes en raison de leur remarquable efficacité. A la suite de cet usage massif, la résistance des bactéries à ces médicaments est augmentée et leur consommation mondiale en médecine humaine a augmenté de 40% entre 2000 et 2010 (**Van Boeckel et al., 2014**).

On définit la résistance aux antibiotiques d'une bactérie comme l'absence d'effet d'un antibiotique pour lequel l'espèce bactérienne est naturellement sensible, c'est-à-dire pour laquelle on attend un effet thérapeutique lors d'un traitement à dose habituelle par voie générale (**Walsh, 2003; Courvalin, 2008 ; Davies, 2010 ; Waglechner et Wright, 2017**). Dans certains cas, la structure de la cible de l'antibiotique est modifiée, réduisant l'affinité de l'antibiotique avec celle-ci. Dans d'autres cas, c'est la surexpression du gène de la molécule cible qui augmente sa production, ce qui permet de dépasser la capacité d'action de l'antibiotique et de maintenir suffisamment d'activité pour se développer. Certains mécanismes de résistance comprennent une réduction de l'accès à la cible bactérienne, une réduction de la perméabilité membranaire par exemple, en modifiant la structure des porines ou la création de pompes d'écoulement qui larguent l'antibiotique hors de la bactérie. Enfin, certaines bactéries inhibent directement les antibiotiques en sécrétant des enzymes telles que les bêta-lactamases ou les carbapénémases (Figure 3) (**Opatowski, 2020**). Lorsque ces mécanismes ne sont pas présents naturellement chez une espèce bactérienne, la résistance peut

provenir de l'acquisition de nouveaux gènes de résistance, phénomène qui peut survenir de deux façons :

- **Par transfert vertical (descendance)** : les gènes de la bactérie peuvent être mutés, au niveau d'un emplacement génomique stratégique, entraînant une modification de structure ou une modulation d'expression d'une molécule, la molécule cible par exemple. Ces gènes seront ensuite répliqués lors de la division cellulaire, et conservés par les deux cellules filles (Courvalin, 2008).
- **Par transfert horizontal** : la bactérie peut acquérir un ou plusieurs gènes de résistance *via* des éléments transposables ou des plasmides provenant d'autres microorganismes. Ces gènes peuvent être intégrés dans le chromosome bactérien, ou s'exprimer directement dans la cellule. Ceci permet des transferts de gènes de résistance entre les bactéries, et l'acquisition de plusieurs gènes de résistance pour une même bactérie. Ainsi, des transferts de gènes de résistance peuvent se faire entre des bactéries de même espèce, mais aussi d'espèces différentes. Ces transferts représentent le mécanisme de résistance le plus répandu, soit 80% des résistances acquises (Courvalin, 2008; Davies, 2010).

Les bactéries multirésistantes aux antibiotiques émergent actuellement rapidement sur le plan international. Ces multirésistances conduisant à des impasses thérapeutiques sont observées essentiellement chez les bacilles Gram négatif, notamment les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter*

baumannii. Si le contrôle des infections nosocomiales dues à de telles bactéries multirésistantes est envisageable grâce à un large dépistage de patients à risque, tout contrôle en milieu communautaire se révèle être particulièrement difficile. Les absences de diagnostic microbiologique systématique de ces résistances devant tout signe d'infection, et de confinement des patients porteurs sont deux facteurs majeurs de dissémination de ces déterminants de résistance en milieu communautaire.

Ces déterminants importants de résistance sont les -lactamases à spectre élargi (BLSE), les carbapénémases, et les méthylases de l'ARN 16S conférant une résistance aux aminoglycosides. Ils ont deux caractéristiques à l'origine de problèmes: seuls, ils sont d'emblée la source d'une multirésistance aux antibiotiques, et d'autre part, ils peuvent être associés au sein de mêmes souches et générer une panrésistance aux antibiotiques.

Si la description de BLSE est bien connue en milieu hospitalier (notamment au sein de l'espèce *Klebsiella pneumoniae*), leur identification en milieu communautaire est apparu

depuis les années 2000, on observe une dissémination rapide de souches (essentiellement *E. coli*) en milieu communautaire qui expriment de nouveaux types de BLSE, les enzymes CTX-M.3 La dynamique de la diffusion des BLSE est très liée à cette diffusion communautaire de souches *E. coli* BLSE, mais également au transfert des gènes plasmidiques de BLSE d'*E. coli* vers *K. pneumoniae* essentiellement, avec au final l'émergence d'épidémies hospitalières à *K. pneumoniae* BLSE.4 Ces nouvelles BLSE (CTX-M-3, CTXM-15...) diffèrent des précédentes observées (TEM, SHV) dans les années 1980-2000 qui étaient trouvées essentiellement chez *K. pneumoniae* (Nordman et Poirel 2014).

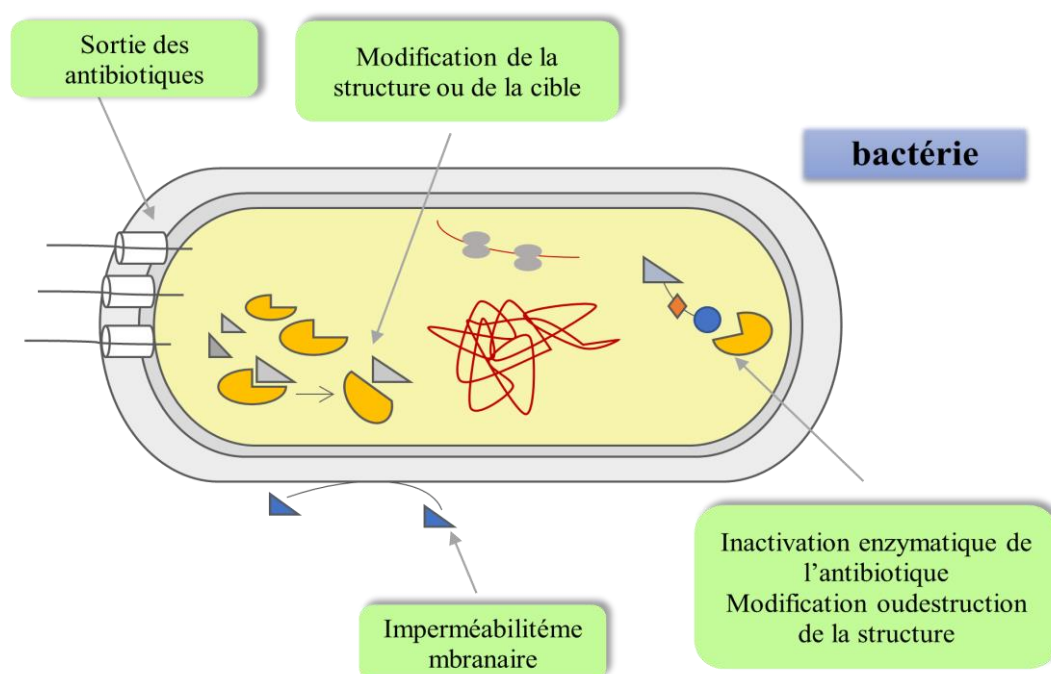


Figure 3. Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques.

2. Modes d'action des antibiotiques

La découverte des antibiotiques a été l'une des grandes avancées médicales du XXe siècle. Ils ont contribué à réduire les épidémies majeures, surtout dans les pays occidentaux. Ces molécules détruisent ou empêchent les bactéries de se développer. Dans le premier cas elles sont dites bactéricides, tandis que dans le second elles sont appelées bactériostatiques (Waglechner et Wright, 2017). Bien que les antibiotiques peuvent être synthétiques ou semi-synthétiques, la majorité des microorganismes les produisent naturellement pour contrôler

leur croissance ou lorsqu'ils sont exposés à des conditions spécifiques dans un environnement extrême afin de subvenir à leur besoin de survivre (**Opatowski, 2020**).

Les antibiotiques, par leurs actions bactériostatiques ou bactéricides peuvent bloquer une étape d'un mécanisme crucial pour la multiplication ou la survie des bactéries. Pour cela, ils agissent par spécificité sur la cellule bactérienne, présentant une toxicité. Cela dit, leurs classifications se basent en fonction de leur provenance (naturelle ou synthétique), leur composition chimique, leur spectre d'activité ou encore leur mécanisme d'action sur la bactérie (**Opatowski, 2020**).

Les mécanismes d'action diffèrent selon la molécule considérée, et peuvent intéresser (Figure 4):

a) La paroi bactérienne

Certains antibiotiques bloquent la synthèse des constituants de la paroi bactérienne, dont le rôle est de maintenir la pression osmotique et protéger la bactérie du monde extérieur. La membrane de la cellule est alors fragilisée, et la lyse bactérienne survient. Ce blocage confère à l'antibiotique une activité bactéricide. Ce mécanisme caractérise les bêta-lactamines, comme les pénicillines ou les céphalosporines, la fosfomycine, ou encore les glycopeptides(**CourvalinetLeclercq, 2012**).

b) La membrane interne

D'autres agissent sur l'intégrité de la membrane plasmique de la bactérie, qui permet de retenir les éléments nécessaires à sa survie dans le cytoplasme, et de maintenir un gradient chimio-osmotique. Les antibiotiques peuvent agir sur cette membrane de deux façons, soit en désorganisant sa structure, ou en formant un canal dans la membrane, entraînant la fuite des composés cellulaires(exemple l'action de polymyxines) (**CourvalinetLeclercq, 2012**).

c) Le génome bactérien

Les antibiotiques peuvent aussi bloquer la réplication de l'ADN bactérien ou la transcription de l'ADN en ARN, suivant différents mécanismes. Pour cela, ils doivent pénétrer dans la cellule et interrompre un élément de la chaîne de réplication (inhibition de la réplication de l'ADN, inhibition de la transcription de l'ARN, diminution de la synthèse des précurseurs nucléotidiques). Ce processus concerne les quinolones, la rifampicine, les sulfamides et le triméthopime (**CourvalinetLeclercq, 2012**).

d) La synthèse des protéines

D'autres antibiotiques inhibent la synthèse des protéines essentielles à la survie de la cellule. L'antibiotique pénètre dans la cellule et bloque le ribosome bactérien, structure du cytoplasme nécessaire à la synthèse des protéines. Après fixation sur des constituants spécifiques du ribosome bactérien (sous unités 30S et 50S), ces antibiotiques vont empêcher la traduction de l'ARNm et donc la formation de nouvelles protéines. De nombreux antibiotiques fréquemment utilisés ont pour cible le ribosome, comme les aminosides, les cyclines, ou les macrolides (Courvalin et Leclercq, 2012).

e) La synthèse des folates

Enfin, certains antibiotiques inhibent la synthèse des folates, éléments essentiels à la formation de constituants nécessaires à la survie cellulaire : lipides, acides aminés et nucléotides. Ce mécanisme concerne, par exemple, les sulfamides (Courvalin et Leclercq, 2012; Opatowski, 2020).

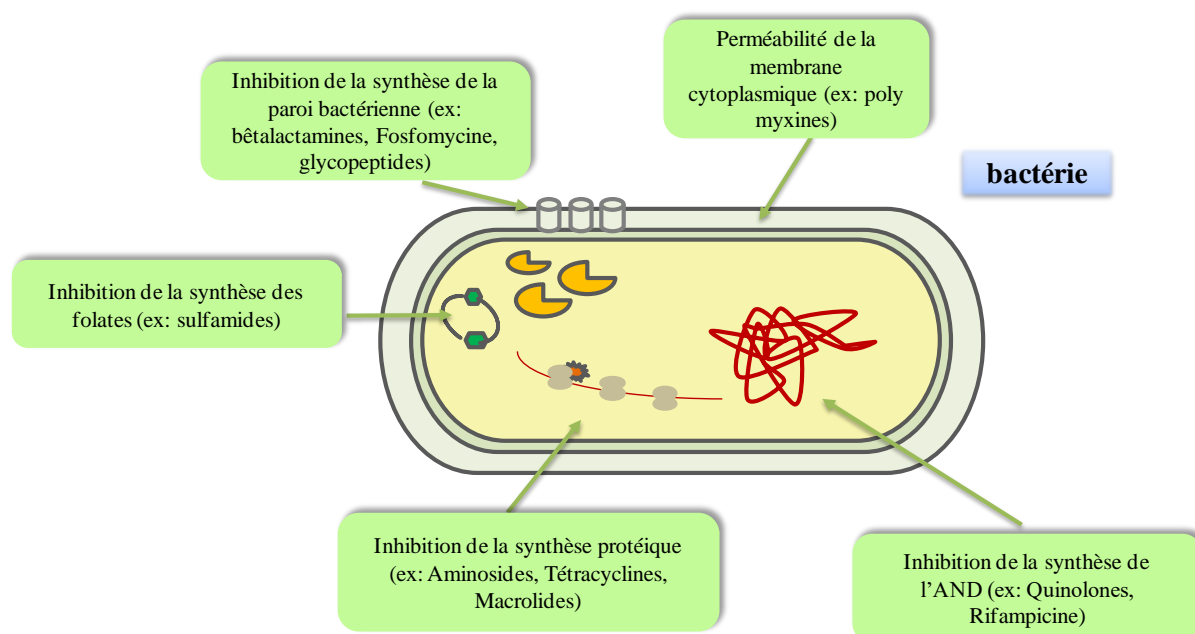


Figure 4. Principaux mécanismes d'action des antibiotiques.

3. Principales familles d'antibiotiques

3.1. Les β -lactamines

Elles constituent la famille d'antibiotiques la plus importante aussi bien par le nombre et la diversité des molécules utilisables que par leur indication en thérapeutique (Gadou, 2019).

Cette famille, qui regroupe les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monolactames, est caractérisée par la présence constante du cycle β -lactame associé à des cycles et des chaînes latérales variables (**Gadou, 2019**). La grande variété de leur mode d'administration, leur large spectre d'activité antibactérien associé à une action bactéricide, une bonne diffusion tissulaire, une bonne tolérance et un faible nombre d'interactions médicamenteuses expliquent l'importance de leur utilisation seuls ou en association (**Cavallo et al., 2004**).

- **Mode d'action des β -lactamines**

Les β -lactamines pénètrent dans la paroi bactérienne et se fixent sur les protéines cibles qui sont les protéines de liaison aux pénicillines (PLP). Ces PLP sont des enzymes comprenant des transpeptidases, des transglycosylases et des carboxypeptidases qui participent à la synthèse et au remodelage du peptidoglycane, qui est le principal constituant de la paroi bactérienne. Une analogie structurale entre le noyau des β lactamines et le dipeptide terminal D-alanyl-D-alanine, le pentapeptide constitutif du peptidoglycane, facilite la fixation des β lactamines sur les PLP. Les β lactamines ouvriront leur cycle et bloqueront le fonctionnement de ces enzymes en se fixant sur les PLP. Les inhibiteurs des autolysines bactériennes sont inactivés par un ensemble de réactions déclenchées par l'inactivation principalement des transpeptidases. Ce sont ces autolysines qui vont alors dégrader le peptidoglycane, entraînant finalement la lyse bactérienne et l'effet d'auto-suicide (Courvalin P., Leclercq 2012).

3.2. Les Aminosides

Les aminosides, également appelés aminoglycosides sont des molécules naturelles produites par des actinomycètes ou obtenus par hémisynthèse. Elles sont constituées de deux ou plusieurs sucres aminés liés par une fonction glycosidique à un noyau hexose. Ce sont des oligosaccharides basiques, polaires et hydrophiles qui sont d'un point de vue structural, organisés autour d'un cycle central caractéristique de type aminocyclitol sur lequel sont greffés divers sucres aminés (**Mingeot et al 1999**). Les aminosides ont un large spectre antibactérien particulièrement contre les bactéries Gram négatif, peu sensibles aux pénicillines et aux sulfamides. Elles sont majoritairement bactéricides avec une action rapide et dose dépendante qui constitue l'un de leurs grands avantages thérapeutiques (**Vakulenko et Mobashery 2003**).

- **Mode d'action des aminosides**

Les aminosides fonctionnent en 3 étapes :

- La première étape consiste en un passage passif qui permet à la membrane externe de passer à travers les porines, puis au peptidoglycane. Les aminosides se concentrent au niveau de la membrane cytoplasmique ;
- La deuxième étape concerne le transport des aminosides à l'intérieur de la cellule bactérienne qui nécessite de l'énergie fournie par le métabolisme oxydatif ;
- Au cours de la troisième étape et qui est considérée comme la plus rapide, les aminosides se fixent sur le ribosome, en particulier au site A de l'ARN ribosomal 16S qui compose le ribosome bactérien 30S, ce qui entraîne la fixation d'un ARN transfert incorrect sur l'ARN messager. La synthèse de protéines est induite lorsque la reconnaissance du codon anticodon est perturbée (**Courvalin P., Leclercq 2012; Gadou 2019; Witchitz 1978**) ;

3.3. Quinolones/ Fluoroquinolones

Les quinolones doivent leur découverte à la recherche sur la chloroquine. Des chercheurs du « the Sterling-Winthrop Laboratories in Rochester, NY » ont accidentellement découvert un produit dérivé de sa synthèse et doué de vertus antibactériennes : la 7-chloroquinoléine. Cette molécule a été développée pour donner l'acide nalidixique (**Sarkozy 2001**). Cette molécule depuis sa découverte a été grandement utilisée pour le traitement des infections urinaires. De façon générale, les quinolones sont caractérisées par un large spectre d'activité, une bonne biodisponibilité orale et une bonne pénétration tissulaire (**Larouche 2001**). Quant aux fluoroquinolones, ils sont caractérisés par la présence d'un atome de fluor en position 6 et d'un cycle azoté, le plus souvent une pipérazine en position 7 (**Courvalin P., Leclercq 2012**).

- **Mode d'action des quinolones**

Les quinolones ciblent principalement les enzymes bactériennes ADN gyrase ou topoisomérase II et topoisomérase IV. Les quinolones agissent par interaction avec le complexe ADN-enzyme, c'est-à-dire avec l'ADN gyrase ou avec la topoisomérase IV associée à l'ADN bactérien, pour produire des changements de conformation qui inhibent l'activité enzymatique. La synthèse normale de l'ADN est inhibée par le nouveau complexe quinolone-enzyme-ADN qui empêche la progression de la réplication (**Courvalin P., Leclercq 2012**).

3.4. Les tétracyclines

Découverts il y a plus de 60 ans, les tétracyclines sont des inhibiteurs de la synthèse protéique. Ce sont des antibiotiques bactériostatiques à large spectre, actifs aussi bien sur les bactéries à Gram négatif qu'à Gram positif, mais également sur d'autres microorganismes tels que les chlamydia, les mycoplasmes, les rickettsies et certains protozoaires (**Courvalin et Leclercq, 2012**). Ces molécules ont été largement prescrites en thérapeutique humaine et vétérinaire et ont également été utilisées à doses sub-inhibitrices comme promoteur de croissance chez les animaux. Leur utilisation massive souvent incontrôlée, est à l'origine de la pression de sélection de résistance des bactéries ce qui a abouti au fil des années à limiter leurs utilisations. Cependant, de nouvelles molécules comme les glycylyclines, ont entraîné un regain d'intérêt pour cette famille d'antibiotiques (**Courvalin et Leclercq, 2012**).

- **Mode d'action des tétracyclines**

Cet antibiotique bactériostatique agit sur la bactérie en se liant à la sous-unité 30S du ribosome, inhibant ainsi la synthèse des protéines bactériennes. Pour ce faire, l'action de l'antibiotique nécessite une étape préliminaire de pénétration comme toute autre molécule ayant une action intra-cellulaire. Cette pénétration est une diffusion passive qui diffère entre les bactéries à Gram négatif et Gram positif. Chez les bactéries à Gram négatif, les tétracyclines chélatent les Mg^{2+} et franchissent la membrane externe par l'intermédiaire des porines OmpF et OmpC. Les complexes tétracyclines- Mg^{2+} sont dissociés dans le périplasma et l'antibiotique traverse la membrane cytoplasmique par un mécanisme énergétique dépendant de leur force promotrice. Une fois à l'intérieur de la cellule bactérienne, les tétracyclines inhibent les synthèses protéiques en se fixant sur la sous-unité 30S ribosomal et plus particulièrement à la protéine S7 et à certains nucléotides comme G693 et A892, empêchant la fixation de l'ARNt bloquant ainsi la traduction des chaînes polypeptidiques (**Courvalin et Leclercq, 2012**).

3.5. Les macrolides et apparentés

Les macrolides, lincosamides, et streptogramines (MLS) sont des antibiotiques distincts chimiquement mais rassemblés dans un même groupe. Ceci est en partie justifié d'une part, par des modes d'action d'inhibition de la synthèse protéique, et d'autre part, par la résistance croisée due à la modification de cible qui a été longtemps la seule connue (**Courvalin et Leclercq, 2012**). Cependant, il existe des différences dans les modes d'action des MLS et de nombreux autres mécanismes de résistance sont maintenant décrits qui

n'entraînent pas de résistance croisée. Parmi les macrolides, la molécule la plus anciennement commercialisée est l'érythromycine. La résistance à cet antibiotique a été décrite chez les staphylocoques peu après son introduction en thérapeutique. Depuis, la résistance aux macrolides a émergée puis disséminée dans pratiquement toutes les espèces de bactéries à Gram positif avec des fréquences variables (**Courvalin et Leclercq, 2012**).

- **Mode d'action des macrolides**

Ces molécules agissent contre les bactéries à Gram positif et elles sont bactériostatiques, sauf les synergystines qui sont bactéricides vis-à-vis des *S. aureus*. Les antibiotiques (MLS) se fixent sur la fraction 50S des ribosomes et inhibent ainsi la synthèse protéique. Cette interaction induit un blocage du complexe aminoacyl-ARNt et les acides aminés apportés par l'ARNde transfert, ne s'incorporent plus aux chaînes polypeptidiques. La synthèse protéique ne pouvant plus se réaliser, par conséquent la survie de la bactérie est compromise (**Buxeraud et Faure, 2022**).

3.6. Les polymyxines

Les polymyxines sont des antibiotiques cycliques naturels initialement isolés à partir de souches de *Bacillus* spp. Ces polypeptides cationiques ont une masse moléculaire élevée d'environ 1200 Da. Grace à leur structure, ces molécules présentent à la fois une hydrophobicité et des propriétés basiques, expliquant leur caractère amphotère (**Courvalin et Leclercq, 2012**).

- **Mode d'action des polymyxines**

Les polymyxines possèdent un mode d'action unique. En effet, ces détergents ont une affinité pour les enveloppes membranaires et modifient la morphologie bactérienne par apparition d'excroissance au niveau de la paroi du microorganisme. Ces molécules une fois fixées au niveau des groupements phosphates chargé négativement du LPS, déplacent de façon compétitive les ions stabilisateurs de Ca^{2+} et Mg^{2+} perturbant électrostatiquement les membranes de surface bactérienne. L'antibiotique induit sa propre entrée dans la cellule provoquant ainsi la perte de l'intégrité de la membrane cytoplasmique par formation de pores. Ceci aboutit à la mort cellulaire par rupture de la barrière osmotique, fuite des composant intracytoplasmiques essentiels et libération d'enzymes lytiques (**Chen et Kaye, 2011 ; Courvalin et Leclercq, 2012**).

3.7. Les glycopeptides

Les glycopeptides sont des antibiotiques de dernier recours en milieu hospitalier, utilisés dans le traitement des infections causées par les bactéries à Gram positif multi résistantes, notamment les infections au SARM et à *Enterococcus*, ainsi que la colite pseudomembraneuse à *Clostridium difficile*. Les glycopeptides sont des molécules de masse moléculaire élevée, variant entre 1400 et 1900 Da. Ils agissent par une inhibition de la synthèse du peptidoglycane de la paroi des bactéries à Gram positif, entraînant ainsi la lyse bactérienne. Ils se lient avec une haute affinité sur le dipeptide terminal D-alanyl-D-alanine de la chaîne pentapeptidique du peptidoglycane (CourvalinetLeclercq, 2012). La vancomycine et la teicoplanine sont les deux glycopeptides naturels. La vancomycine a été isolée du champignon microscopique *Amicolato psisorientalis* en 1952 et introduite en clinique en 1956 pour le traitement des infections à bactéries Gram positif résistantes à la pénicilline. La teicoplanine a été isolée du champignon microscopique *Actinoplanesti chomyceticus* en 1978 et introduite en clinique en 1988. Elle a une structure proche de celle de la vancomycine avec un heptapeptide cyclique (Binda et al 2014).

- **Mode d'action des glycopeptides**

Ces molécules de masse moléculaire élevée agissent par une inhibition de la synthèse du peptidoglycane de la paroi des bactéries à Gram positif, entraînant ainsi la lyse bactérienne. Ils se lient avec une haute affinité sur le dipeptide terminal D-alanyl-D-alanine de la chaîne pentapeptidique du peptidoglycane naissant, forment une poche rigide et masquent le site d'action de transpeptidases chargées entre autres par cette masse moléculaire élevée. Avec leur capacité à former des dimères, ils empêchent par encombrement stérique la transglycosylation nécessaire à la finition du peptidoglycane naissant. Du blocage de la transpeptidation et de la transglycosylation du peptidoglycane, il en résulte l'inhibition de la croissance puis la mort bactérienne (Cattoir et Giard 2014; Courvalin P et Leclercq 2012).

4. Evolution de la résistance aux antibiotiques chez l'homme

La diminution de l'efficacité des traitements des infections à bactéries résistantes conduit à une augmentation des durées de traitement et d'hospitalisation. Par ailleurs, l'évolution clinique de ces infections est plus péjorative, avec une augmentation de la morbidité et de la mortalité (De Kraker et al. 2011; Friedman et al 2016). Des grands plans de lutte contre l'antibiorésistance ont été mis en place au niveau international, ayant des objectifs communs à

savoir, favoriser la prévention des transmissions des maladies infectieuses en particulier à l'hôpital, améliorer la consommation d'antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire (réduction et bon usage), soutenir la recherche autour de l'antibiorésistance et améliorer les dispositifs de surveillance des infections à bactéries résistantes. Ces dernières années, une approche « One Health », prenant en compte de façon globale l'émergence et la propagation des bactéries résistantes en santé humaine, animale et dans l'environnement, est recommandée (WHO 2015). Malgré les efforts déployés, maîtriser les infections à bactéries résistantes demeure un challenge mondial.

5. Surveillance de la résistance aux antibiotiques

La surveillance de la résistance aux antibiotiques fait partie intégrante de la politique de prévention de la résistance bactérienne et du bon usage des antibiotiques. Au sens épidémiologique du terme, la surveillance comprend le recueil systématique et continu (sur plusieurs années) des données, leur analyse, leur interprétation ainsi que la diffusion des résultats à ceux qui en ont besoin pour mettre en place une politique de santé, que celle-ci soit locale, régionale ou nationale. Il est donc important d'insister sur le fait que la surveillance de la résistance ne se résume pas à recueillir des chiffres. Les principaux buts de la surveillance sont :

- aider les autorités sanitaires à établir une politique raisonnée de l'utilisation des antibiotiques ;
- aider les cliniciens à prendre en charge les infections ;
- mettre en place des mesures de contrôle de la résistance ;
- participer à la recherche sur les mécanismes de résistances et les cibles d'action des antibiotiques (Courvalin P., Leclercq 2012) ;

Nous citons ci-dessous comme exemple deux réseaux de surveillance :

• Réseau de surveillance en Europe

Le EARS-net (EuropeanAntimicrobialResistance Surveillance Network) un réseau européen de surveillance de la résistance antimicrobienne, qui sert de référence pour les données de résistance en Europe (Prévention de la résistance aux antibiotiques 2023), en association avec L'ECDC qui a mis en place un réseau qui regroupe des informations sur la sensibilité antimicrobienne provenant de laboratoires de microbiologie de 30 pays européens, y compris la France. Les résultats de leurs travaux indiquent des taux de résistance pour *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P.aeruginosa*, *Acinetobacterspp*, *S.pneumoniae*, *S. aureus* et *Enterococcus spp*, obtenus en routine à partir d'infections et de bactériémies dans le liquide

cérébrospinal. Ces réseaux permettent d'étudier les tendances temporelles et spatiales pour les infections invasives, l'apparition des nouveaux profils de résistance et la comparaison des résultats entre différentes structures hospitalières, même si l'ECDC conseille d'être prudent avec les résultats de ces comparaisons (**Prévention de la résistance aux antibiotiques 2023**). En effet, les participations et le taux de couverture de la population varient selon les pays et selon les années. Les seuils utilisés pour les tests de susceptibilité peuvent différer selon les pays ou les laboratoires, bien que la référence européenne (EUCAST), soit fortement conseillée pour les participants au réseau. Par exemple, la Belgique utilise majoritairement les directives du CLSI pour définir les souches non sensibles des *S. pneumoniae*, dont le seuil est plus élevé que pour la référence EUCAST (**Goossens et al., 2005**).

- **Réseau de surveillance en Algérie**

Le réseau algérien de surveillance de la résistance aux antibiotiques (AARN) se situe au niveau du laboratoire de référence à l'Institut Pasteur d'Algérie (L'IPA). La signature d'une décision ministérielle portant la création de ce réseau date depuis 2002. Cette décision précise la tutelle du Ministère de la santé, sur la population et la réforme des hôpitaux/direction de la prévention et qui a comme principale mission de :

- promouvoir l'interconnexion des laboratoires nationaux dans la surveillance de la résistance aux antibiotiques ;
- assurer le contrôle de qualité externe et interne du processus de surveillance de la résistance aux antibiotiques ;
- renforcer le système national de veille épidémiologique et d'alerte rapide ;
- recueillir les données épidémiologiques et en assurer l'exploitation, l'analyse et la diffusion des résultats ;
- améliorer la formation du personnel du réseau des laboratoires nationaux ;

Depuis sa création, ce comité met en place des initiatives à l'échelle nationale pour être en mesure d'évaluer toutes les actions entreprises dans les établissements de santé. L'analyse des résultats du contrôle de qualité (CQ) de l'antibiogramme se fait à partir des données sur fichier Excel envoyés par les différents laboratoires membres du réseau, en se basant sur une méthodologie analytique spécifique au dépistage des entérobactéries productrices de BLSE, les entérobactéries résistantes ou intermédiaires aux carbapénèmes, *P.aeruginosa* résistante à l'imipénème, à la ceftazidime et à la ciprofloxacine,

Acinetobacterspp résistant à l'imipénème, les souches SARM, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* résistants ou intermédiaires à la vancomycine (AARN,2020).

Problématique

L'infection du site chirurgical comprend le tissu cutané jusqu'au niveau de la cavité abdominale ou pleurale. Le risque infectieux est déterminé par le degré de la contamination bactérienne, l'état général du patient et les éléments associés à l'intervention. En général, les germes en question sont issus de la flore de la peau ou des muqueuses affectées lors de l'intervention. On traite localement les infections superficielles non compliquées ; cependant, une plaie chirurgicale infectée peut être le point de départ d'une infection profonde. Il est important de porter une attention particulière aux infections en présence de matériel étranger. Il est interdit d'utiliser des antibiotiques empiriques dans cette situation. En général, la méthode de traitement associe un débridement chirurgical et un traitement antibiotique spécifique, souvent à long terme.

L'augmentation et la dissémination rapide des résistances aux antibiotiques sont probablement l'un des problèmes de santé publique les plus inquiétantes de ces dernières années. Un article publié dans *the Lancet Infectious Diseases* en 2010, révèle l'identification d'un gène permettant à certaines bactéries d'être hautement résistantes à presque tous les antibiotiques (Kumarasamy et al. 2010).

L'OMS a publié un rapport qui révèle que cette grave menace pour la santé publique n'est plus une prévision, mais bien une réalité dans chaque région du monde (WHO, 2016). De plus l'exposition aux différents dispositifs invasifs au sein du milieu hospitalier favorisant l'émergence et la dissémination des bactéries multi-résistances conduisant à des infections associées aux soins. A cet effet l'élaboration des réseaux de surveillance et de protocole de rigueur d'hygiène hospitalière apparaît comme une priorité absolue.

Hypothèse de l'étude

Notre réflexion se base sur les hypothèses suivantes :

- Les données de la bibliographie mentionnent que de nombreuses contaminations peuvent survenir en phase peri-opératoire, soit à partir de la flore commensale du patient (contamination endogène) soit à partir de l'environnement du bloc opératoire (contamination exogène). Ce phénomène est probablement dû aux comportements des

équipes soignantes au moment de l'intervention, et/ou à la qualité de l'hygiène hospitalière ;

- La contamination de l'acte chirurgical peut aussi avoir lieu en dehors du bloc opératoire et pourra être liée à d'autres facteurs comme les soins post-opératoires ou des facteurs propres aux patientes (âge, immunité, niveau socio-économique) ;
- Parallèlement l'émergence des bactéries résistantes et les transmissions croisées au sein des milieux hospitaliers rendent difficile la gestion de ces infections vis-à-vis de l'antibioprophylaxie et l'antibiothérapie ;

Objectifs de l'étude

L'identification et la caractérisation clinique et moléculaire d'agents pathogènes associés aux infections du site opératoire des interventions gynéco-obstétricales.

- **La réalisation de notre travail est répartie comme suit:**

- Décrire les caractéristiques épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques des infections du site opératoire en gynécologie obstétrique ;
- Identifier le profil bactériologique et le profil de résistance aux antibiotiques des espèces pathogènes isolées ;
- Préciser les caractérisations moléculaires des différents gènes de résistance et de leurs variants ;
- Etablir le séquençage génomique bactérien et analyser les données de résistance par l'outil bio-informatique ;

Matériels et Méthodes

1. Méthodologie

1.1 Description de l'étude

Cette étude a obtenu l'accord du comité d'éthique (N°1726) de l'hôpital Ibn Rochd d'Annaba, et a été menée conformément à la déclaration d'Helsinki; toutes les patientes ont signé un consentement éclairé.

Il s'agit d'une étude transversale à visée descriptive et à recueil prospectif, réalisée au niveau du service de gynécologie obstétrique de l'Etablissement Hospitalier Spécialisé 'EHS' Abdallah Nouaouria 'El Bouni' - Annaba, sur une période allant du 1^{er} Janvier 2020 au 31 décembre 2021.

1.2. Population d'étude

Au total, 2709 patientes ont été recrutées dont l'âge varié entre 24 et 64 ans.

- **Les critères d'inclusion:** toutes les femmes ayant présenté une ISO suite à une intervention chirurgicale quel qu'en soit l'indication (gynécologique ou obstétricale) pratiquée au niveau du service de gynécologie-obstétrique de l'EHS El Bouni, durant la période de l'étude et confirmée à l'étude bactériologique du pus prélevé sur la plaie opératoire.
- **Les critères d'exclusion:** les patientes hospitalisées au service pour une ISO mais opérées dans une structure autre que le service de gynécologie-obstétrique de l'EHS et les patientes suspectées de présenter une ISO mais dont le prélèvement est revenu négatif.

1.3. Déroulement de l'étude

Les données ont été recueillies sur une fiche d'enquête selon un mode prospectif et sur une période de 2 ans. Le suivi des patientes césarisées a été réalisé en consultation post-opératoire, depuis l'intervention jusqu'au trentième jour après l'intervention.

Le diagnostic d'ISO est suspecté, si la patiente présente un ou plusieurs des signes suivants : écoulement purulent, douleur ou sensibilité localisée, gonflement localisé, érythème ou chaleur locale associés ou non à une fièvre et confirmés par l'isolement d'un germe à l'examen cyto-bactériologique du pus.

Les ISO ont été classées selon la profondeur de l'atteinte en :

- Infection superficielle de l'incision qui se limite à la peau et au tissu sous-cutané ;
- Infection profonde de l'incision qui touche des tissus tels que la musculature de la paroi abdominale ;
- Infection d'organe ou d'espace qui se manifeste au niveau des viscères et des cavités ;

1.4. Collecte des données cliniques

Pour étudier les caractéristiques sociodémographiques, diagnostiques, bactériologiques et thérapeutiques, nous avons confectionné une fiche d'enquête (annexe 1) comportant :

- **Les variables relatives aux facteurs socio-démographiques:** l'âge, le niveau d'étude, situation professionnelle, niveau socio-économique, parité, et comorbidités.
- **Les variables relatives à l'intervention chirurgicale:** l'indice de la masse corporelle (IMC), le motif, le type d'intervention, les conditions et la durée de l'acte opératoire, le type d'anesthésie, la durée d'hospitalisation pré- et post-opératoire, la qualité de l'opérateur, l'antibioprophylaxie, le rythme du pansement, le délai d'apparition de l'infection, le type de suppuration, le nombre d'examens vaginaux, présence de pertes vaginales, rupture prématurée des membranes, CRP, la température, l'évolution, la classe d'Alteimer et le score ASA, et le type d'antibiothérapie reçu.
- **Les variables de l'étude bactériologique:** les agents pathogènes identifiés, les antibiotiques testés, le profil d'antibiorésistance détecté.
- **Les données thérapeutiques:** type d'antibiothérapie probabiliste post-opératoire.

1.5. Matériel biologiques

Notre étude bactériologique porte d'une part, sur des souches bactériennes non répétitives isolées de plaie infectées, et d'autre part sur des souches bactériennes isolées des surfaces inertes du milieu hospitalisé (bloc opératoire, salle de réanimation, chambre). Les prélèvements ont été effectués par écouvillonnage ou par aspiration à l'aide d'une seringue à aiguille fine stérile pour le cas des infections de plaie et uniquement par écouvillon humidifié au sérum physiologique stérile dans le cas des surfaces inertes du milieu hospitalier. Les échantillons prélevés ont été rapidement conservés au frais à 4°C et transportés au Laboratoire de Biochimie et de Microbiologie Appliquées (LBMA) de l'université Badji Mokhtar-Annaba, où ils ont été incubés à 37°C pour un enrichissement de 24h.

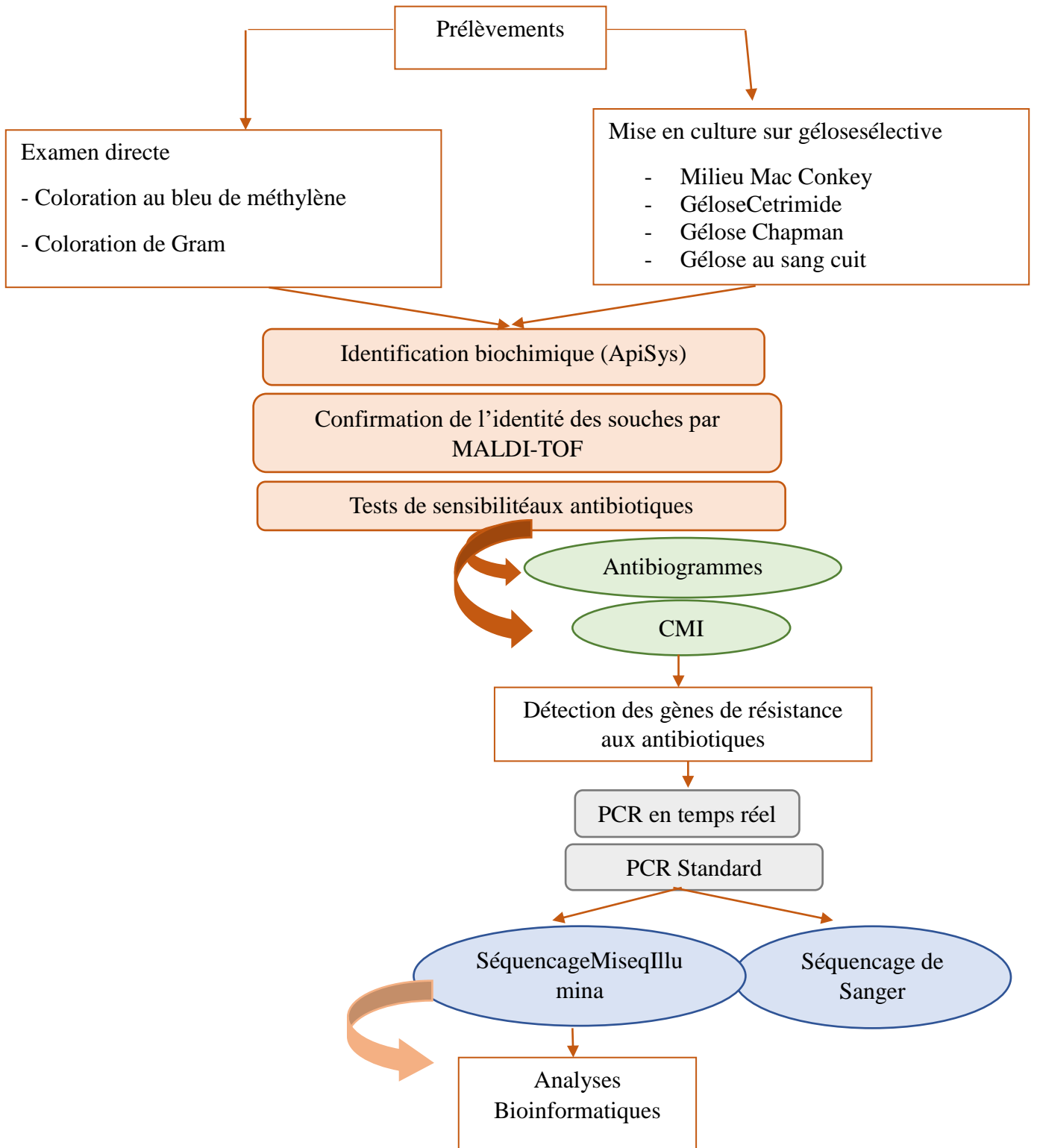


Figure 5. Schéma général de l'analyse des prélèvements de pus.

2. Etude bactériologique des prélèvements de pus

Nous avons procédé initialement aux examens microscopiques directes par :

2.1. Coloration au bleu de méthylène

- **Principe**

La coloration au bleu de méthylène (BM) est une coloration qui met en évidence la morphologie, la taille et les modes de regroupement des bactéries mais aussi les cellules qui sont en général mieux conservées qu'avec la coloration de Gram notamment les globules blancs (**Coloration pour observation microscopique, microbio fiche technique, 2021**)

- **Protocole**

- Réaliser un frottis sur une lame et le fixer à la chaleur ;
- Le recouvrir de bleu de méthylène et laisser agir 3 min ;
- Rincer à l'eau distillée ;
- Sécher entre 2 feuilles de papier absorbant ;
- Examiner à l'objectif x100 à immersion avec une goutte d'huile de cèdre avec un éclairage important (diaphragme ouvert) ;

2.2. Coloration de Gram

- **Principe**

La coloration de Gram est la coloration différentielle microbiologique la plus importante et la plus largement utilisée, publiée par Hans Christian Gram en 1884; elle permet de différencier les bactéries selon les principaux critères: forme, nature de leurs paroi et affinité pour les colorants (**Coloration pour observation microscopique, fiche technique, 2021**).

- **Protocole**

- Inonder le frottis séché et fixé à la chaleur pendant 1 min avec le réactif de coloration au cristal violet. A noter, que la qualité du frottis (concentration cellulaire trop lourde ou trop légère) affectera les résultats de la coloration ;
- Laver la lame dans un jet doux et indirect d'eau du robinet pendant 2 secondes ;
- Inonder la lame avec le mordant : iode ou lugol, et laisser agir 1 min ;
- Laver la lame dans un jet doux et indirect d'eau du robinet pendant 2 secondes ;
- Inonder la lame avec de l'alcool à 90°. Attendre 30 secondes ;
- Inonder la lame avec un contre colorant, la fushine et laisser agir 1 min ;

- Laver la lame dans un jet d'eau douce et indirecte de l'eau du robinet jusqu'à ce qu'aucune couleur n'apparaisse dans l'effluent, puis sécher avec du papier absorbant ;
- Observez les résultats de la coloration sous immersion dans l'huile de cèdre. Examiner au microscope, objectif x100 ;

2.3. Isolement des souches bactériennes

Un enrichissement sur bouillon nutritif « brainheart infusion » (CONDA pronadisa, Espagne) 24h à 37°C d'incubation dans l'étuve, a été effectué pour chaque prélèvement dès son transport au laboratoire. L'isolement des souches bactériennes a été fait à partir des tubes de bouillon nutritif présentant un trouble. Quatre types de milieux de culture ont été utilisés : la gélose nutritive (GN), la gélose MacConkey (MC), la gélose au cétrimide (GC), le milieu Chapman et gélose au sang cuit. L'ensemencement sur gélose a été fait comme suit :

- La première partie de la boîte a étéensemencée à l'aide de l'extrémité cotonnée de l'écouvillon imbibée dans le bouillon nutritif, en frottant à la surface de la gélose ;
- La deuxième partie a étéensemencée par l'anse de platine, à partir du premier ensemencement, en faisant des stries éloignées. Les boîtes ont été ensuite incubées à 37°C pendant 24 à 48 h ;

2.4. Purification des souches bactériennes

Cette étape est basée sur les caractères culturels et la coloration de Gram. A partir des colonies isolées sur les différents milieux sélectifs enrichis, procéder directement à la coloration de Gram. La purification se fait en poursuivant le repiquage sur le même type de milieu jusqu'à l'obtention d'un isolat pur présentant les mêmes caractéristiques macroscopiques sur les milieux gélosés et les mêmes caractéristiques microscopiques sur la coloration de Gram.

2.5. Identification biochimique des souches par les galeries miniaturisées Api système (BioMérieux, France)

A la suite des études macroscopiques et microscopiques, les souches bactériennes ont été identifiées par les galeries biochimiques API system avant leurs conservations.

- **Principe des galeries miniaturisées**

Les Api sont un système standardisé pour l'identification des bactéries non fastidieuses. Elles sont constituées de 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

La galerie est commercialisée dans des boîtes stériles; elle comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Chaque microtube est partagé en deux parties: le tube (en bas) et la cupule (en haut). Les substrats déshydratés sont spécifiques à l'identification biochimique par spécificité à chaque groupe bactérien (Api20E, Api20NE, ApiStaph, ApiStrep). Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide d'un tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification (**Galerie BioMérieux.pdf**, 2021).

- **Préparation de la galerie**

- Réunir le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillée stérile dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide ;
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte ;
- Sortir la galerie de son emballage dans des conditions stériles et la déposer dans la boîte d'incubation ;

- **Préparation de l'inoculum**

- Utiliser un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile ou d'eau distillée stérile ou APISrep Medium dans le cas des ApiStrep, sans additif ;
- A l'aide d'une pipette, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé ; utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 h) ;
- Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu, cette suspension doit être utilisée extemporanément ;
- Introduire la suspension bactérienne dans les microtubes de la galerie à l'aide d'une pipette Pasteur en suivant les instructions du fournisseur spécifique à chaque type de galeries ;

- **Lecture et interprétation des résultats**
- Après incubation (18-24h à 37°C), l'addition des réactifs doit se faire de façon spécifique à chaque test du substrat déshydraté comme indiqué sur les tableaux (annexe 2) ;
- La lecture de la galerie se fait en se référant aux tableaux de lecture; l'interprétation des résultats se fait à l'aide d'une feuille de calcul en format Excel du logiciel dédié ;

3. Conservation des souches bactériennes

Les souches bactériennes purifiées ont été conservées à court et à long terme. La conservation de courte durée a été réalisée par ensemencement, par l'anse de platine, sur gélose nutritive inclinée. Après incubation 24 h à 37°C, les tubes seront conservés au réfrigérateur à 4°C pendant quelques mois. La conservation de longue durée a été réalisée par ensemencement dans le bouillon nutritif. Après une incubation de 24 h à 37°C, un volume de la suspension obtenue a été transféré dans des cryotubes à l'aide d'une pipette Pasteur, en additionnant 30% de glycérol stérile. Les tubes ont été stockés au congélateur à -20°C pendant deux années.

4. Confirmation de l'identité des souches bactériennes par la spectrométrie de masse MALDI TOF

Chaque prélèvement collecté et initialement identifié a été transporté à L'IHU Méditerranée infection-Marseille, pour les investigations de biologie moléculaire.

- **Principe**

L'identification des souches par la spectrométrie de masse MALDI-TOF est une technique basée sur le profil protéique des souches, qui permet en quelques min l'identification d'une souche avec une haute précision (Seng et al., 2010).

- **Méthode de réalisation (MALDI-TOF MS manual, IHU 2022)**

- Nettoyer la cible (plaque en stainless steel avec 96 puits) : par un rinçage sous l'eau chaude du robinet en frottant avec du papier de précision (type KimWipes) afin de ne pas la rayer ;
- Placer la cible dans un petit réservoir en inox ou céramique et la recouvrir d'éthanol à 70%. Laisser agir pendant 15 min puis éliminer l'éthanol ;

- Déposer sur la cible 500µl de TFA à 80 % ; frotter avec du papier de précision et rincer avec de l'eau HPLC puis laisser sécher pendant 15 min à l'air libre ;
- Préparation de la matrice : la matrice permet de minimiser la dégradation de la souche provoquée par l'absorption de l'énergie des faisceaux laser émis lors de l'analyse ;
- Dans un tube Eppendorf ajouter 2 pointes de la poudre α -cyano-4-hydroxycinnamic, 500µL d'acétonitrile, 250µL de TFA à 20% et 250µL d'eau HPLC.
- Homogénéiser le mélange au vortex pendant quelques secondes et soniquer pendant 10 min puis centrifuger pendant 5 min à 13000 tours/min ;
- Transférer le surnageant qui constitue la matrice (prête à l'emploi) dans un autre tube Eppendorf stérile ;
- Dépôt des souches: le plan de la cible MALDI a été rempli sur une feuille en indiquant les références des souches à identifier. Ainsi, à partir d'une colonie bactérienne de chaque souche, 3 spots ont été faits sur la cible selon le plan prédéfini en utilisant l'ance de platine à fines cônes. Recouvrir chaque spot avec 1,5 µL de la matrice précédemment préparée ;
- La plaque a été laissée au repos pendant 5 min sous le poste de sécurité microbiologique (PSM) afin de permettre la cristallisation des échantillons bactériens ;
- Introduire la plaque dans l'automate et lancer le programme pour l'identification des souches ;

Lecture et interprétation des résultats: le résultat d'identification par MALDI-TOF est donné avec le logiciel MALDI Biotyper (Microflex LT) par un score compris entre zéro et trois ;

- Une bactérie est identifiée à l'échelle de l'espèce lorsque le score d'identification est supérieur à 1,9 ;

A la fin de l'identification tous les résultats sous forme de spectre sont conservés dans des fichiers du logiciel MALDI Biotyper pour la réalisation d'un dendrogramme.

Le dendrogramme consiste en un type de diagramme en arborescence utilisé pour présenter le clustering hiérarchique, à savoir les relations phylogénétiques entre l'ensemble des espèces bactériennes identifiées.

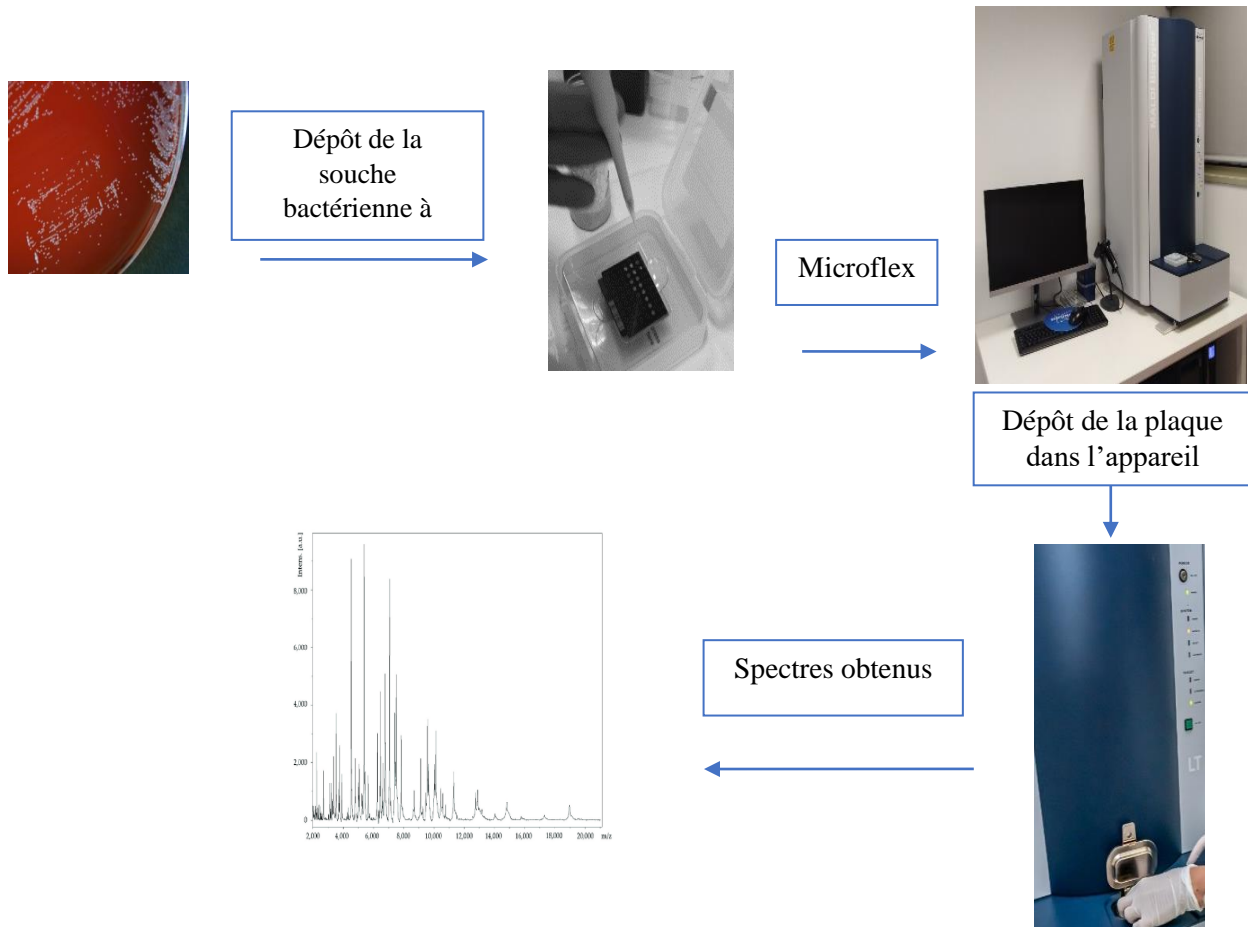


Figure 6. Protocole d'identification bactérienne par MALDI-TOF.

5. Tests de sensibilité aux antibiotiques

- **Principe**

Les tests de sensibilité aux antibiotiques ont été exécutés par la méthode de diffusion de disque sur gélose Mueller Hinton (Beckton Dickinson Jersey, USA), selon les recommandations de la CA-SFM 2019, et avec une série de 16 antibiotiques (SIRscan Discs ; I2a, France). Tous les antibiotiques utilisés sont cités dans les tableaux 2,3,4,5 ('CASFM2019_V1.0).

- **Méthode**

- A partir d'une culture de 18 à 24h sur milieu gélosé non sélectif, préparer un inoculum bactérien en solution saline (0,9 % NaCl) équivalent au standard 0,5 McFarland ($\sim 10^8$ UFC/ml) ;
- Ensemencer par écouvillonnage les boîtes de gélose Mueller Hinton ;
- Déposer les disques d'antibiotiques sur la surface des géloses, à l'aide d'un distributeur automatique ;
- Incuber pendant 18 à 24h à 37°C ;

- **Interprétation des résultats**

Après 18 à 24h d'incubation à 37°C, les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques sont mesurés à l'aide d'un scan associé à un ordinateur révélant l'image de l'antibiogramme et l'interprétation des diamètres en Sensible (S), Intermédiaire (I) ou Résistante (R) en se référant aux critères définis par la CA-SFM-2019.

Tableau 3. Liste des antibiotiques testés pour les entérobactéries.

Familles	Antibiotiques	Abbreviations	Charge du disque (μg)	Diamètres critiques (mm)	
				Sensible	Resistant
Beta-lactamines	Amoxicilline	AMX	20	≥ 19	< 19
	Amoxicilline/acide clavulanique	AMC	20/10	≥ 19	< 19
	Céfépime	FEP	30	≥ 27	< 21
	Pipéracilline/tazobactam	TZP	30/6	≥ 20	< 17
	Cefalotine	CF	-	$\geq -$	$< -$
	Ceftriaxone	CRO	30	≥ 25	< 22
	Ertapénème	ERM	10	≥ 25	< 22
Carbapénèmes	Imipenème	IMP	10	≥ 22	< 16
Acidefosfoniques	Fosfomycine	Fos	200	≥ 19	< 19
Nitrofuranes	Nitrofurantoïne	FT	100	≥ 11	< 11
Sulfamides et associés	Sulfaméthoxazole/triméthoprim	SXT	1,25/3,75	≥ 14	< 11
Aminosides	Amikacine	AK	30	≥ 16	< 13
	Gentamicine	GM	10	≥ 17	< 14
Quinolones	Ciprofloxacine	CIP	5	≥ 26	< 24
Cyclines	Doxycycline	DOX		\geq	$<$
Polymyxine	Colistine	CO	50	-	-

Tableau 4. Liste des antibiotiques testés pour les bacilles à Gram négatifs non fermentaires.

	Antibiotiques	Abréviations	Charge du disque (μg)	Diamètre critique (mm)	
				Sensible	Resistant
Beta-lactamines	Ticarcilline	TIC	75	≥ 18	< 18
	Ticarcilline-acide clavulanique	TCC	75/10	≥ 18	< 18
	Piperacilline-acide-clavulanique	TZP		\geq	$<$
	Aztréonam	ATM	30	≥ 25	< 22
	Ceftazidime	CAZ	10	≥ 16	< 16
	Céfépime	FEP	30	≥ 19	< 19
	Méropénem	Mpm	10	≥ 24	< 18
	Imipénème	IMP	10	≥ 20	< 17
Acidefosfoniques	Fosfomycine	Fos	200	≥ 19	< 19
Rifamycines	Rifampicine	RA		\geq	$<$
Sulfamides et associés	Sulfaméthoxazole	SXT	1,25/3,75	≥ 14	< 11
Aminosides	Amikacine	AK	30	≥ 18	< 15
	Gentamicine	GM	10	≥ 15	< 15
Quinolones	Ciprofloxacine	CIP	5	≥ 26	< 26
Cyclines	Doxycycline	DOX	30	≥ 13	< 10
Polymyxine	Colistine	CO	-	'	-

Tableau 5. Liste des antibiotiques testés pour les staphylocoques.

	Antibiotiques	Abréviation	Charge du disque (µg)	Diamètre critique (mm)	
				Sensible	Resistant
Beta-lactamines	Pénicilline G	PG	-	≥26	<26
	Oxacilline	OX	-	-	-
	Amoxicilline	AMX	-	-	-
	Ceftriaxone	CRO	-	-	-
Macrolides et apparentes	Clindamycine	CL	2	≥22	<19
	Erythromycine	E	15	≥21	<18
	Pristinamycine	PT	-	-	-
Aminosides	Gentamicine	GM	10	≥18	<18
Glycopeptides	Vancomycine	VAN	-	-	-
	Teicoplanine	TEC	-	-	-
Cyclines	Doxycycline	DOX	-	-	-
	Minocycline	MN	30	≥23	<20
Nitrofuranes	Nitrofurantoïne	FT	100	≥13	<13
oxazolidinones	Linézolide	LZD	10	≥24	<24
Rifamycines	Rifampicine	RA	5	≥26	<23
Acidefosfoniques	Fosfomycine	FOS	50	≥32	<32

Tableau 6. Liste des antibiotiques testés pour les enterocoques.

	Antibiotiques	Abreviation	Charge du disque (µg)	Diametre (mm)	
				Sensible	Resistant
Beta-lactamines	Pénicilline,	PG	-	≥26	<26
	Cefoxitine	FOX	30	≥22	<22
	Oxacilline	OX	-	≥	<
Rifamycines	Rifampicine	RA	5	≥26	<23
Macrolides et apparentees	Clindamycine	CL	2	≥22	<19
	Erythromycine	E	15	≥21	<18
	Pristinamycine	PT	-	-	-
Aminosides	Gentamicine	GM	10	≥18	<18
Glycopeptides	Vancomycine	VAN	-	-	-
	Teicoplanine	TEC	-	-	-
Cyclines	Doxycycline	DOX	-	-	-
Acide fosfoniques	Fosfomycine	FOS	50	≥32	<32
Quinolones	Ciprofloxacine	CIP	5	≥21	<21
Acide fusidique	Acide fusidique	FA	10	≥24	<24
oxazolidinones	Linézolide	LZD	10	≥21	<21
Sulfamides et associes	Sulfaméthoxazole	SXT	1,25/23,75	≥17	<14

6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice par E-test

- **Principe**

Le E-test est constitué d'une bande en plastique, non poreuse, calibrée par un gradient pré-établi de concentration d'antibiotiques, couvrant 15 dilutions afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) en µg/ml d'une souche testée en milieu gélosé. Le gradient couvre une gamme de concentrations allant de 0,002 à 32 µg/ml, de 0,016 à 256 µg/ml ou de 0,064 à 1024 µg/ml selon les antibiotiques (CASFM2019_V1.0).

- **Méthode**

- Préparer un inoculum bactérien en solution saline (0,9 % NaCl) équivalent au standard 0,5 McFarland (~10⁸ UFC/ml) à partir d'une culture de 18 à 24 h ;
- Ensemencer par écouvillonnage les boîtes de gélose Mueller Hinton ;
- Sortir la boîte de bande E-test à utiliser du congélateur (-20°C) et laisser revenir à la température ambiante ;
- A l'aide d'une pince stérile retirer la bandelette par la partie supérieure et la déposer à la surface de la gélose ensemencée ;
- Incuber pendant 18 - 24h à 37°C ;

- **Interprétation du résultat**

Après incubation, chaque côté de la bandelette présente une zone d'inhibition en forme d'ellipse répartie symétriquement. Le point d'intersection entre la bandelette et l'extrémité inférieure de la zone d'inhibition représente la CMI de la souche. Il est possible de le lire directement en se référant à l'échelle graduée indiquée sur la bandelette, en microgrammes par millilitre.

7. Caractérisation moléculaire de la résistance des souches aux antibiotiques

7.1.Extraction d'ADN total bactérien

L'extraction d'ADN de toutes les souches bactériennes a été exécutée en utilisant les kits d'extraction d'ADN EZ1 de Qiagen avec l'utilisation de l'automate EZ1 Advanced XL bio-robot selon les instructions du fabricant. Le protocole est le suivant :

- Mettre 200µl de Buffer G2 (ou d'eau distillée stérile) dans les tubes d'échantillons fournis ;

- Faire une suspension bactérienne en ajoutant quelques colonies d'une culture de 18 à 24h dans les tubes d'échantillons, et vortexer afin d'homogénéiser ;
- Mettre dans un bain sec à 56°C pendant 2 h ;
- Prélever les tubes, et les déplacer vers l'automate EZ1 Advanced XL bio-robot ; Dans l'automate, choisir le volume d'éluion approprié (50, 100 ou 200µl) ;
- Placer les tubes d'échantillons, les tubes d'éluions et les tips fournis par le fabricant, en suivant les instructions affichées à l'écran du EZ1 Advanced XL bio-robot, ensuite lancer l'extraction ;
- Un maximum de 14 échantillons est réalisé à chaque fois par run ; chaque run dure 15 min ;
- Une fois le protocole fini, récupérer les tubes d'éluions (contenant l'ADN purifié) et éliminer le reste dans une poubelle appropriée ;
- Lancer une décontamination au UV de l'appareil et ainsi un deuxième run pourra être initié ;
- Conserver les tubes contenant l'ADN à 4°C ;

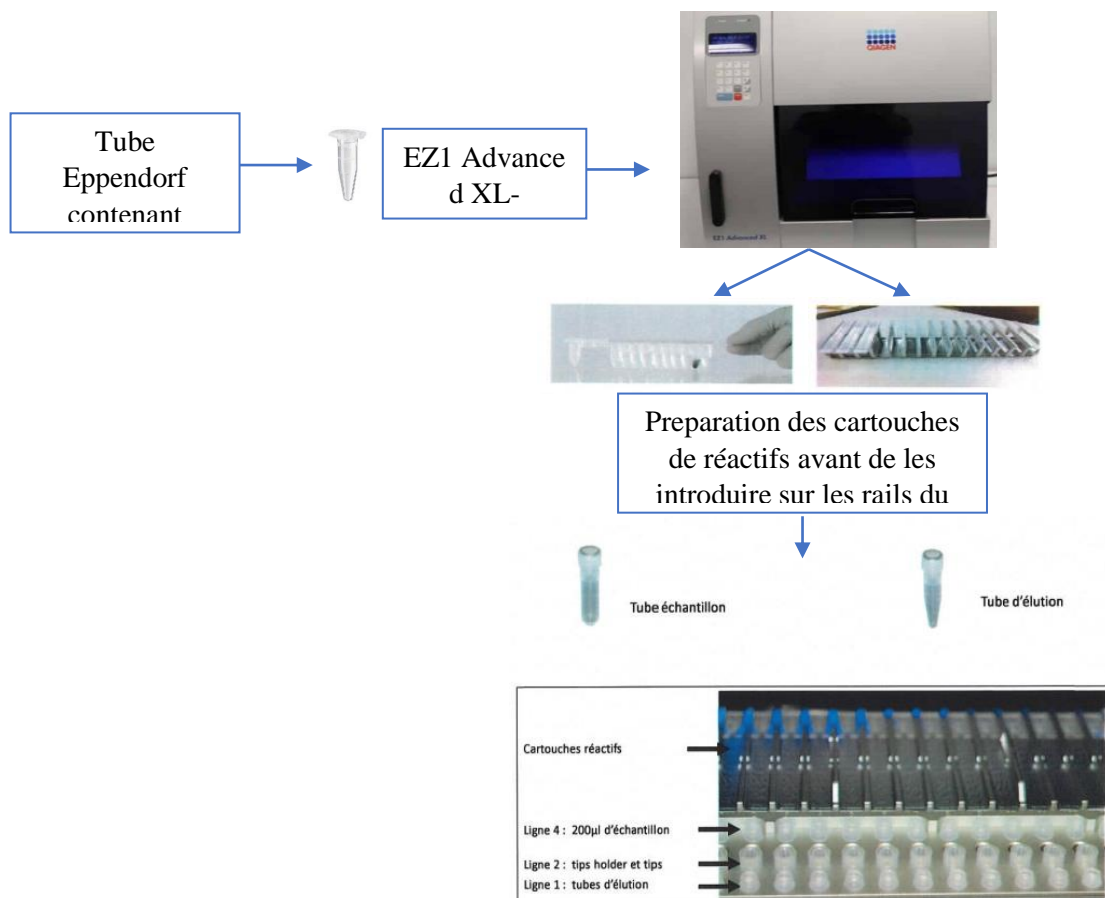


Figure 7. Protocole d'extraction de l'ADN bactérien.

7.2. Réaction de polymérisation en chaîne réalisée en temps réel

- **Principe**

Le principe de la PCR en temps réel repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant et non à la fin de la PCR, au moyen d'une sonde spécifique (TaqMan qui porte à son extrémité 5' un Fluorophore, et à son extrémité 3' un Quencher) émettant une fluorescence lors de l'élongation. La mesure de la fluorescence permet de déterminer en temps réel si le fragment recherché (amplicon) est effectivement présent et donc amplifier sans avoir besoin de faire une électrophorèse à la fin du cycle. De plus, la fluorescence émise est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction et donc la quantification de l'ADN (Poitras et Houde., 2002).

- **Protocole**

Dans une plaque BioRad spécifique au thermocycleur on dépose 20µl du mélange réactionnel dans chaque puits. La plaque est introduite, par la suite, dans l'appareil BioRad CFX 96 Real-Time PCR system en suivant les instructions du système pour le lancement du cycle (Tableau 7).

Tableau 7.Composition du mélange réactionnel pour la RT-PCR.

Composants	QuantitéqRT-PCR
Amplitaq gold Master Mix	10 µl
Amorce sens	1 µl
Amorce anri-sens	1 µl
sonde	1 µl
Eau HPLC	2 µl
AND à amplifier	5 µl
Volume total	20 µl

L'amplification est réalisée selon un programme RT-PCR (Tableau 8), en utilisant les amorces spécifiques (Tableau 9).

Tableau 8.Programme de la RT-PCR.

Activation de la polymerase	95°C, 10 minutes
Denaturation	95°C, 10 secondes
Hybridation	60°C, 30 secondes
Elongation	40°C, 30 secondes
Pendent 30 cycles	

Tableau 9. Amorces utilisées en RT-PC (Chabou et al., 2016; Loucif et al., 2022)

Genes	Amorces	Sequences	Taille des amplicons (pb)	Ref
<i>Bla TEM</i>	Forward	TTCTGCTATGTGGTGCGGTA	213	
	Revers	GTCCTCCGATCGTTGTCAGA		
	Probe	AACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTAGA		
<i>Bla SHV</i>	Forward	TCCCATGATGAGCACCTTTAAA	105	
	Revers	TCCTGCTGGCGATAGTGGAT		
	Probe	TGCCGGTGACGAACAGCTGGAG		
<i>Bla CTX A</i>	Forward	CGGGCRATGGCGCARAC	105	
	Revers	TGCRCCGGTSGTATTGCC		
	Probe	CCARCGGGCGCAGYTGGTGAC		
<i>Bla KPC</i>	Forward	GATACCACGTTCCGTCTGGA	180	
	Revers	GGTCGTGTTTCCCTTTAGCC		
	Probe	AM-CGCGCGCCGTGACGGAAAGC-TAMRA		
<i>Bla VIM</i>	Forward	CACAGYGGCMCTTCTCGCGGAGA	132	
	Revers	GCGTACGTYGCCACYCCAGCC		
	Probe	FAM-AGTCTCCACGCACTTTCATGACGACCGCGTCGGCG-TAMRA		
<i>Bla OXA-48</i>	Forward	TCTTAAACGGGCGAACCAAG	125	
	Revers	GCGTCTGTCCATCCCCTTA		
	Probe	AM-AGCTTGATCGCCCTCGATTTGGTAMRA		
<i>Bla mcr-1</i>	Forward	AAAGACGCGGTACAAGCAAC	213	
	Revers	GCTGAACATACACGGCACAG		
	Probe	FAM-GACCGCGACCGCCAATCTTACC-TAMRA		
<i>Bla mcr-2</i>	Forward	CGACCAAGCCGAGTCTAAGG	92	
	Revers	CAACTGCGACCAACACACTT		
	Probe	FAM-GCGCTGATTTTACTGCCTGTGGTG-TAMRA		
<i>Bla mcr-3</i>	Forward	ACCTCCAGCGTGAGATTGTTCCA	169	
	Revers	GCGGTTTCACCAACGACCAGAA		
	Probe	FAM-TGCACCGGATGATCAGACCCGT-TAMRA		
<i>Bla mcr-4</i>	Forward	AGAATGCCAGTCGTAACCCG	230	
	Revers	GCGAGGATCATAGTCTGCCC		

	Probe	FAM-GCCACGGCGGTGTCTCTACCC-TAMRA	
<i>Bla</i>	Forward	CTGTGGCCAGTCATGGATGT	98
<i>mcr-5</i>	Revers	CGAATGCCCGAGATGACGTA	
	Probe	FAM-TGCGACACCACCGATCTGGCCA-TAMRA	
<i>Bla</i>	Forward	AATAGCGCGGACGAATTGGAC	28
<i>VanA</i>	Revers	AACGCGGCACTGTTTCCCAA	
	Probe	FAM-AGTGCCGCGTTAGTTGGGC	
<i>Bla</i>	Forward	CTTAACGCTGCGATAGAAGC	28
<i>VanB</i>	Revers	CTG ATGGATGCGGAAGATAC	
	Probe	FAM-GAGGATGATTTGATTGTCGGCGC	

7.3. Réaction de polymérisation en chaîne standard

- **Principe**

La réaction de PCR standard consiste à amplifier *in vitro* un fragment spécifique d'ADN afin d'obtenir rapidement une quantité importante et exploitable d'un segment précis d'ADN en utilisant une paire d'amorce (sens, anti sens) (Lorenz, 2012).

- **Méthode**

Les réactions d'amplifications des gènes codant pour la résistance aux bêta-lactamines, aux fluoroquinolones, aux aminoglycosides et à la colistine ont été réalisées selon la composition citée au niveau du Tableau 10, dans un thermocycleur de type Bio-Rad.

Tableau 10. Composition des melanges reactionels pour les PCR standards.

Composants	Quantité PCR standard
Amplitaq gold Master Mix	12,5µl
Amorce sens	0,75 µl
Amorce anti-sens	0,75 µl
AND à amplifier	5 µl
H ₂ O ultra pure	6 µl
Volume total	25 µl

A la fin de la préparation du mélange réactionnel, 25µl ajouter dans chaque puits de la plaque à PCR et introduite au thermocycleur ABI 3500 xl (Genetic Analyzer) pour l'amplification des échantillons en suivant le programme décrit ci-dessous (Tableau 11). Chaque réaction de

PCR standard a utilisé un ADN d'une souche connu qui présente le gène à tester comme témoin positif.

Tableau 11.Programme de PCR standard.

Activation de la polymerase	95 °C, 15 minutes
Dénaturation	95 °C, 30 secondes
Hybridation	55 °C, 30 seconds
Elongation	72 °C, 1 minutes 30 seconds
Elongation finale	72 °C, 7 minutes
Pendent 30 cycles	

La réaction de PCR commence par une dénaturation initiale de l'ADN double brin pendant 15 min à 95°C. Cette étape est suivie par 30 cycles d'amplification de l'ADN d'intérêt avec : une étape de dénaturation de 30 secondes à 95°C, une étape d'hybridation des amorces de 50 secondes à 55°C (température variable selon la T_m des amorces), une étape d'élongation d'une durée de 1 min 30 secondes à 72°C (temps variable selon la taille du fragment à amplifier). Et finalement, une étape de terminaison de 7 min à 72°C qui permet de finir la synthèse des brins inachevés. L'interprétation des résultats a été réalisée à partir de l'électrophorèse des produits de PCR.

Tableau 12. Amorces utilisées en PCR standard et séquençage de Sanger (Kennouchi N., 2016).

Genes	Amorces	Séquences	Taille de l'amplicon (pb)
<i>BlaTEM</i>	Forward	ATGAGTATTCAACATTTCCGTG	840
	Revers	TTACCAATGCTTAATCAGTGAG	
<i>Bla SHV</i>	Forward	TTTATGGCGTTACCTTTGACC	1051
	Revers	ATTTGTCGCTTCTTTACTCGC	
<i>Bla CTX</i>	Forward	TTTGCATGTGTCAGTACCAGTAA	544
	Revers	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	
<i>aac(3)-Ia</i>	Forward	GACATAAGCCTGTTCGGTT	372
	Revers	CTCCGAACACGACCGA	
<i>aac(6')-Ib</i>	Forward	TATGAGTGGCTAAATCGAT	395
	Revers	CCCGCTTTCTCGTAGCA	
<i>aadA</i>	Forward	CCCAATTTGTGTAGGGCTTA	812
	Revers	TTGTACGGCTCCGCAGTG	
<i>ant(2')</i>	Forward	GACACAACGCAGGTCACATT	524
	Revers	CGCATATCGCGACCTGAAAGC	
<i>aph(3')-</i>	Forward	CGGAAACAGCGTTTTAGA	716

VI	Revers	TTCCTTTTGTTCAGGTC	
<i>qnrA</i>	Forward	GATAAAGTTTTTCAGCAAGAGG	543
	Revers	ATCCAGATCGGCAAAGGTTA	
<i>qnrB</i>	Forward	GACAGAAACAGGTTACCGGT	469
	Revers	CAAGACGTTCCAGGAGCAACG	

7.4. Electrophorèse sur gel d'agarose

Pour vérifier la présence d'une bonne amplification du gène cible, les produits de PCR standard ont été déposés sur un gel d'agarose à 1,5% dans une cuve à électrophorèse contenant du tampon TBE (TRIS, Borate, EDTA) à 0,5%. La migration a été réalisée pendant 20 min sous un voltage de 135V (Trivin et Le Bricon, 2003).

- **Préparation du gel d'agarose**

- Dans un flacon en verre, mélanger 1,5 g de poudre d'agarose avec 100ml de TBE (TrisBorate-EDTA) à 0.5X ;
- Faire fondre le mélange au four à micro-ondes jusqu'à l'obtention d'un mélange parfaitement transparent et laisser refroidir ;
- Récupérer 50ml de cette solution TBE et ajouter 2 µl de Syber Safe et bien mélanger ;
- Couler le gel dans le support du gel après avoir mis les peignes et laisser refroidir jusqu'à solidification du gel ;

- **Electrophorèse des produits d'amplification**

- Retirer les peignes après solidification du gel ;
- Placer le gel dans la cuve d'électrophorèse ;
- Remplir la cuve d'électrophorèse avec le tampon TBE 0.5X (le gel doit être totalement émergé) ;
- Déposer 4µl d'ADN marqueur de poids moléculaire dans le premier puits ;
- Mélanger 4µl du produit amplifié (ADN) avec une goutte du Blue Juice ;
- Déposer le produit amplifié avec les deux témoins (négatif et positif) dans les puits qui suivent le marqueur ;
- Fermer le couvercle de la cuve, brancher la cuve au générateur, mettre sous tension à 135V et régler la durée de migration (pendant 20 min) ;

- **Révélation des bandes d'ADN aux rayons UV**

Une fois la migration finie, le gel d'agarose a été exposé aux rayons ultra-violet pour visualiser les bandes d'ADN. Le poids moléculaire des bandes présentes a été comparé avec

le poids moléculaire qui correspond au fragment amplifié du gène recherché, et celui du témoin positif. Une photo a été prise.

7.5. Séquençage de Sanger

- **Principe**

Après vérification de l'amplification des gènes recherchés et de la présence de bandes d'ADN par PCR standard les fragments ont été utilisés pour effectuer le séquençage selon la méthode de Sanger par le séquenceur automatique ABI 3500 xl et le kit BigDyeTerminator Matrix Standard (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA) selon les instructions du fabricant. Le séquençage a pour but de déterminer la séquence nucléotidique de l'ADN isolé. Cette technique utilise en plus des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs), des didésoxyribonucléotides (ddNTPs) qui diffèrent des dNTPs par l'absence d'un groupement OH en position 3' et dont l'incorporation aléatoire va bloquer la réaction de polymérisation (Freney et al., 2007).

- **Protocole**

- Purification des produits de la PCR standard : pour purifier les produits de PCR, 100 µl d'eau ultra-pure ont été ajoutés dans la plaque de PCR contenant ces produits ; le mélange obtenu a été transféré dans une plaque à filtre pour une filtration sous une pompe à vide pendant 20 min. Cette filtration est effectuée en utilisant des plaques de filtration 96 puits AcroPrep™ Advance constituées d'une membrane exclusive à base de silice. Cette membrane permet d'éliminer efficacement les amorces, les dNTPs, les nucléotides non incorporés, les enzymes et les sels de PCR sur un équipement automatisé. Après aspiration sous vide un autre volume de 50 µl d'eau ultra-pure a été ajouté dans la plaque à filtre et celle-ci a été déposée sur un vibreur automatique de plaques (Heidolph) pendant 20 min.
- La PCR BigDye : est une PCR classique comprenant les étapes de dénaturation de l'ADN, d'hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée et d'élongation grâce à l'action d'une ADN polymérase. La particularité de cette PCR est la préparation du mélange réactionnel avec un seul type d'amorce, ce qui équivaut à deux mélanges réactionnels à préparer pour un gène donné.

Pour ce faire deux mélanges réactionnels de 10µl ont été préparés avec un seul type d'amorce (amorces sens et anti-sens). Ces mélanges ont été composés de 1µl du tampon

BigDye, 1µl de mix BigDye, 3µl d'eau, 4µl des produits de PCR purifiés et 0,5µl d'amorce sens ou anti-sens (Tableau 13). L'amplification a consisté en une étape de dénaturation initiale de l'ADN pendant 1 min à 96°C. Cette étape a été suivie de 25 cycles d'amplification comprenant une dénaturation à 96°C pendant 10 secondes, une hybridation à 50°C pendant 5 secondes et une élongation à 60°C pendant 3 min (Tableau 14).

- Purification des produits de PCR Big-Dye par le Sephadex : cette méthode est basée sur la purification par chromatographie d'exclusion pour piéger des ddNTPs libres en excès qui sont de bas poids moléculaires sur une colonne. Ainsi, dans une microplaque de filtration remplie de la poudre Sephadex G-50 DNA Grade (Dutscher), 300 µl d'eau ultra pure ont été ajoutés et le mélange a été laissé au repos pendant 3 h. Après ce temps, une nouvelle plaque a été placée en dessous de la première contenant le Sephadex et l'ensemble a été centrifugé à 1300 tours/min pendant 2 min. L'eau recueillie dans la plaque en dessous a été éliminée. Les produits de la PCR BigDye ont été, ensuite, ajoutés dans la microplaque contenant le Sephadex ; une seconde plaque pour séquençage a été placée en dessous pour une autre centrifugation afin de récupérer l'ADN destiné au séquençage.
- Les fiches pour séquençage ont été remplies et la plaque pour le séquençage a été mise sur le support puis introduite dans le séquenceur ABI 3500 xl (Genetic Analyzer) pour analyse.

Tableau 13. Composition des mélanges réactionnels pour la PCR BigDey.

Composants	Quantite PCR BigDye
Buffer	1 µl
Mix BigDay	1 µl
Amorces Forward	0,5 µl
Amorces Revers	0,5 µl
AND à amplifier	4 µl
H ₂ O	3 µl
Volume totale	10 µl

Tableau 14. Programme de la PCR BigDye.

Activation de la polymerase	96 °C, 1 min
Denaturation	96 °C, 10 secondes
Hybridation	50 °C, 5 secondes
Elongation	60 °C, 3 min
Pendent 25 cycles	

- *Analyse des séquences ADN* : les séquences nucléotidiques obtenues ont été analysées et corrigées en utilisant le logiciel Chromas-Pro et le site internet spécialisé de bioinformatique NCBI. Après correction, les séquences ont été analysées dans la banque de données *Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation* (ARG-ANNOT) pour l'identification des gènes.

ARG-ANNOT est un nouvel outil bioinformatique qui a été créé pour détecter les nouveaux gènes de résistance aux antibiotiques dans les génomes bactériens. ARG-ANNOT utilise un programme local BLAST dans le logiciel Bio-Edit, cela permet à l'utilisateur d'analyser des séquences sans interface Web (Gupta et al., 2014).

7.6. Séquençage de nouvelle génération Miseq Illumina

Le séquençage de nouvelle génération (NGS) a été réalisé uniquement pour les espèces d'*Eterococcusfaecium* parmi le nombre total des souches bactériennes isolées.

- **Principe**

Le séquençage Illumina est une méthode de séquençage de nouvelle génération, également appelée méthode de « séquençage par synthèse », impliquant dans le traitement en parallèle de millions de fragments. Le principe de cette technologie qui génère des fragments d'ADN de courtes séquences, repose sur une amplification en ponts des fragments d'ADN sur support solide (flow cell) suivi d'un séquençage par synthèse chimique (SBS) des colonies d'ADN préalablement amplifiés (Meyer et Kircher, 2010).

- **Protocole**

- Préparation de la bibliothèque : cette étape consiste à préparer les échantillons d'ADN à être compatibles avec un séquenceur. Les bibliothèques de séquençage sont généralement créées en fragmentant l'ADN et en ajoutant des adaptateurs spécialisés aux deux extrémités. Dans le flux de travail de séquençage Illumina, ces adaptateurs contiennent des séquences complémentaires qui permettent aux fragments d'ADN de se lier à la cellule de flux. Les fragments peuvent ensuite être amplifiés et purifiés. Pour économiser des ressources, plusieurs bibliothèques peuvent être regroupées et séquencées dans la même exécution, selon un processus appelé multiplexage. Pendant la ligature de l'adaptateur, des séquences d'index uniques ou « codes-barres », sont ajoutées à chaque bibliothèque. Ces codes-barres sont utilisés pour distinguer les bibliothèques lors de l'analyse des données.

- Séquençage : pendant l'étape de séquençage du flux de travail NGS, les bibliothèques sont chargées sur une cellule de flux et placées sur le séquenceur. Les grappes de fragments d'ADN sont amplifiées dans un processus appelé génération de grappes, résultant en des millions de copies d'ADN simple brin. Sur la plupart des instruments de séquençage Illumina, le regroupement se produit automatiquement. Dans un processus appelé séquençage par synthèse (SBS), les nucléotides chimiquement modifiés se lient au brin modèle d'ADN par complémentarité naturelle. Chaque nucléotide contient une étiquette fluorescente et un terminateur réversible qui bloque l'incorporation de la base suivante. Le signal fluorescent indique quel nucléotide a été ajouté, et le terminateur est clivé afin que la base suivante puisse se lier. Après avoir lu le brin d'ADN, les lectures sont emportées et le processus se répète pour le brin inverse. Cette méthode est appelée séquençage d'extrémités appariées.
- Analyse des données : après le séquençage, le logiciel de l'instrument identifie les nucléotides par un processus appelé appel de base. Pendant l'analyse, les données de séquençage sont importées dans un outil d'analyse (pipeline ou un outil d'analyse bioinformatique).

7.6.1. Analyses bioinformatique des données brutes du séquençage sur la pipeline en ligne Galaxy (Australia)

- **Principe**

Le workflow Galaxy fournit un ensemble d'outils pour la manipulation et l'analyse de données génomiques et offre différents paramètres d'exécution permettant l'analyse des résultats NGS, grâce à des versions en ligne régulièrement mises à jour et accessibles à tous les utilisateurs (Griffiths et al., 2016).

Les données à lecture courte produites par le séquençage Illumina ont été analysées étape par étape sur ce logiciel.

- **Protocole**

- Assemblage *de novo* réalisé à l'aide de Spades après un contrôle de qualité effectué avec QuastQuality Control ;
- L'annotation du génome a été effectuée à l'aide de ProkaryoticGenome Annotation ;
- L'identification des gènes de résistance aux antimicrobiens acquis, en utilisant la base de données ARG-ANNOT de ABRicate disponible sur les paramètres de la pipeline Galaxy ;
- Détermination des types de séquence (ST) par une analyse MLST (Multi Locus Sequence Typing) en utilisant la base de données MLST disponible aussi sur les paramètres de la pipeline Galaxy ;

7.6.2. Alignement et réorganisation des génomes à l'aide du logiciel Mauve

- **Principe**

Multiple genome alignments (Mauve) est un système permettant de construire des alignements multiples des génomes en présence d'événements évolutifs à grande échelle tels que les réarrangements les inversions et les mutations. Les alignements multiples des génomes constituent une base pour la recherche en génomique comparative et l'étude de la dynamique de l'évolution à l'échelle du génome (Darling et al., 2009).

- **Protocole**

- Ouvrir l'interface du logiciel Mauve préalablement installé sur le serveur ;
- Créer un dossier de sortie sur le bureau du serveur pour la récupération des résultats ;
- Sur l'interface Mauve, placer les contigs des séquences requêtes avec des informations conflictuelles dans la position initiale correspondante ;
- Placer la séquence de référence dans la position en dessous pour faire correspondre les extrémités et lancer l'exécution ;
- Filtrage des correspondances et optimisation des résultats de l'alignement itératif jusqu'à ce qu'aucun autre ordre ne soit possible ;
- Les résultats obtenus sont localisés sur le fichier de sortie dans lequel figure un fichier FastA contenant les résultats de la réorganisation, le nouvel ordre, la nouvelle orientation, ainsi qu'une liste de contigs ordonnés ;

7.6.3. Représentation graphique du matériel génétique via l'interphase Easyfig

- **Principe**

Easyfig est une application Python permettant de créer des figures de comparaison linéaire de plusieurs loci génomiques avec une interface graphique facile à utiliser. Les comparaisons BLAST entre de multiples régions génomiques, allant de gènes uniques à des chromosomes des procaryotes, peuvent être générées, visualisées et colorées de manière interactive, ce qui permet une transition rapide entre l'analyse et la préparation de figures de qualité pour la publication.

- **Protocole**

- Les illustrations graphiques sont obtenues par insertion de la séquence génomique de référence et la séquence génomique à analyser sous format GBK ;

- En s'appuyant sur les paramètres de l'interface, sélectionner les couleurs et les légendes désirées ;
- A la fin de l'analyse, la figure réalisée peut être téléchargée et stockée dans le bureau de l'ordinateur (Sullivan, 2011).

7.6.4. Analyse BLAST sur NCBI database et représentation circulaire de l'environnement génétique par le logiciel CGview

L'environnement génétique a été reconstitué *in silico* pour l'alignement et la comparaison avec les séquences disponibles sur NCBI par un BlastN pour permettre de réaliser une représentation graphique sur CGview.

- **Principe**

CG View est un package Java qui offre une interface en ligne de commande pratique et dispose de capacités d'analyse intégrées générant des représentations. Son principe est de servir de composant de pipelines d'annotation de séquences, et de moyen de générer une sortie visuelle. CGView convertit les informations informatiques de séquences GBK fournit ou des séquences FASTA en une carte graphique (format PNG, JPG ou SVG), avec des étiquettes, un titre, des légendes et des notes de bas de page. Il dispose aussi d'une fonctionnalité BLAST utilisée pour comparer la séquence de référence avec chacun des ensembles de données téléchargés (Grant et al., 2023).

- **Protocole**

- Charger la séquence génétique ou génomique sous format FASTA ou GBK dans le pipeline CGview ;
- Charger les séquences de référence pour servir au moyen de la comparaison des données annotés ;
- Utiliser les différentes options disponibles sur les paramètres du pipeline pour générer la représentation graphique ;
- Enregistrer et télécharger l'image sous format JPG ou JSON ;

Résultats

1. Caractéristiques de la population d'étude

Durant la période d'étude, allant du 1^{er} Janvier 2020 au 31 Janvier 2022, au niveau du service de gynécologie obstétrique de l'EHS El Bouni-Annaba, nous avons réalisé 52 prélèvements de pus de plaies du site opératoire sur un total de 2709 interventions chirurgicales. Toutes les patientes étaient admises à l'hôpital pour des indications gynécologiques et obstétricales. La fréquence d'ISO de notre étude était de 1,9 % (Figure 8).

■ Intervention chirurgicale sans ISO ■ Intervention chirurgicale avec ISO

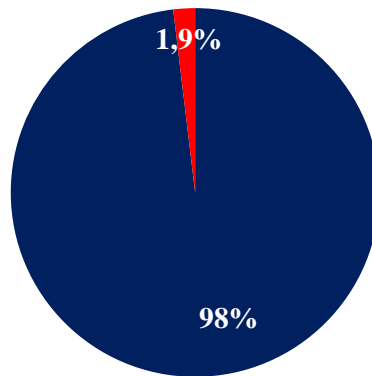


Figure 8. Prévalence des infections chirurgicales des ISO en gynécologie obstétrique.

La survenue des ISO semble plus fréquente dans les indications opératoires en urgence (69 %) que dans le cas des indications programmées (31 %) (Figure 9).

■ Urgence ■ Programme

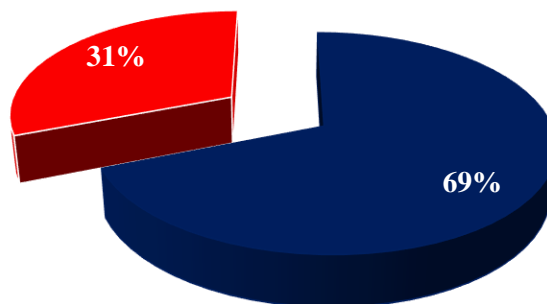


Figure 9. Répartition des patientes ayant une ISO en fonction du moment de l'intervention.

La répartition des ISO selon le type d'indication opératoire montre une nette prédominance des indications d'ordre obstétrical avec 46 césariennes soit 88 % des cas, réparties comme suit: asphyxie fœtale, présentation du siège, macrosomie, hématome rétroplacentaire (Figure 10), contre 6 indications gynécologiques soit 11% des cas réparties comme suit : 3 mastectomies, 2 hystérectomies et un kyste ovarien (Figure 11).

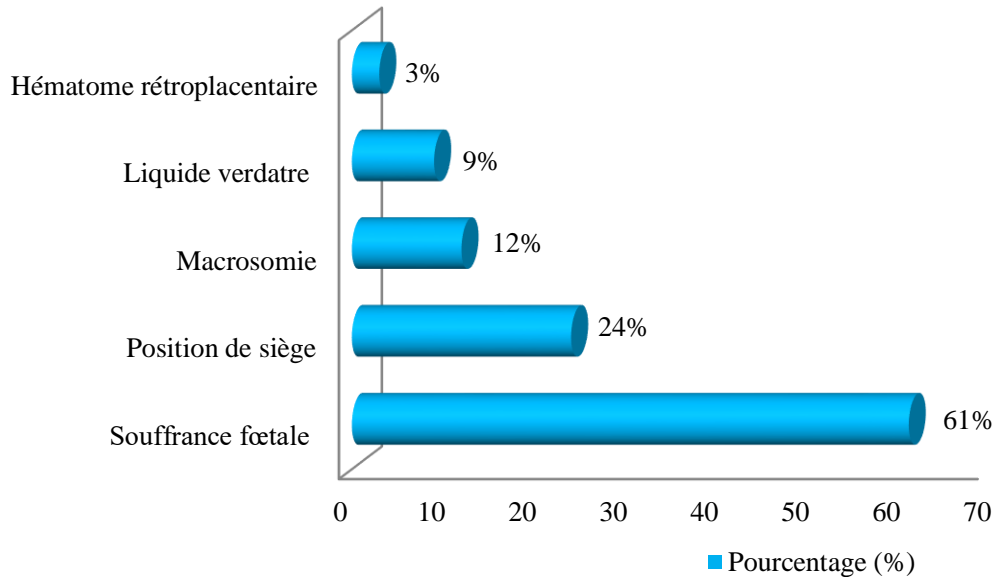


Figure 10. Répartition des patientes présentant une ISO en fonction des différentes indications obstétricales d'ordre fœtal.

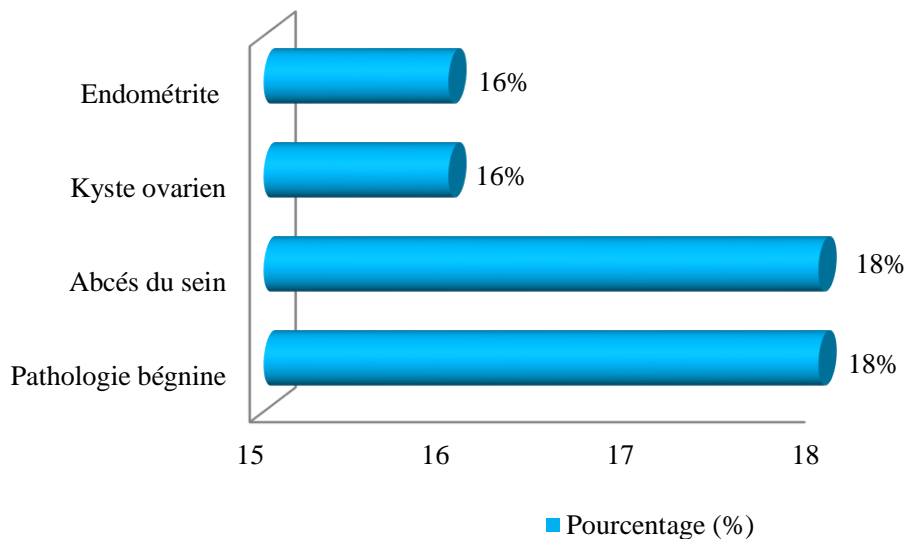


Figure 11. Répartition des patientes ayant une ISO en fonction des différentes indications gynécologiques.

2. Les facteurs de risque de survenue d'ISO

2.1. Facteurs liés aux patientes

a) **Niveau socio-économique** : la majorité de nos patientes avaient un niveau socio-économique moyen soit 80 % contre 20 % ayant un niveau socio-économique faible (Figure 12).

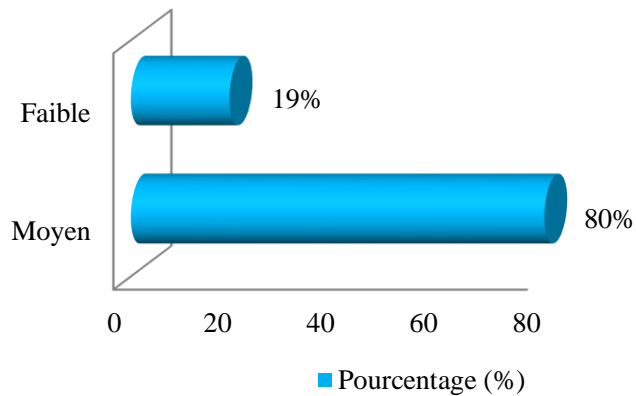


Figure 12. Répartition des patientes selon le niveau socio-économique.

b) **L'âge** : L'âge moyen de nos patientes était de $33,93 \pm 8,28$ ans, allant de 24 à 64 ans avec une nette prédilection pour la classe d'âge 30-40 ans qui représente plus de la moitié de nos patientes soit 51 % des cas (Figure 13 et 14).

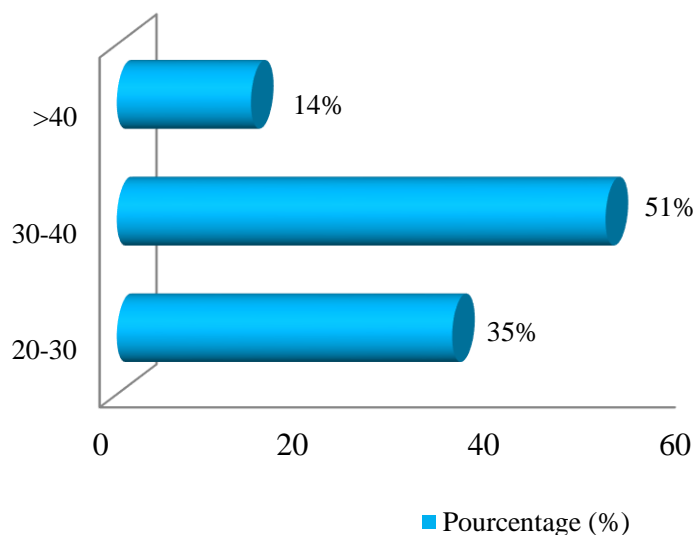


Figure 13. Répartition selon l'âge des patientes présentant une ISO.

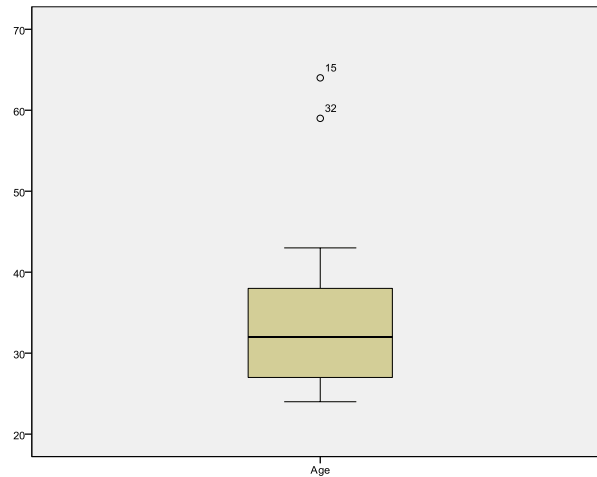


Figure 14. Diagramme en boîte de la variable âge de notre cohorte d'étude.

Les Tableaux 12, 13 et 14 illustrent l'effectif et le pourcentage de chaque variable liée aux patientes, à l'intervention et à la prise en charge post-opératoire.

c) Score ASA : plus de la moitié de nos patientes soit 57.6% des cas avaient un score ASA 2. Seule 29 % des patientes avaient un score ASA 1 au moment de l'intervention, quant au score ASA 3, il ne représente que 13.4 % des cas, (Tableau 15).

d) IMC : l'analyse des données de l'étude a montré que 63 % des patientes étaient obèses avec un indice de masse corporelle (IMC) ≥ 30 kg/m². L'IMC moyen était de $30,8 \pm 5,6$ kg/m² avec des valeurs allant de 21 à 42 kg/m² (Tableau 15).

e) Comorbidités : Quant aux antécédents pathologique des patientes, nous avons retrouvé une anémie chez 16 patientes soit une fréquence de 31 %, un diabète chez 10 patientes soit 19,2% des cas et une association diabète/HTA chez 4 de nos patientes soit 7,6 % des cas (Tableau 12). Les antécédents chirurgicaux étaient dominés par l'utérus cicatriciel dans 29 % des cas.

f) La parité : la parité moyenne est de $1,5 \pm 0,5$ avec une nette prédominance des ISO chez les multipares (≥ 3 enfants) soit une fréquence de 30,6 % des cas (Tableau 15).

g) Les ruptures prématurées: elles sont supérieures à 12 heures et représentent 38 % des cas (Tableau 15).

Tableau 15. Répartition des femmes selon les facteurs personnels liés au terrain de survenue des ISO.

		Effectif N=52	Pourcentage (%)	Moyenne ± SD	P value	IC à 95%
ASA	1	15	29			
	2	30	57,6		0,4	0,2 - 1,9
	3	7	13,4		0,0001	0,3 - 0,7
IMC	< 30	19	36			
	≥ 30	33	63			
Antécédents médicaux	Aucune maladie systémique	20	38,4			
	Anémie	16	31			
	Diabète	10	19,2		0,4	0,1 – 2,3
	HTA, Diabète	4	7,6		0,5	0,05 – 4,8
	HTA	2	3,8		0,1	1,2 – 1,8
Antécédents chirurgicaux	Aucun antécédent	37	71		0,2	
	Utérus cicatriciel	15	29			
parité	< 3	25	69,4	2,50 ± 1,50		
	≥ 3	11	30,6			
RPM	< 6	14	27	13,25 ± 4,3		
	6-12	4	8			
	12-48	20	38			
	≥ 48	14	27			

2.2. Facteurs liés à l'intervention

Au moment de l'acte chirurgical, les patientes sont exposées à certains facteurs physiologiques qui peuvent compliqué le déroulement de l'intervention. Dans notre enquête clinique nous rapportons quelques-uns de ces facteurs comme : la classe de contamination d'Altemeier qui correspond à une contamination propre contaminée équivalente à la classe II chez toutes les patientes (Tableau 16).

Les conditions d'hémostase étaient bonnes dans 81 % des cas, La durée des interventions a été estimée à moins de 60 min dans (81% des cas), L'hémostase était laborieuse chez 19 % de nos patientes (Tableau 16).

Tableau 16. Facteurs liés aux conditions de l'intervention.

		Effectif n=52	Pourcentage (%)	Moyenne ± SD
Durée de l'intervention (min)	< 60	42	81	48,04 ± 10,93
	> 60	10	19	
Antibioprophylaxie	Oui	52	100	-
	Non	0	-	
Classe d'Altemeier	Propre	0	-	-
	Propre contaminé	52	100	
	Contaminé	0	-	
	Sale	0	-	
Type d'anesthésie	Général	17	25	-
	Rachi	35	75	
Niveau de l'opérateur	Médecin résidant	32	88,9	-
	Professeur et/ou assistants	4	11,1	
Hémostase	Bonne	42	81	-
	Difficile	10	19	
Drainage	Oui	9	17	-
	Non	43	83	

2.3. Facteurs liés à la prise en charge post-opératoire

Le délai moyen entre l'intervention et l'apparition de la suppuration de la plaie chirurgicale est de $2,31 \pm 0,8$ jours, avec des extrêmes allant de 3 à 25 jours (Tableau 17).

Toutes les ISO ont nécessité une ré-hospitalisation dont la durée varie de 2 à 34 jours avec un délai moyen de séjour hospitalier de $6,29 \pm 0,64$ (Tableau 17).

Sur le plan biologique, on note une CRP élevée dans 87 % des cas et une HB diminuée attestant une anémie chez les patientes dans 71 % des cas (Tableau 17).

La prise en charge thérapeutique a consisté en un nettoyage local à base de Bétadine et d'eau oxygénée deux fois par jours associé à la prescription d'une antibiothérapie probabiliste à large spectre redressée par la suite selon l'antibiogramme, comme indiqué ci-dessous (Tableau 17).

Tableau 17. Répartition des femmes selon les facteurs liés à la prise en charge post-opératoire de survenue des ISO.

		Effectif n=52	Pourcentage (%)	Moyenne ± SD
Délai entre l'intervention et l'infection (jours)	≤ 7	33	63,4	2,31 ± 0,8
	> 7	19	37	
Durée du séjour postopératoire (jours)	≤ 16	29	80,6	10,76 ± 6,24
	> 16	7	19,4	
CRP (mg/l)	Elevé	45	87	84,44 ± 61,83
	Normal	7	13	
Hémoglobine (gd/l)	Diminuée	37	71	-
	Normal	15	29	
Antibioprophylaxie	Cefacet/ Gentamicine/ Bactrim	13	30,2	
	Cefacet/ Gentamicine/ Flagyl	11	25,6	
	Cefacet/ Gentamicine	7	16,3	
	Flagyl/ Claforan/ Gentamicine	5	11,6	
	Claforan/ Flagyl	4	9,3	
	Bactrim/ Flagyl/ Gentamicine	3	7	

Parmi l'effectif totale des ISO colligées dans notre cohorte d'étude, 60 % des ISO en obstétrique et 6 % des ISO en gynécologie ont été enregistrées en milieu extra-hospitalier. Un pourcentage de 31 % des ISO en obstétrique et 4 % des ISO en gynécologie ont survécu avant la sortie des patientes de l'établissement de santé. Ces observations témoignent réellement que les ISO étant considérées comme des IAS, leurs manifestations peuvent avoir lieu durant toute la période de prise en charge post opératoire qu'elle soit à l'hôpital ou en milieu communautaire, affirmant la nécessité du suivi des patientes après leur sortie et ce, jusqu'à 30 jours après l'intervention (Figure 15).

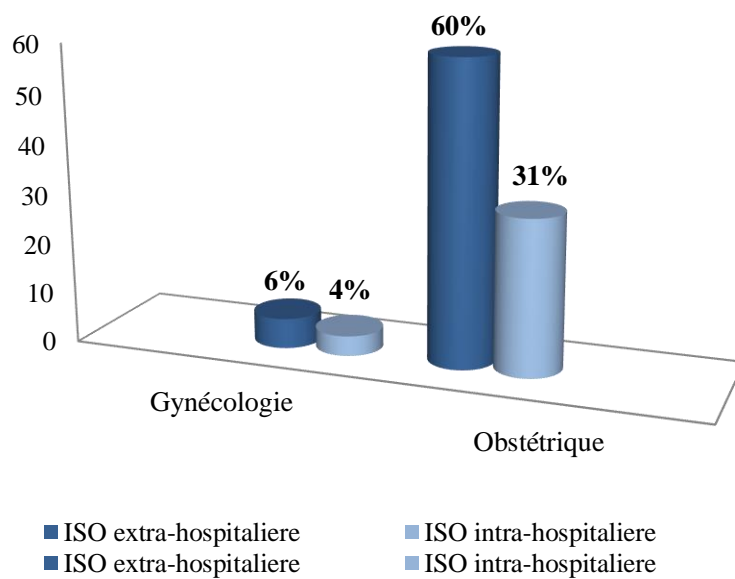


Figure 15. Manifestation des ISO en milieu Intra et Extra-hospitalier.

Sur les 2709 interventions chirurgicales correspondant à des interventions de classe d'Altemeier 2 pour lesquelles une antibioprofylaxie pre-opératoire était systématiquement indiquée, les patientes ont reçu une molécule à large spectre ; il s'agit d'une céphalosporine de 1^{ère} génération (C1G): Cefalexine.

Sur les 52 cas d'ISO apparu après l'acte chirurgical, une antibiothérapie à large spectre et de premier recourt a été prescrite dès l'admission du cas infecté. L'association des différents antibiotiques prescrits est illustrée sur la Figure 16.

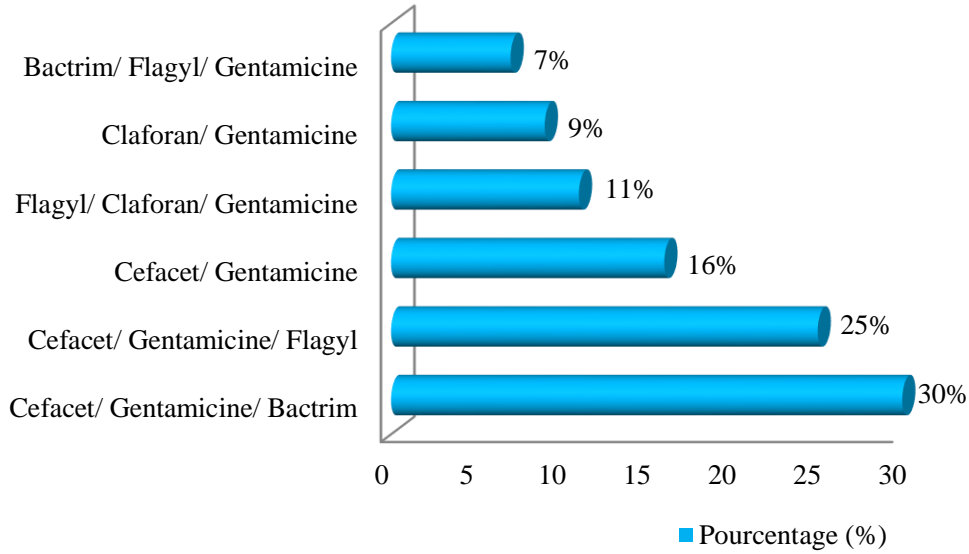


Figure 16. Les différentes associations d’antibiotiques reçus en antibiothérapie.

3. Analyse bactériologique des prélèvements de pus d’ISO

La Figure 17 représente le nombre d’échantillons utilisé dans cette étude en se basant sur les critères d’inclusion et d’exclusion.

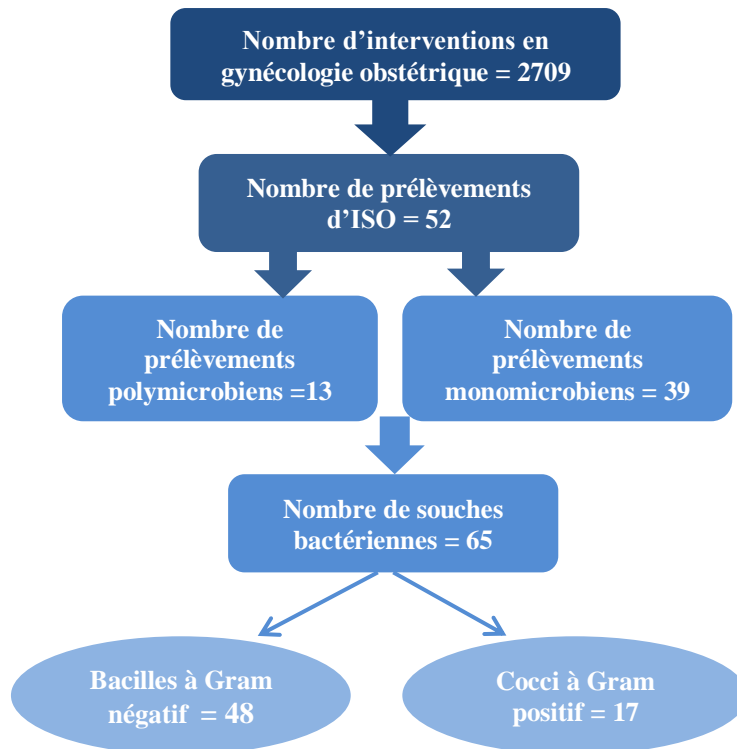


Figure 17. Schéma du protocole d’identification des espèces bactériennes et des gènes de résistances

3.1. Isolement et identification des souches bactériennes isolées

Durant notre échantillonnage total de 2709, 65 espèces bactériennes ont été isolées des prélèvements de pus d'ISOdes patientes incluses dans notre étude. Parmi ces souches bactériennes, nous avons isolé une large diversité d'espèces bactériennes dont, 71% d'entérobactéries, 3 % *P. putida*, 18 % d'*Enterococcus spp* et 8 % de *Staphylococcus spp*, comme illustré sur la Figure 18.

Pour étudier la diversité en composante bactérienne des prélèvements de pus des ISO, tous les prélèvements collectés (n=52) ont été répartis selon leur diversité: 39 (75 %) prélèvements monomicrobiens et 13 (25 %) prélèvements polymicrobiens (Figure 19).

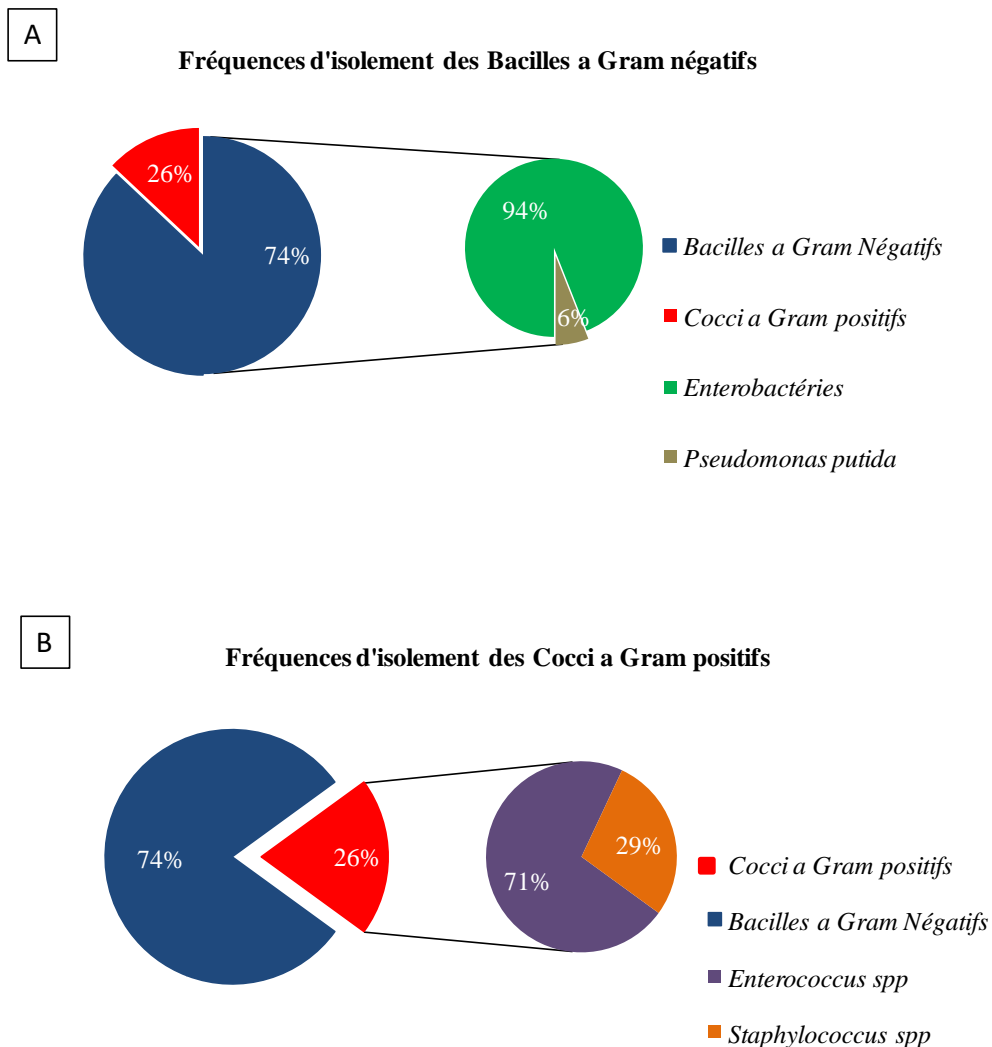


Figure 18. Répartition des souches bactériennes isolées des prélèvements de pus des ISO : (A) répartition des espèces bactériennes à Gram négatif ;(B) répartition des espèces bactériennes à Gram positif

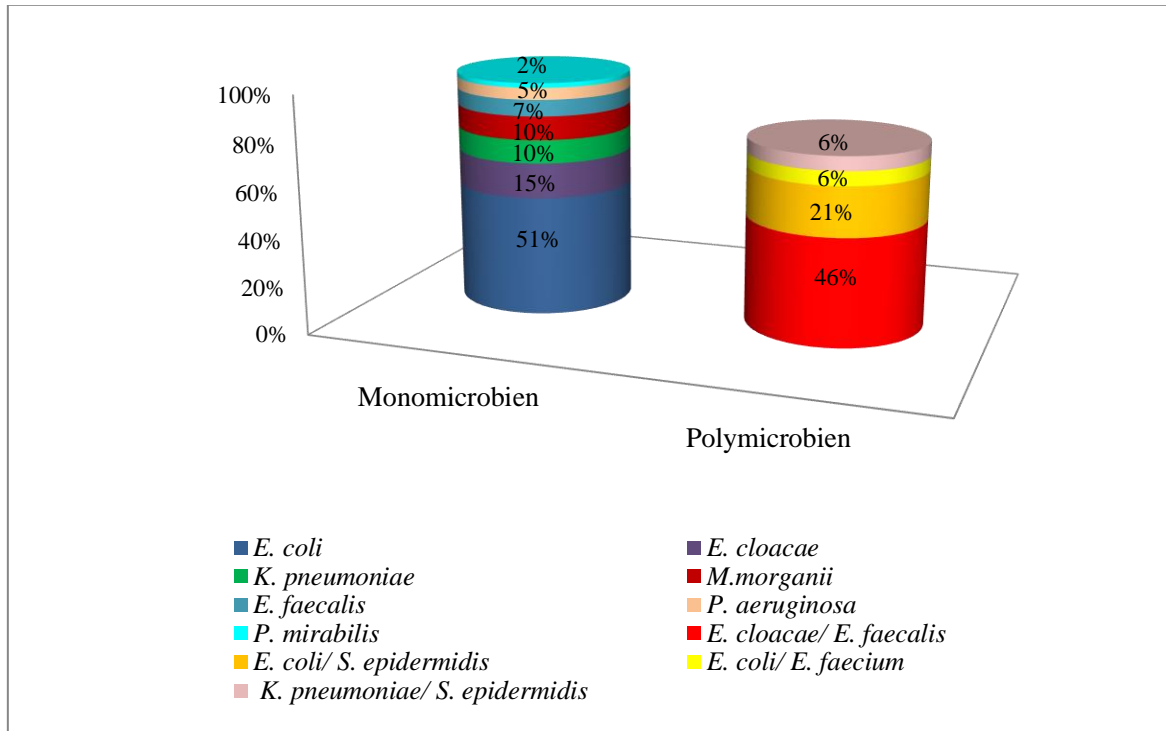


Figure 19. Répartition des différentes espèces bactériennes isolées selon le type de contamination microbienne : monomicrobienne (75 %) et polymicrobienne (25 %).

3.2. Identification biochimique

L'identification des souches bactériennes a été effectuée en premier lieu par les Api systèmes (Api 20E, Api 20NE, Api *Strep* et Api *Staph* de bioMérieux, Meylan, France). Les résultats ont été interprétés à l'aide d'une feuille de calcul Excel (Figure 20).

- Api 20E : *E.coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *M. morganii*, *P. mirabilis*;
- Api 20NE : *P. aeruginosa*, *P. putida*, *A. pittii* ;
- Api *Staph*: *S. aureus*, *S. epidermidis* ;
- Api *strep* : *E. faecalis*, *E. faecium*;

3.3. Identification par MALDI-TOF

Toutes les identifications biochimiques des souches bactériennes ont été confirmées par la spectrométrie de masse MALDI TOF-MS, avec une valeur de score > 1.9 (Figure 21), révélant les résultats suivants: *Escherichia coli* (n= 23), *Enterobacter cloacae* (n= 13), *Klebsiella pneumoniae* (n= 5), *Pseudomonas putida*(n=2), *Morganella morganii*(n= 4), *Proteus mirabilis* (n= 1), *Enterococcus faecalis* (n= 10), *Enterococcus faecium* (n= 2), *Staphylococcus epidermidis* (n= 3), *Staphylococcus aureus* (n= 2).

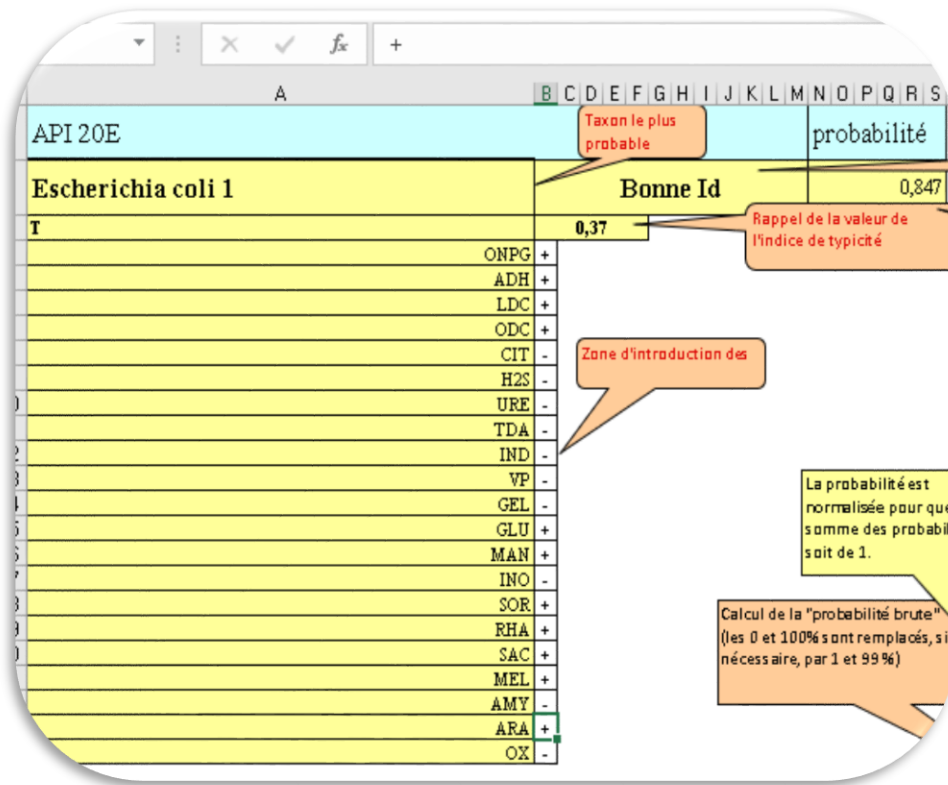


Figure 20. Résultat de l'identification des souches par la feuille de calcul Excel.

B7 (+++)(A)	B7 (standard)	Escherichia coli	2.29	Escherichia coli	2.20
B8 (+++)(A)	B8 (standard)	Escherichia coli	2.31	Escherichia coli	2.21
B9 (+++)(A)	B9 (standard)	Escherichia coli	2.26	Escherichia coli	2.14
F3 (+++)(A)	F3 (standard)	Enterococcus faecalis	2.48	Enterococcus faecalis	2.43
F4 (+++)(A)	F4 (standard)	Enterococcus faecalis	2.50	Enterococcus faecalis	2.48
F5 (+++)(A)	F5 (standard)	Enterococcus faecalis	2.18	Enterococcus faecalis	2.17

Figure 21. Exemple des scores d'identification bactérienne obtenus par MALDI-TOF.

4. Provenance des souches bactériennes

Le Tableau 18 présente la provenance des souches bactériennes isolées au niveau de l'établissement de santé, la nature des prélèvements, l'âge des patientes et l'acte chirurgicale.

Tableau 18. Provenance des souches bactériennes identifiées, isolées des patientes durant les deux années d'échantillonnage.

Code	Date du prélèvement	Type de prélèvement	Service	Acte chirurgical	Espèces bactériennes
P01	11/02/202			Césarienne	<i>P.mirabilis</i>
P02	13/02/2020			Césarienne	<i>E.coli</i>
P03	13/02/2020			Césarienne	<i>E.cloacae ; E.faecalis</i>
P04	13/02/2020			Césarienne	<i>E.cloacae</i>
P05	16/02/2020			Césarienne	<i>E.cloacae ; E.faecalis</i>
P06	25/02/2020			Césarienne	<i>E.cloacae</i>
P07	01/03/2020			Césarienne	<i>E.cloacae ; E.faecalis</i>
P08	09/03/2020			Césarienne	<i>E.coli</i>
P09	15/03/2020			Césarienne	<i>E.coli</i>
P10	10/09/2020			Césarienne	<i>E.coli ; S.aureus</i>
P11	20/09/2020			Césarienne	<i>E.cloacae</i>
P12	05/11/2020		Gynécologie Obstétrique	Césarienne	<i>E.coli ; S.aureus</i>
P13	08/11/2020			Césarienne	<i>E.coli</i>
P14	13/11/2020			Césarienne	<i>E.coli</i>
P15	16/11/2020			Césarienne	<i>E.cloacae ; E.faecalis</i>
P16	19/11/2020			Césarienne	<i>E.cloacae</i>
P17	09/12/2020			Césarienne	<i>E.faecalis</i>
P18	10/12/2020			Césarienne	<i>E.cloacae</i>
P19	15/12/2020			Hysterectomie	<i>E.faecalis</i>
P20	21/12/2020			Césarienne	<i>E.coli</i>
P21	22/12/2020			Césarienne	<i>P.putida</i>
P22	23/12/2020			Mastectomie	<i>E.coli ; S.epidermidis</i>
P23	27/12/2020			Césarienne	<i>E.coli</i>
P24	28/12/2020			Césarienne	<i>P.putida</i>
P25	31/12/2020			Césarienne	<i>E. faecalis</i>
P26	04/01/2021			Césarienne	<i>E.faecalis</i>
P27	07/01/2021			Césarienne	<i>E.coli</i>

P28	11/01/2021	Césarienne	<i>E.cloacae, E.faecalis</i>
P29	31/01/2021	Césarienne	<i>E.cloacae, E.faecalis</i>
P30	10/02/2021	Césarienne	<i>E.coli</i>
P31	31/02/2021	Césarienne	<i>E.coli</i>
P32	17/02/2021	Césarienne	<i>E.coli</i>
P33	17/02/2021	Césarienne	<i>E.coli,</i>
P34	22/02/2021	Césarienne	<i>E.coli, S.epidermidis</i>
P35	18/03/2021	Césarienne	<i>E.coli, E. faecium</i>
P36	22/03/2021	Césarienne	<i>M.morganii</i>
P37	22/03/2021	Kystectomie	<i>E.faecalis</i>
P38	30/03/2021	Césarienne	<i>K. pneumoniaeE.faecium</i>
P40	30/03/2021	Césarienne	<i>E.cloacae</i>
P41	02/04/2021	Césarienne	<i>K.pneumoniae</i>
P42	20/04/2021	Césarienne	<i>E.coli</i>
P43	26/04/2021	Césarienne	<i>E.cloacae,</i>
P44	28/04/2021	Césarienne	<i>M.morganii</i>
P45	06/05/2021	Hysterectomie	<i>E.faecalis</i>
P46	12/07/2021	Césarienne	<i>E.coli</i>
P47	28/07/2021	Mastectomie	<i>E.cloacae</i>
P48	05/09/2021	Césarienne	<i>E.coli</i>
P49	25/09/2021	Césarienne	<i>E.cloacae, E.faecalis</i>
P50	05/10/2021	Césarienne	<i>M.morganii</i>
P51	15/11/2021	Césarienne	<i>K.pneumoniae,</i>
P52	10/12/2021	Césarienne	<i>M.morganii</i>

4.1. Résistances des *Enterobacteriaceae* aux antibiotiques

Le schéma de résistance aux antibiotiques des isolats d'entérobactéries montre que 52 % des espèces bactériennes se sont révélées multi-résistantes vis-à-vis a différentes classes d'antibiotiques testés. Chez les entérobactéries la résistance la plus importante a été exprimée contre l'amoxicilline/acide clavulanique (83 %), l'amoxicilline (61 %), la Cefalotine (59 %), parmi les beta-lactamines. Une résistance modérée a été observée pour le

Sulfaméthoxazole/triméthoprime (43 %), la ceftriaxone, la fosfomycine, la ciprofloxacine et la doxycycline (26 %), tandis que des résistances de faibles fréquences ont été rapportées pour la gentamicine et l’ertapénème avec des valeurs respectives de 4 % et 2 %. Aucune résistance n’est rapportée pour les l’impénème, l’amikacine et la colistine (Tableau 19, Figure 22 et 23).

Tableau 19. Résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques des souches d’entérobactéries.

Antibiotiques		Sensibilité (n=46)	Résistance (n=46)	Pourcentage (%)	P value
Beta-lactamines	Amoxicilline	18	28	61	0,1
	Amoxicilline/acide clavulanique	8	38	83	
	Céfépime	43	3	6	
	Pipéracilline/tazobactam	36	10	22	
	Cefalotine	19	27	59	
	Ceftriaxone	34	12	26	
Carbapénèmes	Ertapénème	45	1	0	-
	Imipenème	46	0	0	
Acidefosfoniques	Fosfomycine	34	12	26	0,3
Nitrofuranes	Nitrofurantoïne	39	7	15	0,8
Sulfamides et associés	Sulfaméthoxazole/triméthoprime	26	20	43	0,8
Aminosides	Amikacine	46	0	0	0,4
	Gentamicine	44	2	4	
Quinolones	Ciprofloxacine	34	12	26	0,7
Cyclines	Doxycycline	34	12	26	0,3
Polymyxine	Colistine	46	0	2	-

Lorsque P est < 0,05, les variables représentées par les antibiotiques sont dépendantes et révèlent une liaison entre elles. Lorsque P est > 0,05 les variables sont indépendantes et ne révèlent pas de liaison entre elles. Etant donné que les BLSE sont le phénotype de résistance prédominant avec des pourcentages de résistance élevés vis-à-vis des autres antibiotique, le P value calculé, dans ce cas, est non significatif entre les différents antibiotiques testées. Les variables sont ainsi indépendantes et ne révèlent pas de liaison entre elles.

La production de BLSE est l'unique phénotype de résistance exprimé par les entérobactéries vis-à-vis des différents antibiotiques testés avec des degrés de significativité différents révéler par le test Khi-2 de Person.

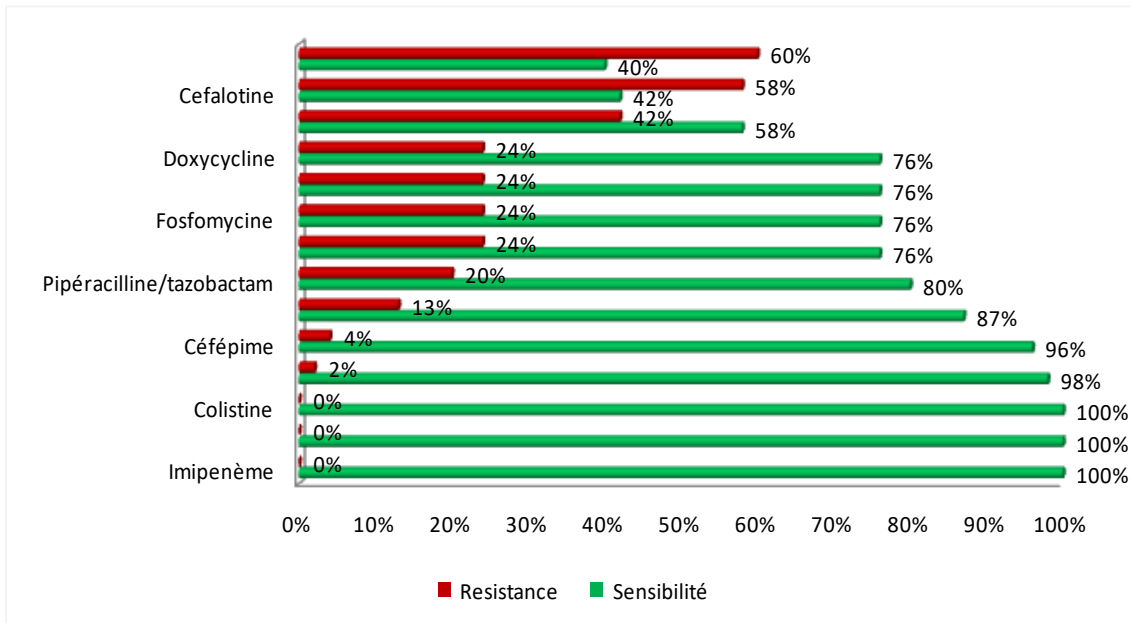


Figure 22. Profile de sensibilité des entérobactéries vis-à-vis des antibiotiques testés.

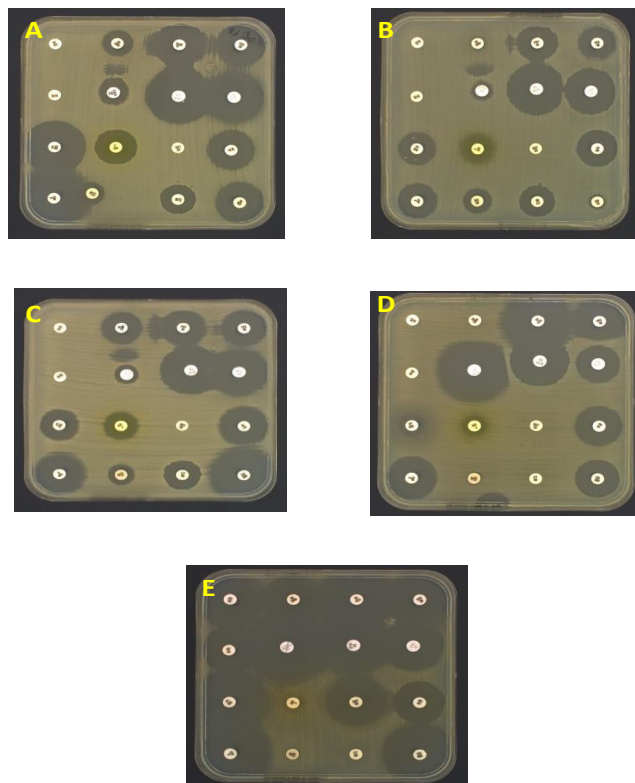


Figure 23. Exemple du profil de résistance des entérobactéries productrices de BLSE
 A : *E.coli*, B : *E. cloacae*, C : *K. Pneumonia*; D : *M.morganii*, E : *P.mirabilis*

4.2. Résistance de *Pseudomonas putida* aux antibiotiques

Le schéma de résistance aux antibiotiques des isolats *P. putida* montre une résistance moyenne de 50 % pour la piperacilline-acide clavulanique, l'aztreonam, la fosfomycine, et la gentamicine. Tous les autres antibiotiques étaient efficaces vis-à-vis de cette souche (Tableau 20, Figure 24 et 25). Aucun phénotype de résistance n'a été exprimé par cette souche.

Tableau 20. Résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques des souches de *P. putida*.

Antibiotiques	Sensibilité (n= 2)	Résistance (n= 2)	Pourcentage (%)	
Beta-lactamines	Ticarcilline	2	0	
	Ticarcilline-acide clavulanique	2	0	
	Piperacilline-acide-clavulanique	1	1	50
	Aztréonam	1	1	50
	Ceftazidime	2	0	0
	Céfépime	2	0	0
Carbapénèmes	Méropénem	2	0	0
	Imipénème	2	0	0
Acidefosfoniques	Fosfomycine	1	1	50
Rifamycines	Rifampicine	2	0	0
Sulfamides et associés	Sulfaméthoxazole	0	2	100
Aminosides	Amikacine	2	0	0
	Gentamicine	1	1	50
Quinolones	Ciprofloxacine	2	0	0
Cyclines	Doxycycline	0	2	100
Polymyxine	Colistine	2	0	0

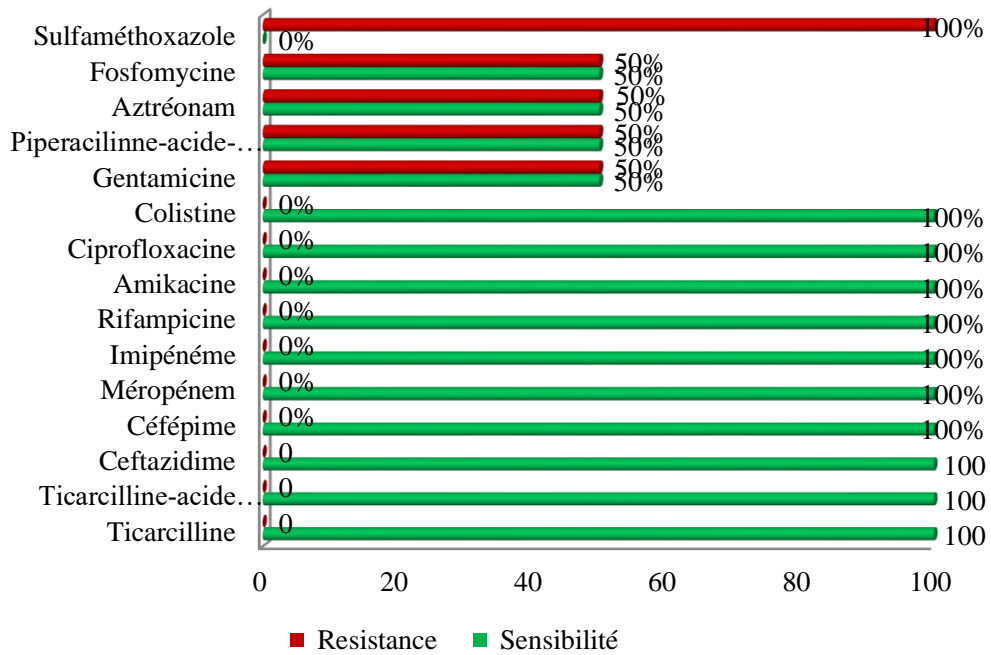


Figure 24. Profil de sensibilité de *P. putida* vis-à-vis des antibiotiques testés

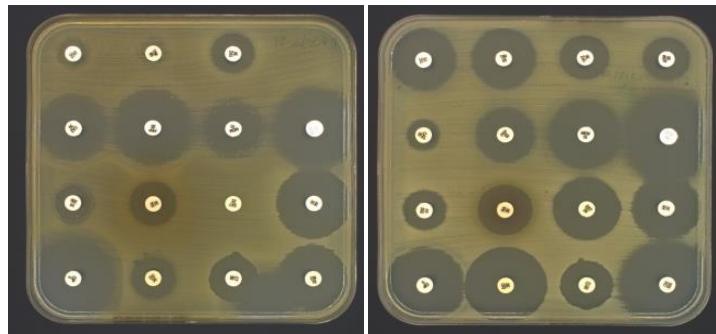


Figure 25. Exemple du profil de résistance de *P. Putida*.

4.3. Résistances d’*Enterococcus spp* aux antibiotiques

Le schéma de résistance aux antibiotiques testés vis-à-vis des isolats d’*Enterococcus spp*. montre une résistance élevée à l’oxacilline ; ce phénotype sauvage n’est pas pris en considération du fait de sa production naturelle et intrinsèque chez toutes les souches d’*Enterococcus spp*. Une résistance totale est rapportée pour la clindamycine (100 %), ainsi qu’une résistance élevée pour le minocycline, l’érythromycine et la pénicilline G avec des pourcentages respectifs de 83, 66 et 50 %. De faibles proportions de résistance sont rapportées pour le reste des antibiotiques comme la vancomycine et la teicoplanine avec, respectivement, des pourcentages de 25 % et 8 % (Tableau 21 ; Figure 26, 27 et 28).

Le test Khi 2 a été utilisé pour révéler le degré de significativité entre les différentes variables d'antibiotiques testées. Lorsque P est < 0,05, les variables représentées par les antibiotiques sont dépendantes et révèlent une liaison entre elles, comme le cas de l'Amoxicilline (P= 0,001), la Gentamicine (P= 0,02) et la Vancomycine (P= 0,02). Lorsque P est > 0,05, les variables sont indépendantes et ne révèlent pas de liaison entre elles (tableau 21).

Tableau 21. Résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques des souches d'*Enterococcus spp.*

Antibiotiques	Sensibilité (n= 12)	Résistance (n= 12)	Pourcentage (%)	P value	
Beta-lactamines	Pénicilline	6	6	50	0,4
	Oxacilline	3	9	75	
	Amoxicilline	10	2	17	0,001
	Ceftriaxone	6	6	50	0,7
Macrolides et apparentees	Clindamycine	0	12	100	-
	Erythromycine	4	8	66	0,2
	Pristinamycine	10	2	17	0,2
Aminosides	Gentamicine	8	4	33	0,02
Glycopeptides	Vancomycine	9	3	25	0,04
	Teicoplanine	11	1	8	
Cyclines	Doxycycline	8	4	33	0,1
	Minocycline	2	10	83	0,5
Nitrofuranes	Nitrofurantoïne	10	2	17	0,06
Rifamycines	Rifampicine	11	1	8	
Acide fusidique	Acide fusidique	12	0	0	0,1
Oxazolidinones	Linézolide	11	1	8	-

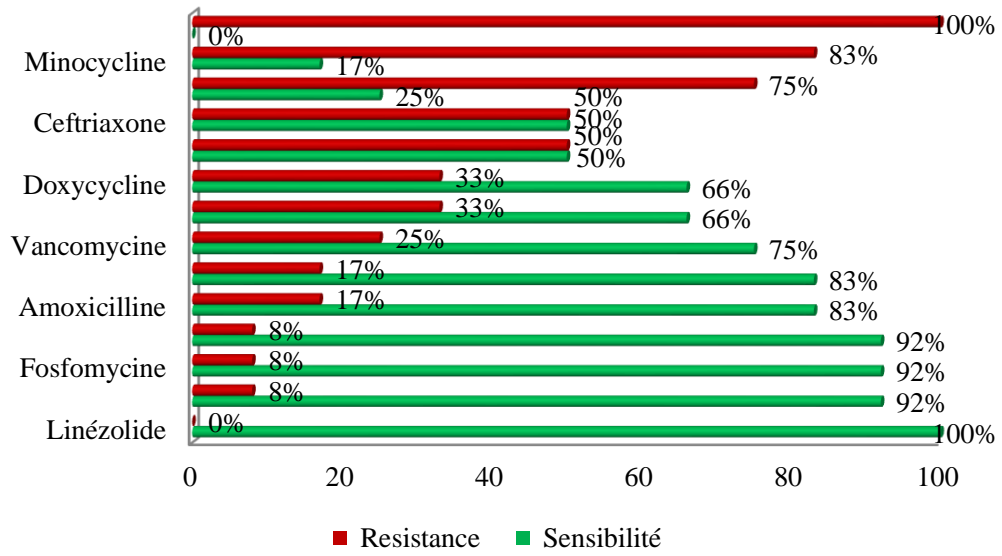


Figure 26. Profil de résistance d’*Enterococcus spp.* vis-à-vis des antibiotiques testés.

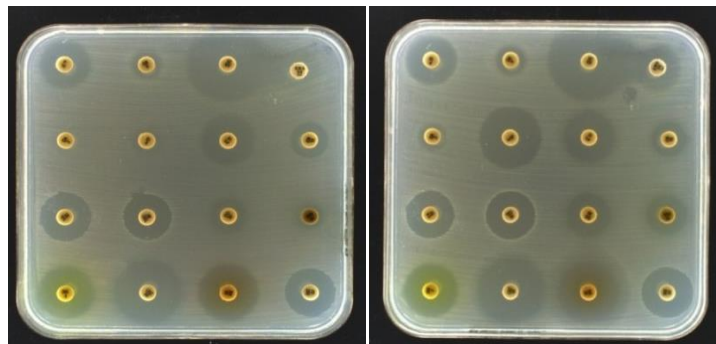


Figure 27. Exemple du profil de résistance d’*E. faecalis*.

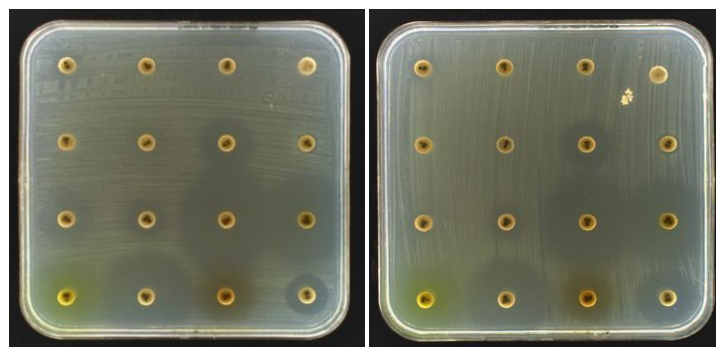


Figure 28. Exemple du profil de résistance d’*E. faecium*

4.4. Résistance de *Staphylococcus spp* aux antibiotiques

Le schéma de résistance aux antibiotiques des isolats de *Staphylococcus spp* montre une résistance moyenne à la pénicilline et l'acide fusidique (60 %), une faible résistance l'érythromycine (20%). Tout le reste des antibiotiques agissaient efficacement sur ces souches (Tableau 22, Figure 29, 30, 31). Aucun phénotype de résistance particulier n'a été exprimé par cette souche.

Tableau 22. Résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus spp*

Antibiotiques		Sensibilité (n= 5)	Résistance (n= 5)	Pourcentage (%)
Beta-lactamines	Pénicilline	2	3	60
	Cefoxitine	5	0	0
	Oxacilline	5	0	0
Rifamycines	Rifampicine	5	0	0
Macrolides et apparentes	Clindamycine	5	0	0
	Erythromycine	4	1	20
	Pristinamycine	5	0	0
Aminosides	Gentamicine	5	0	0
Glycopeptides	Vancomycine	5	0	0
	Teicoplanine	5	0	0
Cyclines	Doxycycline	5	0	0
Acidefosfoniques	Fosfomycine	5	0	0
Quinolones	Ciprofloxacine	5	0	0
Acide fusidique	Acide fusidique	2	3	60
oxazolidinones	Linézolide	5	0	0
Sulfamides et associés	Sulfaméthoxazole	5	0	0

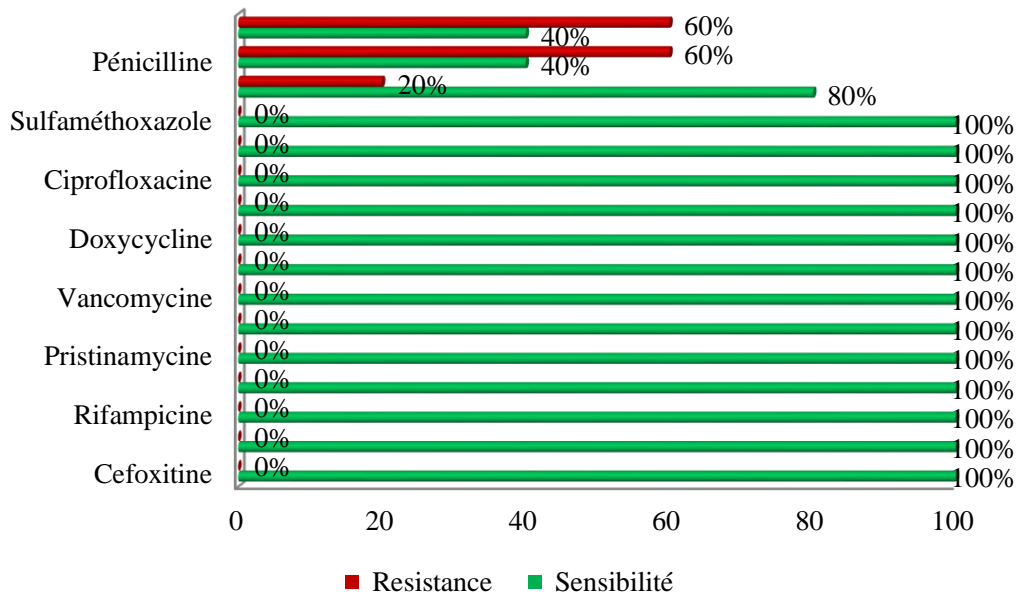


Figure 29. Profil de résistance de *Staphylococcus spp.* vis-à-vis des antibiotiques testés.

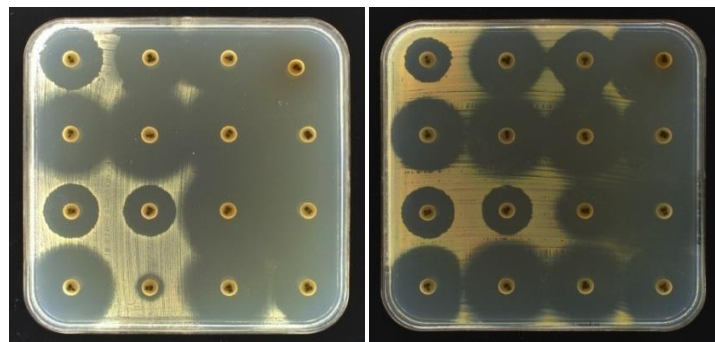


Figure 30. Exemple du profil de résistance de *Staphylococcus aureus*.

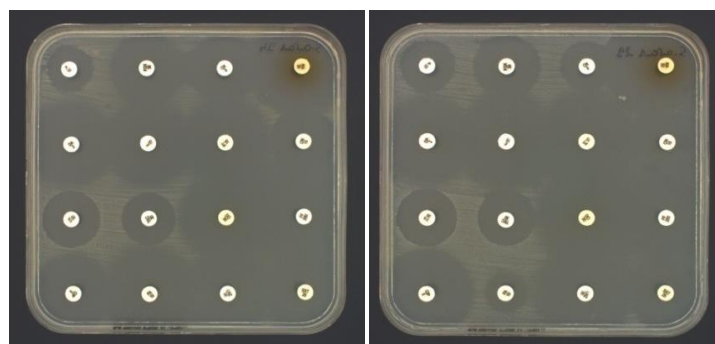


Figure 31. Exemple du profil de résistance de *Staphylococcus epidermidis*.

4.5. Concentrations minimales inhibitrices (E-test)

Au vu des diamètres réduits obtenu par les deux souches d'*E. faecium* vis-à-vis des glycopeptides (vancomycine et/ou Teicoplanine), les bandelettes d'E-test de la vancomycine ont été utilisées pour déterminer la CMI de ces deux souches, qui se sont révélées résistantes jusqu'à une concentration de 256 µg/ml (Figure 32).

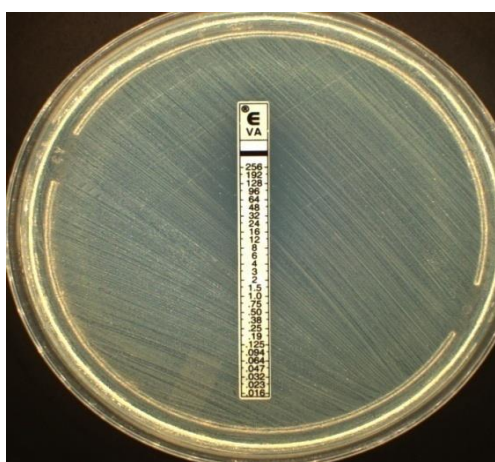


Figure 32. Exemple de résultat de la détermination de la CMI de la vancomycine par E-test.

5. Collecte des prélèvements sur les surfaces inertes du milieu hospitalier

Durant notre collecte des cas d'ISO, nous avons parallèlement effectué un échantillonnage des surfaces inertes du milieu hospitalier (bloc opératoire, salle de réanimation et chambre des patientes) du service de gynécologie obstétrique, afin d'investiguer la composante bactérienne de l'environnement hospitalier. Le prélèvement au niveau de chaque surface inerte a été effectué selon une technique spécifique notamment par passage d'un écouvillon stérile et humidifié de sérum physiologique en stries parallèles sur les surfaces inertes: table chirurgicale et table du matériel chirurgical du bloc opératoire (10 %) dont : *E.coli* (n= 2), *S. aureus* (n= 2), *S. epidermidis* (n= 1) ; poignées des portes en salle de réanimation (16 %) dont : *P. aeruginosa* (n= 1), *A. pittii* (n= 1) ; placard (38 %) dont : *E. cloacea* (n= 10) et lits (100 %) dont : *E. cloacae* (n= 8) et *E. faecalis* (n= 3) ; poignée des portes des chambres (13 %) dont *E. coli* (n= 3) et lits (25 %) dont *S. aureus* (n= 2). Cet échantillonnage du milieu hospitalier a été effectué selon un cycle de quatre mois pendant les deux années d'étude. Les isolats bactériens obtenus ainsi que leur répartition sont illustrés sur les figures 33, 34.

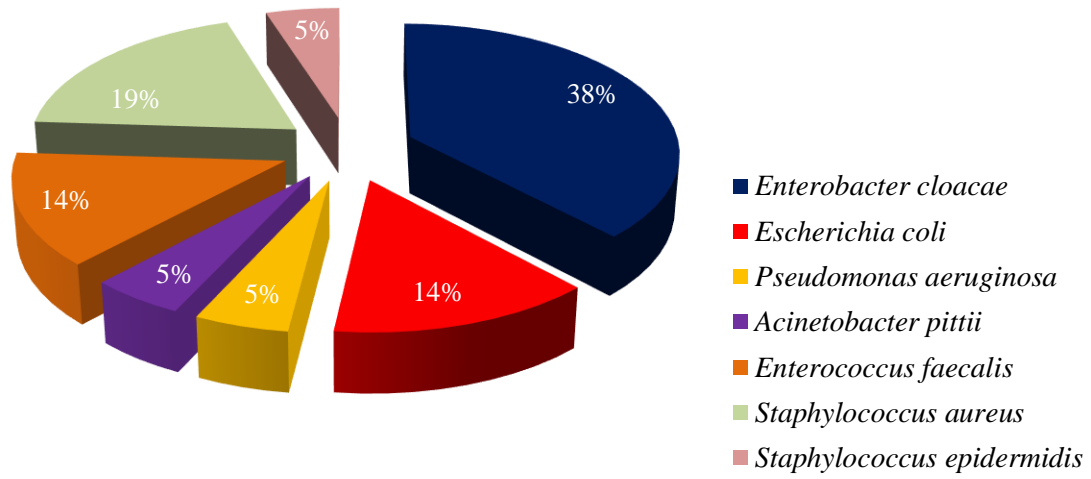


Figure 33. Répartition des souches bactériennes isolées sur les surfaces inertes du milieu hospitalier.

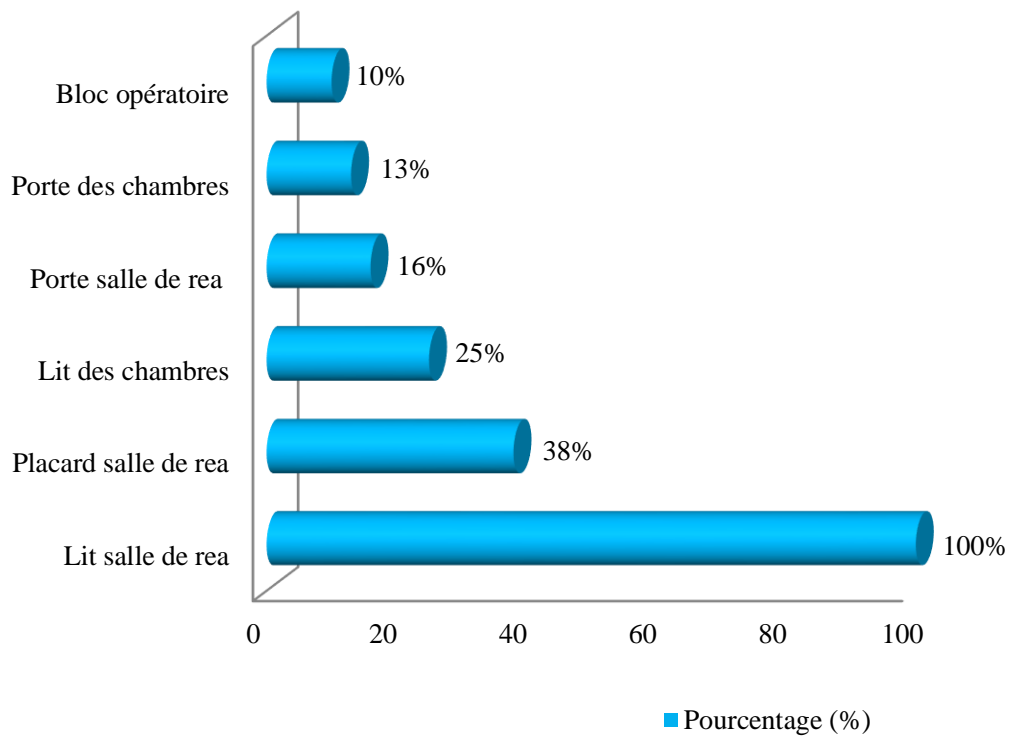
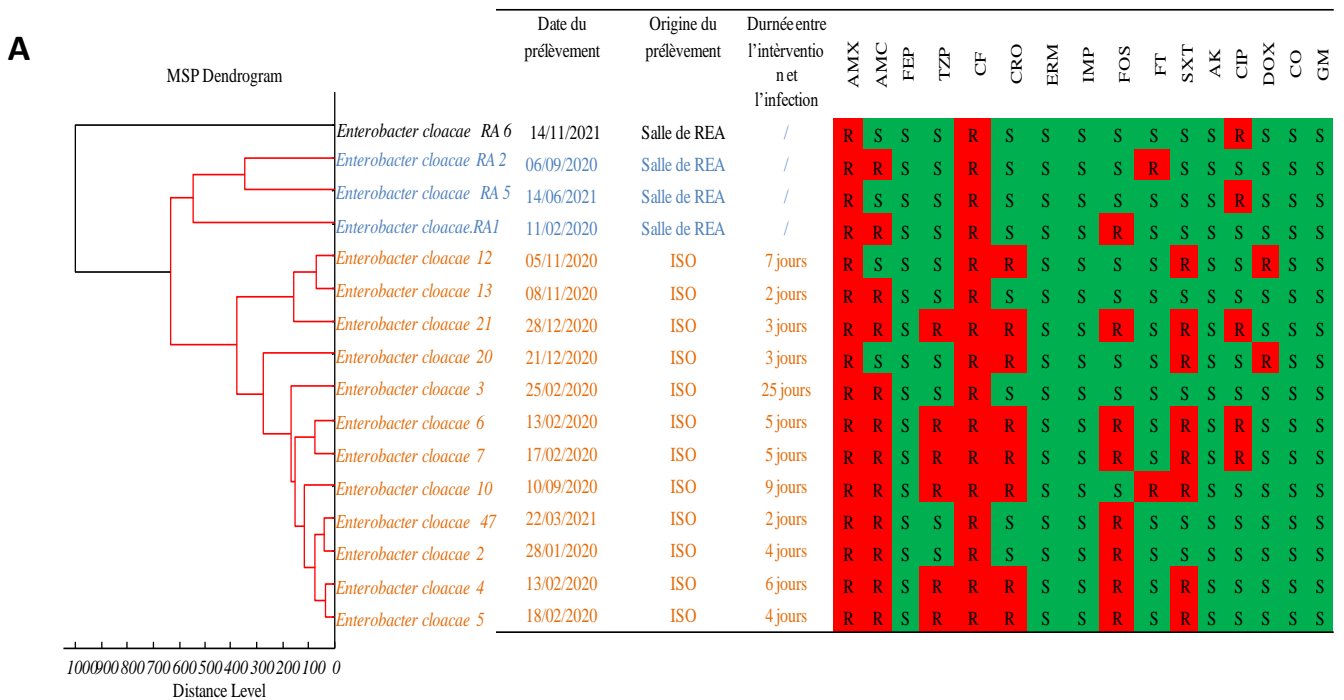


Figure 34. Fréquences d'isolement des espèces bactériennes sur les différentes surfaces du milieu hospitalier.

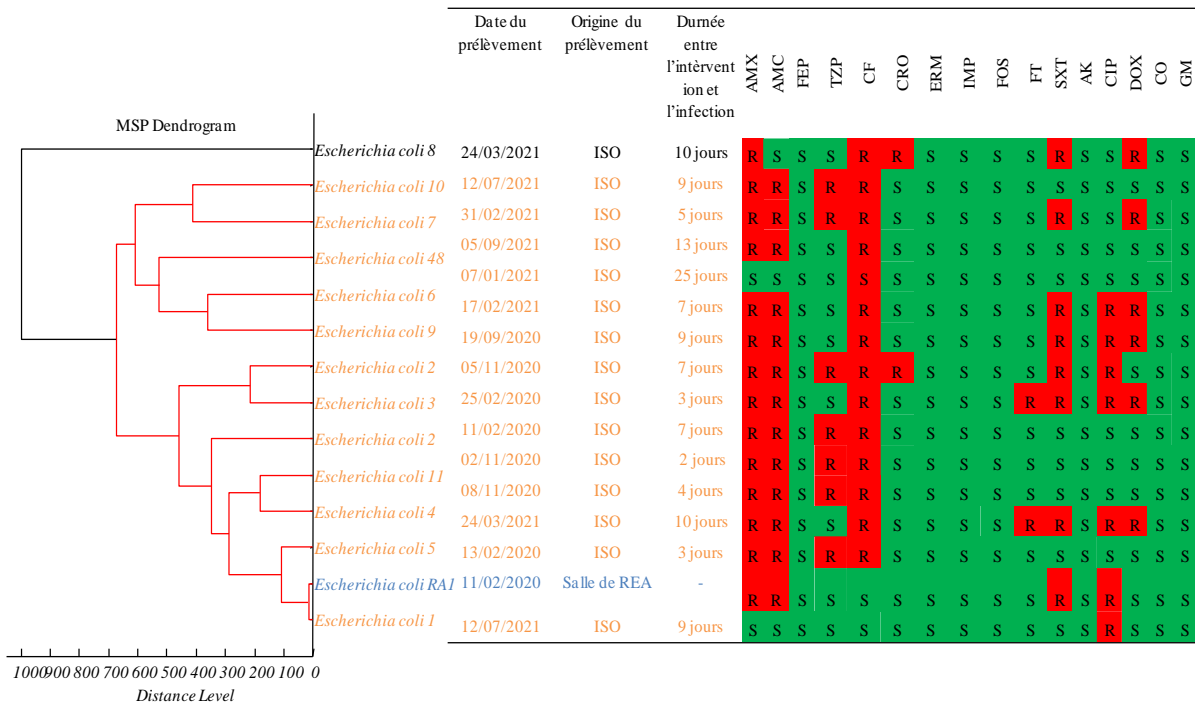
5.1. MSP dendrogramme par MALDI-TOF

L'analyse du profil de résistances aux antibiotiques des isolats bactériens collectés à partir des surfaces inertes du milieu hospitalier, a été associée à une analyse spectral par MALDI-TOF pour détecter l'origine des contaminants nosocomiaux et leurs liaisons phylogénétiques avec les contaminants isolés des ISO. Pour ce faire, un MSP dendrogramme sur MALDI-TOF a été réalisé entre les souches bactériennes appartenant aux mêmes groupes bactériens isolés des prélèvements des ISO et ceux des surfaces inertes, comme *E.coli*, *E. cloacae* et *E. faecalis*. Le MSP dendrogramme est divisé en clusters ; ces derniers sont alors analysés selon le niveau de distance arbitraire entre les clusters. Les espèces bactériennes qui se clustrent au même point présentent un rapprochement phylogénétique.

- *E.cloacae* REA et *E. cloacae*ISO appartiennent au même cluster (Figure 35 A)
- *E.coli* REA et *E.coli* ISO appartiennent au même cluster (Figure 35 B)
- *E.faecalis* REA et *E.faecalis* ISO appartiennent au même cluster (Figure 35 C)



B



C

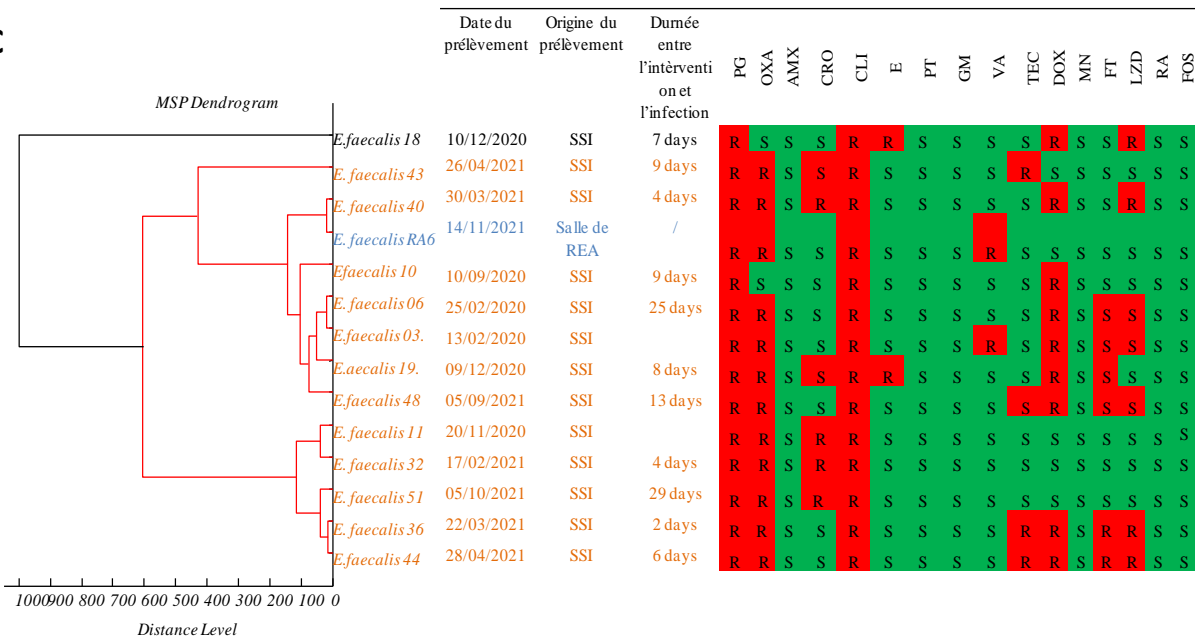


Figure 35. (A) MSP Dendrogramme entre les souches d’*E. cloacae* isolée sur le surface inerte du milieu hospitalier et *E. cloacae* isolées de l’infection du site opératoire. (B) MSP Dendrogramme entre les souches d’*E. coli* isolée sur le surface inerte du milieu hospitalier et *E. cloacae* isolée de l’infection du site opératoire. (C) MSP Dendrogramme entre les souches d’*E. faecium* isolée sur le surface inerte du milieu hospitalier et *E. cloacae* isolée de l’infection du site opératoire.

Abreviation : REA: réanimation, ISO: infection du site opératoire, AMX : Amoxicillin ; AMC: Amoxicillin + clavulanicacid ; CF: Cefalotin ; FEP: Cefepime ; CRO: Ceftriaxone ; ERM: Ertapenem ; IMP: Imipenem ; SXT: Sulfamethoxazole-trimethoprim ; PT: Pristinamycin CIP: Ciprofloxacine ; Fos: Fosfomycine ; DOX: Doxycycline ; GM: Gentamicine ; AK: Amikacine ; FT: Nitrofurantoin CO: Colistine. PG: Penicilline G; OX: Oxacilline; CX: Cefoxitine; E: Erythromycine; VAN: Vancomycine; TEC: Teicoplanine; MN: Minocycline ; LZD: Linezolid ; RA: Rifampicine; FA: Fusidicacide ; CL: Clindamycine

6. Caractérisation moléculaires des prélèvements

6.1. Réaction de polymérisation en chaîne réalisée en temps réel

Les prélèvements de pus collectés des ISO ont été testés pour la présence des gènes de résistances suivants : de β -lactamases à spectre étendu (*bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*), des gènes de carbapénèmases (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* et *bla_{OXA-48}*), des gènes de résistance à la colistine (*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, and *mcr-8*), des gènes de résistance aux aminosides (*bla_{aac3}*, *bla_{aac6}*, *bla_{aad}*, *bla_{ant}*) et des gènes de résistance aux quinolones (*bla_{QnrA}*, *bla_{QnrB}*) par RT-PCR. Les résultats se sont révélés positifs uniquement pour les gènes suivant: *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* et *bla_{CTX}*.

Les résultats sont ainsi positifs uniquement pour les gènes de BLSE chez les entérobactéries (*E. coli*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *M. morgani*) (Figure 36) et pour un gène des aminosides chez certaines entérobactéries (*E. cloacae*). Les résultats de PCR pour les gènes de carbapénèmases, de la colistine et des quinolone sont été négatifs pour toutes les souches des bacilles à Gram négatif et cocci à Gram positif (Figure 37).

7. Caractérisation moléculaire des souches bactériennes

7.1. Réaction de polymérisation en chaîne réalisée en temps réel

La RT-PCR a été effectuée chez les Gram négatifs uniquement pour toutes les souches d'entérobactéries ayant exprimé un profil de multirésistance sur antibiogramme associé à l'apparition d'une synergie (bouchon de champagne, Figure 23). Parmi l'effectif total de 46 entérobactéries, 41,3% (19/46) sont productrices de BLSE : *E. cloacae* exprimant 37% (7/19) de BLSE (*bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*), *K. pneumoniae* exprimant 26% (5/19) de BLSE (*bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*), *E. coli* exprimant 26% (5/19) de BLSE (*bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*) et *M. Morgani* exprimant 11% (2/19) de BLSE (*bla_{CTX-M}*) (Figure 38).

Parmi l'effectif total de 46 entérobactéries, 6,5% (3/ 46) expriment le gène de résistance aux aminosides *aac'(6)Ib* (Figure 39).

La RT-PCR a été effectuée chez les Gram positifs, uniquement pour les souches d'*E. faecium* ayant exprimé une résistance phénotypique à la vancomycine sur antibiogramme associé à une CMI > 256 $\mu\text{g/ml}$ pour ce même antibiotique par E-test. Parmi l'effectif total de 12 souches bactériennes d'*Enterococcus spp*, 17 % (2/12) sont productrices du gène *VanA* (Figure 40).

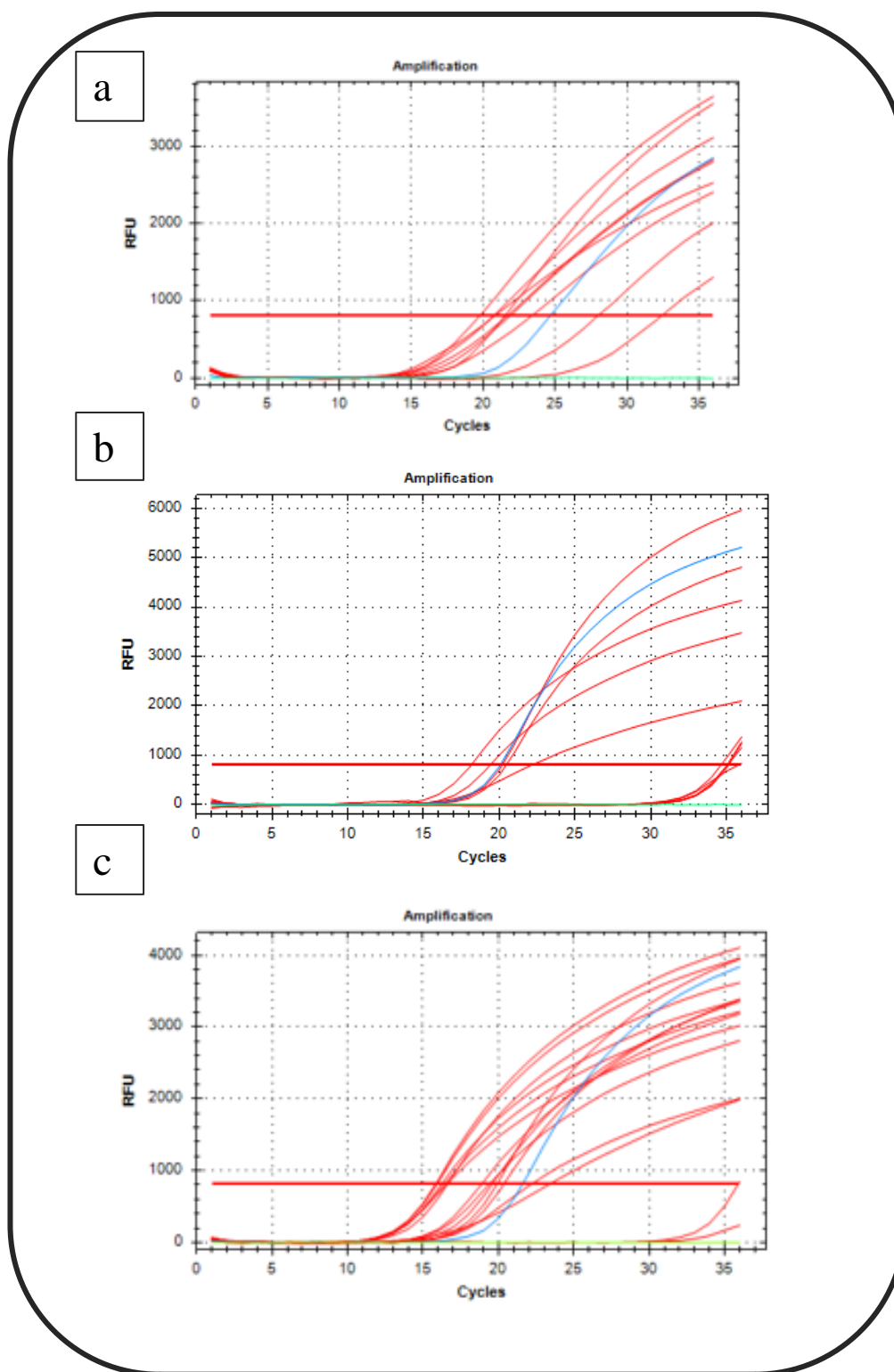


Figure 36. Pooling d'amplification des gènes de résistance par RT-PCR sur les prélèvements des ISO ; (a) gène *bla_{TEM}* ; (b) gène *bla_{SHV}* ;(c) *bla_{CTX-M}*.

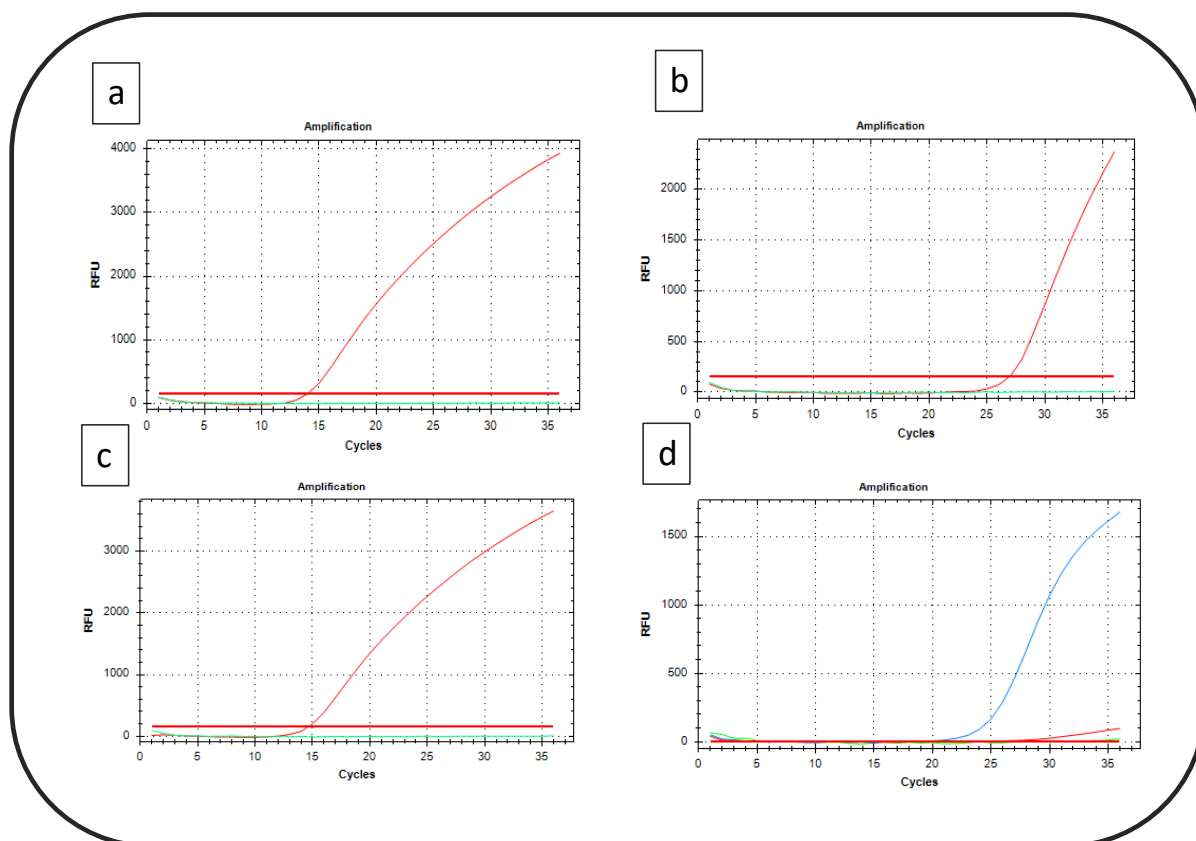


Figure 37. Absence d'amplification des gènes de résistances par RT-PCR sur les prélèvements des ISO ; (a) gène *bla_{NDM}*; (b) gène *bla_{KPC}*; (c) gène *mcr-1*, d: *bla_{aac3}*.

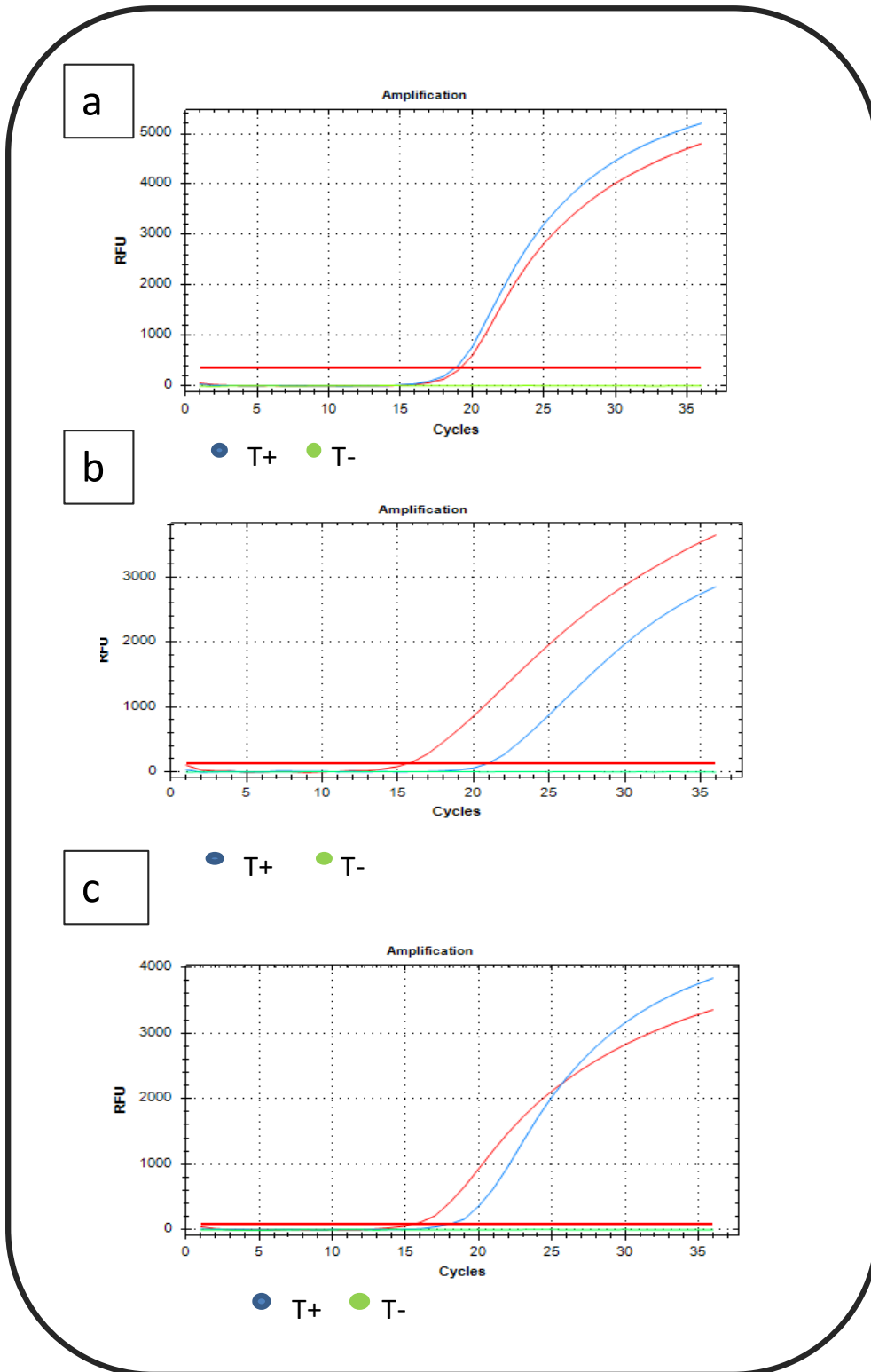


Figure 38. Amplification par RT-PCR des gènes (a) *bla_{TEM}* ; (b) *bla_{SHV}* ; (c) *bla_{CTX}*.

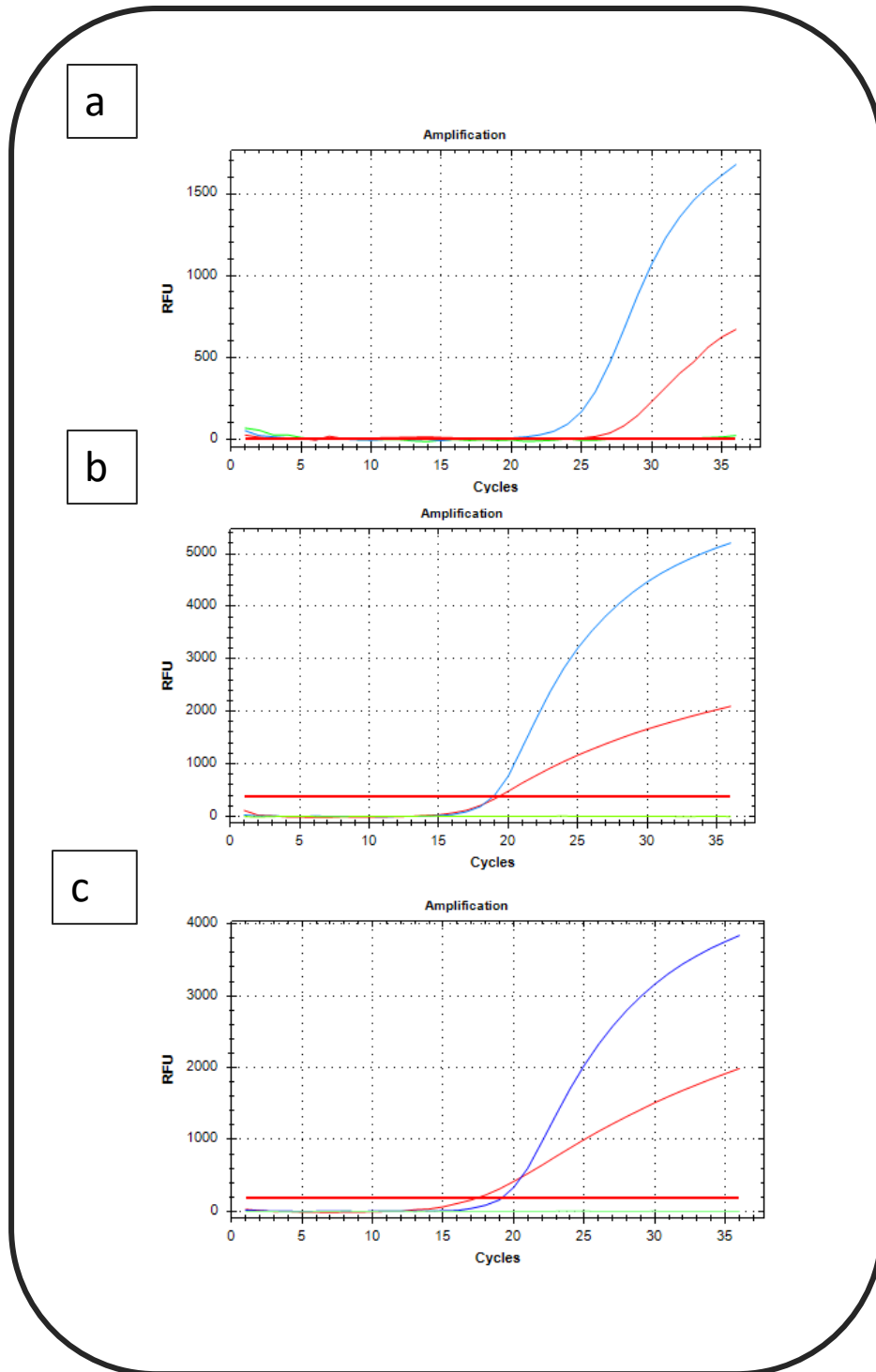


Figure 39. Amplification par RT-PCR du gène *aac'(6)-Ib* chez les 3 souches *E. cloacae*.

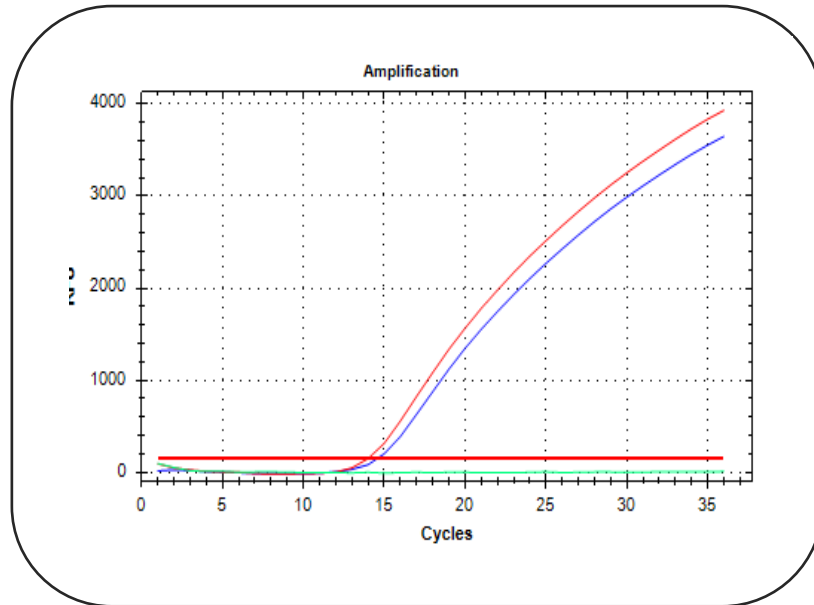


Figure 40. Amplification par RT-PCR du gène *bla_{VanA}*

7.2. Réaction de polymérisation en chaîne Standard

L'amplification par PCR standard, utilisant les amorces spécifiques qui codent pour les BLSE (TEM-206, SHV-187, CTX-M-15) et le gène des aminosides (*aac'(6)-Ib*), puis la révélation des gènes par électrophorèse en gel d'agarose nous ont permis de confirmer les résultats obtenus par RT-PCR sur les Figures 41 et 42 ci-dessus.

7.3. Coexpression des gènes de résistance

La coexpression des gènes de résistance aux β -lactamines chez les entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi a montré que 4 souches d'*E. cloacae* (24 %) et 2 souches d'*E. coli* (12 %) qui avaient le gène *bla_{CTX-M}*, hébergeaient également le gène *bla_{TEM}*. Parmi ces entérobactéries, il y avait aussi 2 souches de *K. pneumoniae* (12 %) qui hébergeaient les gènes *bla_{SHV}* et *bla_{CTX-M}*.

La coexpression des gènes de résistance aux aminosides chez les entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi a montré que 3 souches d'*E. cloacae* portaient le gène *aac(6')-Ib*.

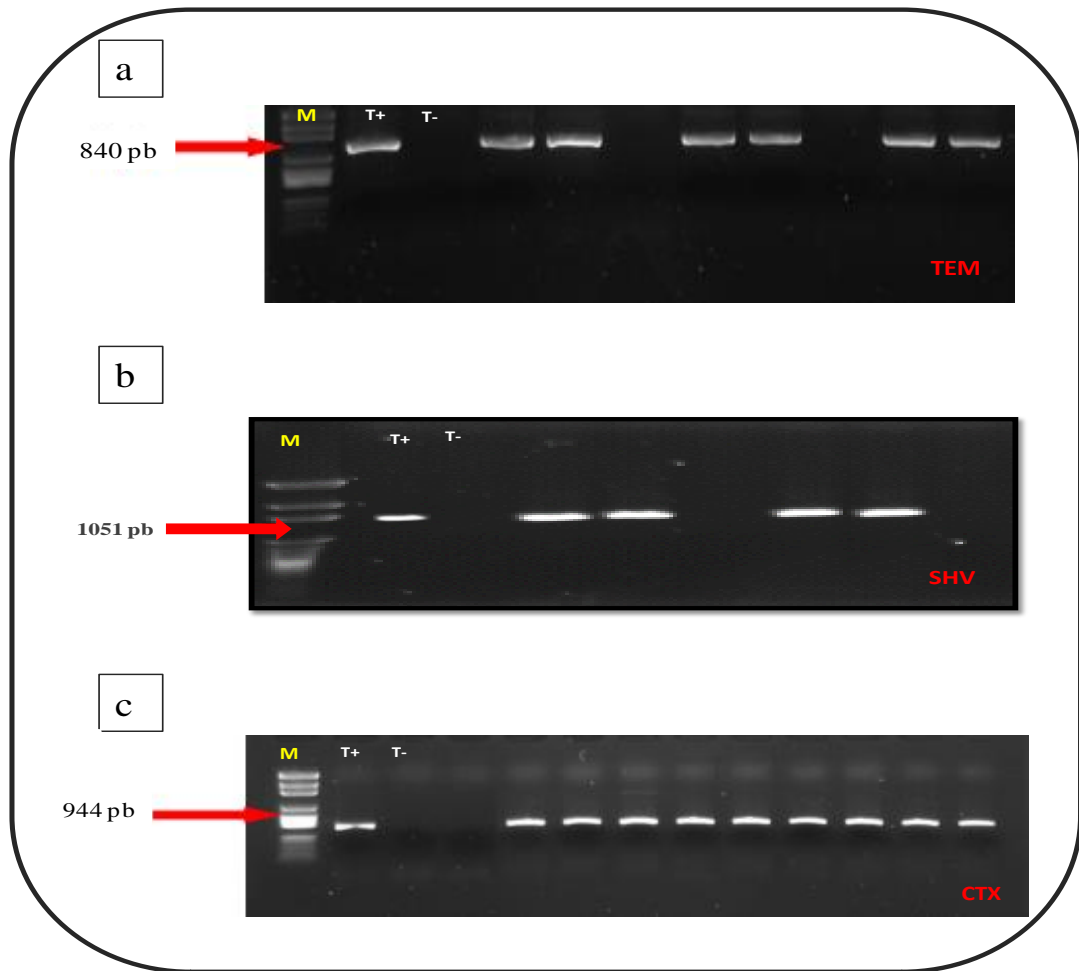


Figure 41. Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR des gènes *blaTEM*, *blaSHV*, *blaCTX*

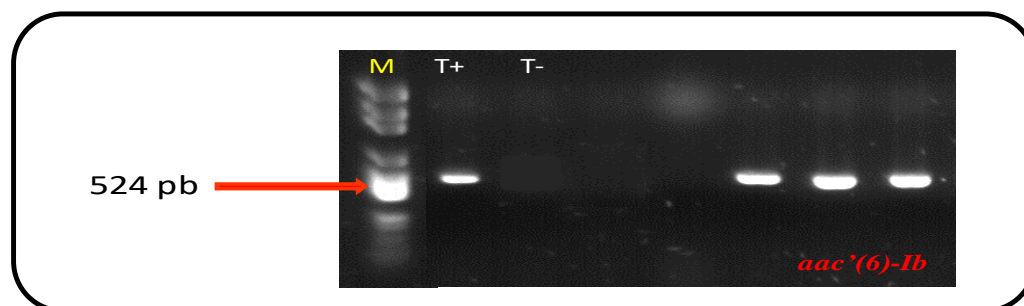


Figure 42. Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR des gènes *aac'(6)-Ib*

7.4. Séquençage de Sanger et analyse des séquences des gènes qui codent pour les BLSE

Les produits de PCR standard, constituant les gènes de résistance aux β -lactamines (*bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*) détectés chez les souches productrices de BLSE, ont été soumis à un séquençage de Sanger. Chaque séquence récupérée a été corrigée sur le logiciel Chromas Pro (Figure 43), puis analysée par un blast dans les bases de données ARG-ANNOT et NCBI ; plusieurs clusters ont été identifiés (Tableau 23).

Cette analyse a montré que les gènes TEM détectés chez les souches d'*E. cloacae* (n= 4) et *E. coli* (n= 2) appartenaient au variant *TEM-1*, les gènes SHV détectés chez *K. pneumoniae* (n= 4) appartenaient au variant *SHV-187*, et les gènes *CTX-M* détectés chez *E. cloacae* (n= 7), *E. coli* (n= 4), *K. pneumoniae* (n= 3) et *M. morgani* (n= 2) appartenaient au variant CTX-M15 (Tableau 23).



Figure 43. Correction des séquences d'ADN obtenus par séquençage de Sanger sur le logiciel Bio Edit.

Tableau 23. Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des souches de BLSE isolées à partir d'ISO en gynécologie obstétrique.

Patientes	Souches	Profil de résistances aux antibiotiques	Gènes de résistance après séquençage		
			SHV	TEM	CTX
1	<i>E coli</i>	AMX,AMC,CF,CRO,SXT,DOX	-	TEM -206	CTX-M15
2	<i>E coli</i>	AMX,AMC,CF,CRO	-	TEM-206	CTX-M15
3	<i>E coli</i>	AMX,AMC,CF,CRO,TZPSXT,CIP	-	-	CTX-M15
4	<i>E coli</i>	AMX,AMC,CF,CRO,TZP,SXT,DOX	-	-	CTX-M-15
5	<i>E cloacae</i>	AMX,AMC,CF,CRO,FT,SXT,	-	-	CTX-M-15
6	<i>E cloacae</i>	AMX,AMC,CF,CRO,TZP,CRO,FOS,SXT,CIP	-	TEM-206	CTX-M-15
7	<i>E cloacae</i>	AMX,AMC,CF,CRO,TZP,FOS,SXT,CIP	-	TEM-206	CTX-M-15
8	<i>E cloacae</i>	AMX,AMC,CF,CRO,TZP,FOS,SXT,	-	TEM-206	CTX-M-15
9	<i>E cloacae</i>	AMX,AMC,CF,CRO,TZP,FOS,SXT,CIP	-	TEM-206	CTX-M-15
10	<i>E cloacae</i>	AMX,AMC,CF,CRO,TZP,FEP,FOS,SXT,CIP	-	-	CTX-M-15
11	<i>E cloacae</i>	AMX,AMC,CF,CRO,FOS,SXT,CIP,GM	-	-	CTX-M-15
12	<i>K pneumoniae</i>	AMX,AMC,CF,CRO,FOS,FT,SXT,DOX	SHV-187	-	CTX-M-15
13	<i>K pneumoniae</i>	AMX,AMC,CF,CRO,FOS,SXT,DOX	SHV-187	-	CTX-M-15
14	<i>K pneumoniae</i>	AMX,AMC,CF,FOS	SHV-187	-	-
15	<i>K pneumoniae</i>	AMX,AMX, CF,ERM, FOS	SHV-187	-	CTX-M-15
16	<i>M morganii</i>	AMX,AMC,CF,CRO,FEP,FOS,SXT,CIP,DOX,GM	-	-	CTX-M-15
17	<i>M morganii</i>	AMX,AMC,CF,FOS,FT,SXT,DOX,GM	-	-	CTX-M-15

8. Séquençage de nouvelle génération Miseq Illumina

Les deux souches d'*E. faecium* exprimant un phénotype de résistance à la vancomycine sur le résultat d'antibiogramme confirmé par la bandelette du E-test, ont été soumises à un séquençage du génome complet par le séquenceur Miseq Illumina de nouvelle génération. Initialement les souches bactériennes ont été déposées à la césure de L'IHU Méditerranée infection pour le séquençage génomique, ensuite les résultats sous forme de reads (fragment d'ADN) obtenus avec des codes spécifiques à chacune des souches comme suit : *Enterococcus faecium* Q7358 et *Enterococcus faecium* Q7360, ont été récupérés sur le serveur de l'IHU.

8.1. Analyses bio-informatique des données brutes du séquençage génomique sur la pipelines en ligne Galaxy (Australia)

Les données brutes de courtes séquences (short-reads) produites par le séquençage Miseq Illumina ont été analysées à l'aide de l'outil disponible en ligne 'Galaxy' sur <https://usegalaxy.org.au/> avec des paramètres par défaut (Tableau 21). L'assemblage *de novo* des reads a été réalisé à l'aide de Spades, le contrôle de qualité a été effectué à l'aide de Quast Quality Control et l'annotation du génome a été réalisée à l'aide du Prokaryotic Genome révélant la taille de chaque génome respectivement : 2'923'802-bp composé de 167 contigs avec un contenu GC% de 37,76 pour *E. faecium* Q7358 et 2'927'224-bp composé de 175 contigs avec un GC% de 37,74 pour *E. faecium* Q7360 (Tableau 21). Les gènes de résistance aux antimicrobiens ont été ensuite identifiés à l'aide des bases de données ARG-ANNOT et ABRicate disponibles sur les paramètres de Galaxy, révélant la présence des gènes de résistances suivants : *aac(6')-le-aph(2')*; *aac(6')-li*; *ant(6)-la*; *aph(3')-IIIerm(B)*, *vanH*; *vanA*; *vanX*, pour les deux souches bactériennes (Tableau 19).

Enfin la détermination du type de séquence (ST) révélé par une analyse MLST (Multi Locus Sequence Typing) *in silico* disponible aussi sur les paramètres par défaut de Galaxy, puis confirmé à l'aide de la base de données MLST disponible à l'adresse <https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/> confirment l'appartenance des souches aux ST80 et au complexe clonale CC17 (Tableau 21).

Tableau 24. Caractéristiques cliniques, phénotype de résistance et génotype des isolats d’*E. faecium* Q7358 et Q7360.

	Patient 1	Patient 2
Age (année)	42 ans	27 ans
Procédure chirurgicale	Césarienne	Césarienne
Indication	Hématome rétroplacentaire	Souffrance fœtale
Condition	Urgence	Urgence
Antibiotérapie	Cefacet, Bactrim, gentamicin	Cefacet, Bactrim, gentamicin
CRP (mg/L)	196	86
Nature de l'échantillon	Pus	Pus
Date de l'échantillon	08/03/2021	24/03/2021
Souches	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
Phénotype de résistance	PG, OX, AMX, CRO, CLI, E, GM, VA, FT, RA, FOS,	PG, OX, AMX, CRO, CLI, E, GM, VA, TEC
CMI de la vancomycine	> 256 ug/ml	> 256 ug/ml
Genome analysis		
Taille (pb)	2'931'253	2'969'522
GC%	37,57	37,74
Nombres de contigs	170	175
Gènes de résistance aux Aminosides	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')</i> ; <i>aac(6')-li</i> ; <i>ant(6)-Ia</i> ; <i>aph(3')-III</i>	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')</i> ; <i>aac(6')-li</i> ; <i>ant(6)-Ia</i> ; <i>aph(3')-III</i>
Gènes de résistance aux Macrolides	<i>erm(B)</i>	<i>erm(B)</i>
Gènes de résistance aux Glycopéptides	<i>vanH</i> ; <i>vanA</i> ; <i>vanX</i>	<i>vanH</i> ; <i>vanA</i> ; <i>vanX</i>
Type de séquence (ST)	ST80	ST80
Complexeclonal(CC)	CC17	CC17

8.2. Alignement et réorganisation des génomes

Suite aux différents caractères génomiques semblables (taille, GC%, contigs, ST et CC) entre les deux souches bactériennes, la confirmation de l'identité des deux souches établie par la pipeline en ligne Type StrainGenom Server (Tygs) révèle un pourcentage de 94,99% confirmant l'identité entre ces deux souches.

Un alignement sur le logiciel Multiple Genom Alignment (MAUVE) a permis d'affirmer la ressemblance des souches et d'aligner les contigs répartis sur les deux souches superposées, en allant du contig le plus identique au moins identique (Figure 44).

Cet alignement permet de révéler le positionnement des contigs constituant le matériel génétique porteur du gène de résistance à la vancomycine.

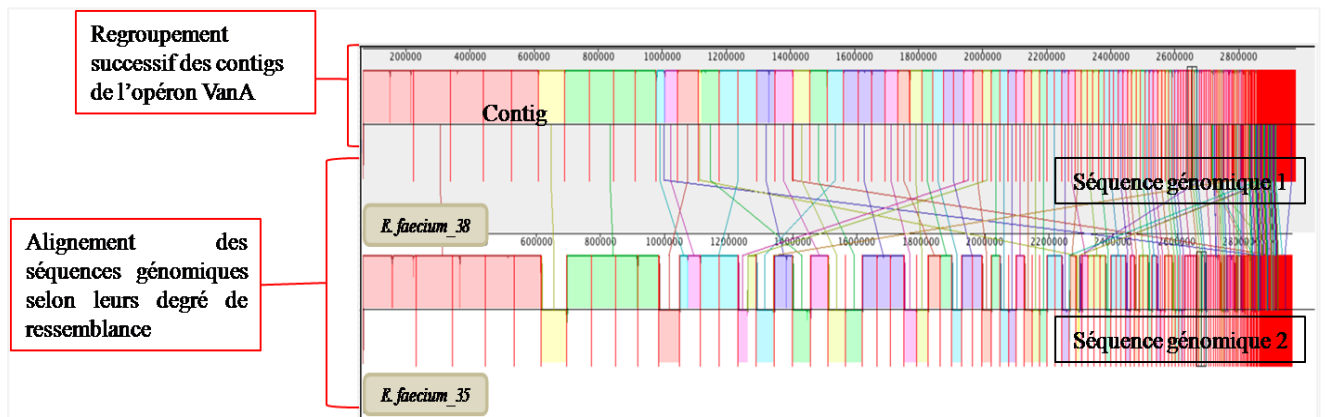


Figure 44. Alignement des séquences génomiques complètes des deux souches d'*E. faecium* résistantes à la vancomycine par le logiciel MAUVE.

8.3. Analyse BLAST sur NCBI database et reconstitution de l'environnement génétique

L'environnement génétique de la résistance à la vancomycine a été reconstitué d'abord *In silico* par l'alignement MAUVE, ensuite par un BlastN avec les séquences disponibles sur NCBI database :

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgiPROGRAM=tblastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

Les résultats BLASTN entre notre séquence génomique (format FASTA) de la souche *E. faecium* Q7358 et les souches de la base de donnée ont permis de révéler la nature du support génétique de la résistance en indiquant la présence du Tn1546 de l'opéron *vanA* par comparaison avec un Transposon de référence JPGE40 d'*E. faecium*, numéro d'accession KX810025.1 (Figure 45), puis de confirmer l'appartenance de cet opéron au plasmide de type *rep17* pRUM-like, en important l'origine de répllication *rep17* révélée par l'analyse Galaxy, confirmé par la suite sur pipeline Plamid Finder <https://www.genomicepidemiology.org/>

8.4. Représentation graphique linéaire sur Easyfig

L'interface utilisateur graphique d'Easyfig a permis de créer des figures de comparaison linéaires de plusieurs loci génomiques constituant notre séquence, et indiquant les zones de ressemblance avec spécificité. Nous avons ainsi pu établir une représentation linéaire du transposon porteur de l'Opéron *VanA* (Figure 46, 47) et une représentation linéaire du plasmide *rep17* pRUM-like (Figure 47 et 48).

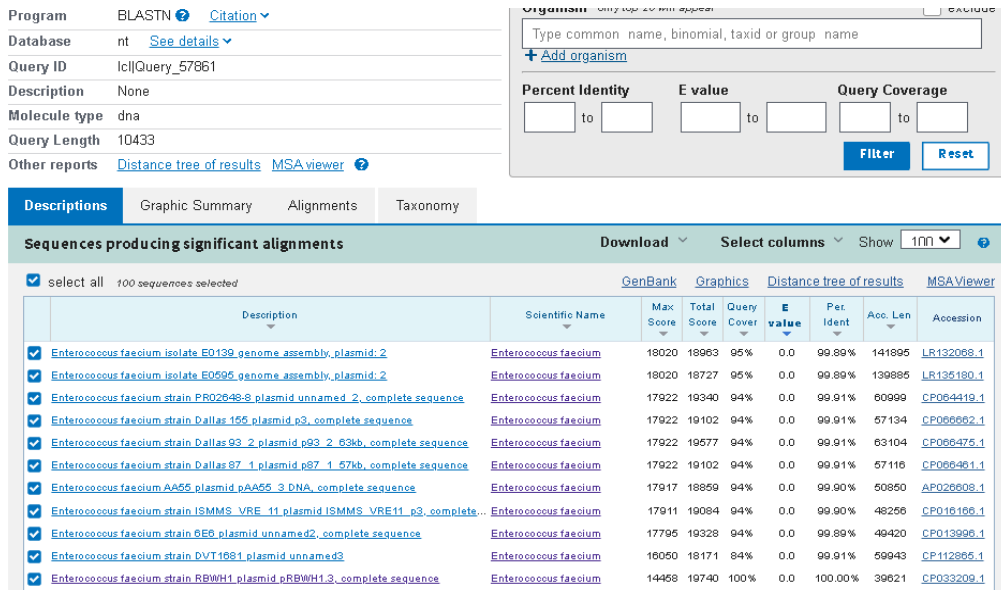


Figure 45. Comparaison des séquences génomiques sur NCBI Database.

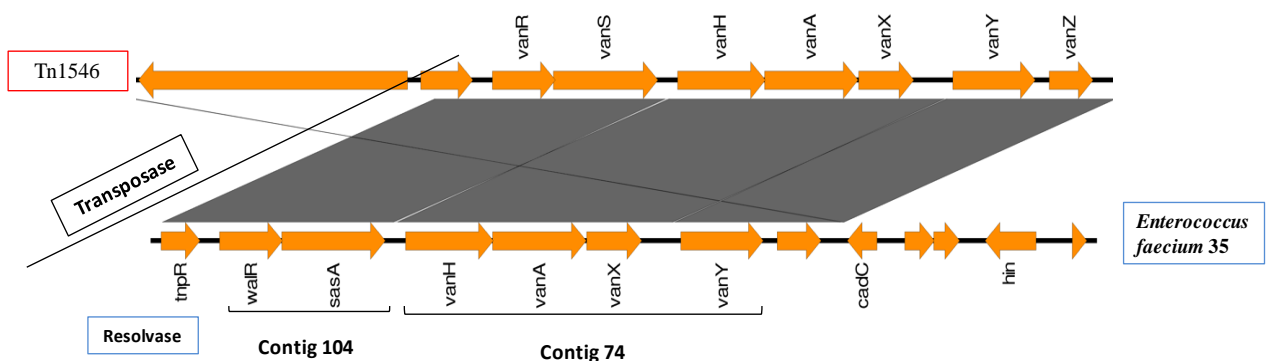


Figure 46. Représentation du Tn1546 de la souche *E. faecium* Q7358 en comparaison avec le Tn de référence par le logiciel Easy fig.

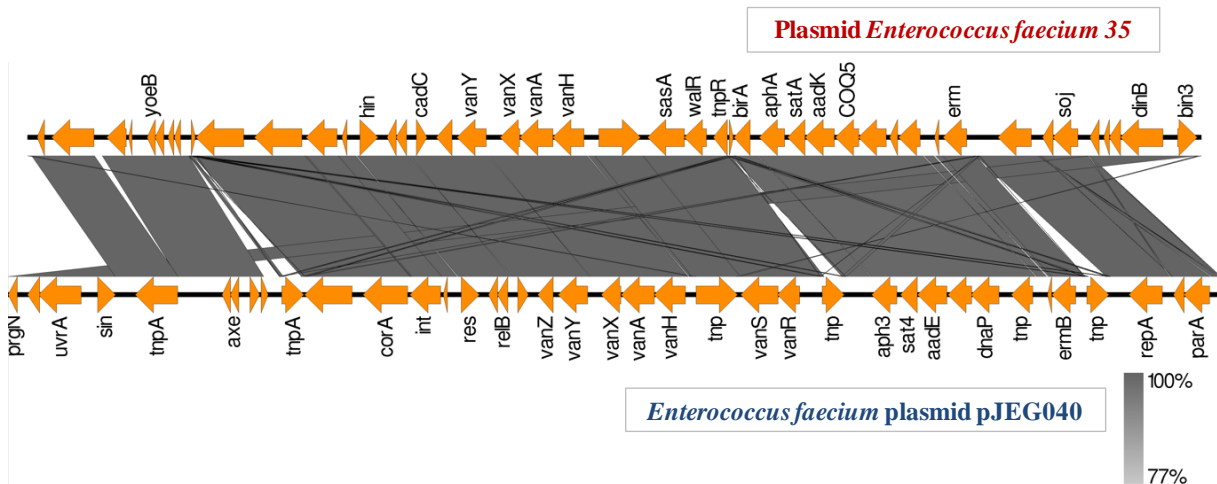


Figure 47. Représentation du plasmide de type *rep17* pRUM-like de la souche *E. faecium* Q7358 en comparaison avec le plasmide de référence par le logiciel Easy fig.

8.5. Représentation circulaire du plasmide et organisation de l'opéron *VanA*

La base de données GenBank du NCBI a indiqué que notre plasmide *E. faecium_35_Algerie* était un nouveau plasmide de type pRUM*rep17*. Une succession de comparaison avec les plasmides de la base de données les plus étroitement apparentés comme JPGE40 d'*E. faecium*, numéro d'accession KX810025.1, CP071960, MW821651, WC083 CP092548, ont servi de support de comparaison pour établir la représentation circulaire par la pipeline CGView illustrée sur la Figure 48.

8.6. Comparaison phylogénétique des génomes d'*E. faecium*

L'analyse phylogénétique basée sur la comparaison des génomes de différentes espèces d'*E. faecium*, nous a permis d'illustrer une représentation circulaire (Figure 48). Les séquences génomiques d'*E. faecium* Q7358 et d'*E. faecium* Q7360 sont étroitement liées avec les deux cercles correspondant à chacun des génomes comme le montre la légende de la figure 49. Nous illustrons parallèlement la relation phylogénétique dégradée entre quatre autres génomes de différentes souches d'*E. faecium* à l'issue d'une représentation circulaire sur CGView.

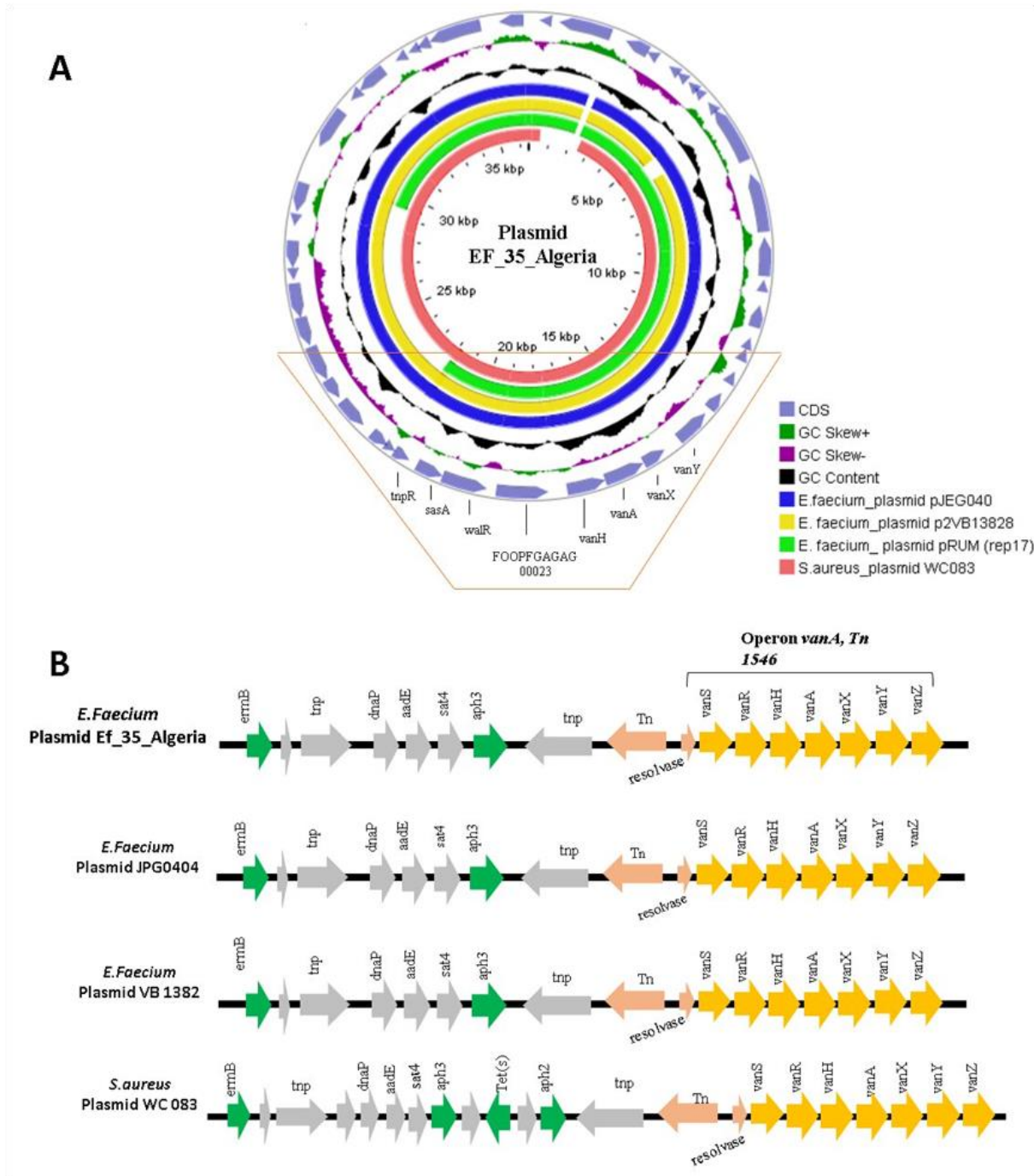


Figure 48. (A) Représentation circulaire du plasmide codant pour le gène *vanA*. (B) Représentation schématique de l'environnement génétique du gène *vanA* situé sur le transposon 1546 et sa comparaison avec les transposons de références.

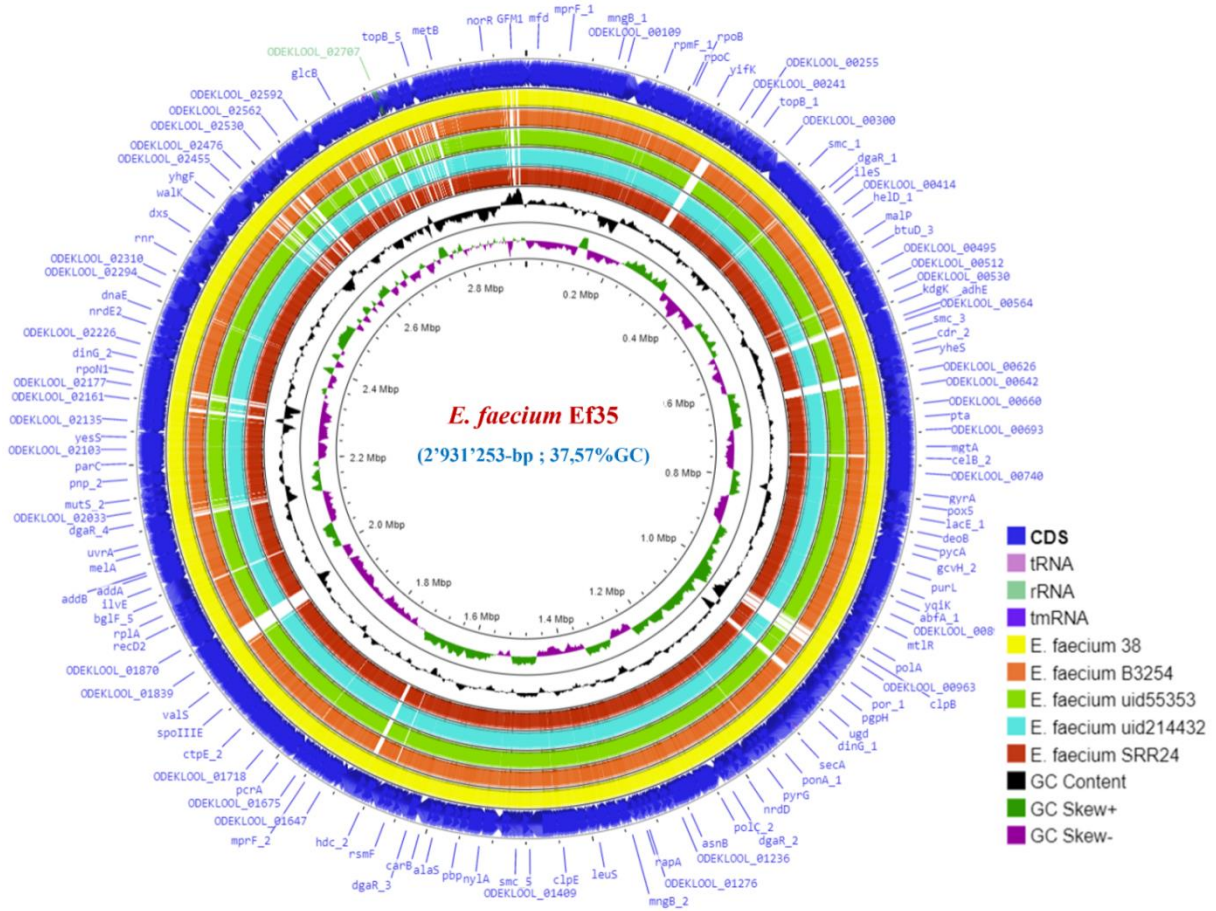


Figure 48. Carte circulaire du chromosome *E.faecium_35* Q7358 et *E.faecium_38* Q7360 et sa comparaison génomique avec les quatre génomes d'*E. faecium* les plus proches.

Discussion et conclusion

Notre étude s'est déroulée sur une période de deux années au service de gynécologie obstétrique à l'EHS El Bouni-Annaba par un recueil prospectif des données cliniques et microbiologiques de toutes les patientes ayant manifesté une ISO, suite à un acte chirurgical au sein de ce service. Chaque prélèvement collecté a été transporté pour l'analyse bactériologique au niveau du laboratoire de Biochimie et de Microbiologie appliquées (LBMA) de l'université Badji Mokhtar-Annaba, puis transporté à L'IHU Méditerranée infection-Marseille, pour les investigations de biologie moléculaire.

1. Sur le plan épidémiologique

Les ISO au niveau du service de gynécologie obstétrique représentent 1,9 %. Ce pourcentage est proche de celui retrouvé dans les séries des pays développés, à l'instar de l'étude de Ferraro en Italie, qui a trouvé une fréquence de 1,75% (**Ferraro et al., 2016**) et de l'étude de Saundersen en Norvège, qui a rapporté une fréquence d'ISO post césarienne de 1,2% (**Saunders et al., 2014**) rejoignant Fournel en France avec une incidence de 1% (**Fournel, 2017**). Toutefois, ces résultats sont contradictoires avec ceux des pays en voie de développement où la fréquence semble plus élevée ; elle est aux alentours de 7,3% en Afrique subsaharienne (**Ngaroua et al., 2016**), et 7,84% en Inde (**Pathak et al., 2017**). Il en est de même pour l'étude de Brahimi et Belkaid (**2017**) réalisée à l'EHS de Tlemcen qui ont trouvé une incidence de 7,87% Merzougui et al. (**2018**) en Tunisie qui ont rapporté une fréquence de 5, Goma et al. (**2021**) en Egypte qui ont rapporté une fréquence de 5,3% et Açar et al. (**2022**) en Turquie qui ont trouvé une fréquence de 3,4%.

Nos résultats ont montré que sur les 52 interventions chirurgicales effectuées, la chirurgie d'urgence était le mode d'infection le plus courant avec une fréquence de 69 % dominée par les indications obstétricales (46 césariennes) soit 88%, représentées essentiellement par les indications suivantes : asphyxie fœtale, présentation du siège, macrosomie, hématome rétrocervical par rapport aux indications gynécologiques (6 cas), soit 11% reparti comme suit : 3 mastectomie, 2 hystérectomies et un kyste ovarien. Cette disproportion entre les indications obstétricales et les celles gynécologiques peut être expliquée par la période de recrutement des patientes qui a coïncidé avec la pandémie SARS COV-2 qui nous a imposé, par mesure préventive, une restriction des activités pour chirurgie gynécologique froide.

La revue de la littérature montre des taux très variables des ISO d'un pays à l'autre et ceci pourrait être expliqué à la fois, par la qualité de l'offre des soins par les services de prise en charge hospitalière entre les pays et à la différence des mesures préventives qui entourent

l'acte opératoire (Ngarouaet al., 2016). En effet, aux États-Unis selon le CDC, le taux d'ISO rapporté à la suite d'une césarienne est de l'ordre de 3 à 15% (Carande-Kulis, 2012). En France, un taux cumulé de 2,9% a été rapporté selon la base de données provenant de 20 pays de l'UE ECDC (*Surveillance des infections du site opératoire et indicateurs de prévention dans les hôpitaux européens - Protocole HAISSI*, 2017). En Afrique, le taux d'infection postopératoire reste élevé entre 15 et 25%, ce qui entraîne une augmentation de la durée d'hospitalisation, du coût des soins et de la charge de travail pour le personnel des établissements de santé (Ngarouaet al., 2016).

De nombreuses études ont montré qu'une IAS peut être contractée à différents niveaux de la prise en charge de l'acte chirurgicale, lors de la préparation du patients en pré-opératoire, pendant l'intervention en per-opératoire ou en post-opératoire lors de la prise en charge et des soins dépensés aux malades à l'hôpital ou à domicile. De ce fait, les dispositifs médicaux et le personnel de santé sont impliqués de manière directe ou indirecte dans la survenue des IAS. Une contamination hospitalière est susceptible d'être induite par différentes variables et à différentes échelles, comme l'air et les surfaces du milieu hospitalier, les blouses et sur-blouses des chirurgiens, les instruments chirurgicaux ainsi que les bactéries de la flore commensal des patients, ce qui rend difficile l'établissement de la relation entre une ISO et son origine (Tjade et Gabor, 1980; Tartari et Mamo, 2011; Birgand, 2014).

C'est dans ce sens, que nous avons jugé utile d'identifier le milieu de survenue des ISO de notre étude en procédant à des prélèvements des différentes surfaces inertes du milieu hospitalier (bloc opératoire, salle de réanimation et les chambres de malades) de l'ensemble du service de gynécologie obstétrique. L'analyse microbiologique a permis d'isoler les espèces suivantes: *E. cloacae* (47%), *E. coli* (12%) et *E. faecalis* (17%) en salle de réanimation. Ceci concorde bien avec les données de la littérature (Sergent et al., 2012; Bouguenoun, 2017; Ango et al., 2020) où les entérobactéries et les entérocoques, agents pathogènes de la flore commensal du tube digestifs humain, se trouvent principalement dans les sanitaires et leur dissémination se fait par le biais des transmissions manuportées par le personnel soignant vers d'autres locaux et ainsi qu'aux dispositifs médicaux des soins intensifs en salle de réanimation. L'étude du profil d'antibiorésistance de ces souches bactériennes n'a pas montré de phénotype de résistance particulier; ces souches étaient sensibles à de nombreux antibiotiques testés. Cette situation reste néanmoins rassurante vis-à-vis de la contamination d'origine hospitalière.

Dans l'intention de confirmer si ces espèces bactériennes sont parmi l'origine des contaminants nosocomiaux, un MSP dendrogramme par MALDI-TOF a été réalisé entre les souches bactériennes appartenant aux mêmes groupes isolés entre prélèvements des ISO des patientes et les prélèvements des surfaces inertes, comme *E. cloacae*, *E. coli* et *E. faecalis*. En se basant sur les spectres protéiques de chaque identification de souche, le MSP dendrogramme est divisé en plusieurs clusters et nous révèle deux différents clusters indiquant le niveau de distance arbitraire signifiant une phylogénie rapprochée entre les souches d'origine hospitalière et les souches isolées des ISO, confirmant l'origine d'une transmission croisée (environnement/patientes). Ce résultat peut répondre à une des hypothèses émises dans ce travail concernant l'origine nosocomiale des ISO.

Joseph Lister rapporte dans son travail qu'à la suite de l'application de préventions de la contamination exogène du site opératoire par la mise en place de différents protocoles d'hygiène hospitalière, allant de la stérilisation du matériel chirurgical et des tenues du personnel de santé, à la décontamination des surfaces inertes par des agents antiseptiques, à la décontamination aérienne du bloc opératoire et par la préparation des patientes en per-opératoire par un rasage et une décontamination locale du site chirurgicale, une diminution des taux des IAS a été enregistrée (**Bourdillon et Colebrook, 1946; Gastmeier, 2006**).

Notons par exemple, une diminution de 7 à 1,5% des taux d'ISO en orthopédie lors de la mise en place de mesures limitant l'émission de particules par une filtration de l'air du bloc opératoire décrit dans l'étude de Charnley (**1973**). En rattachant cette notion à nos résultats, la faible fréquence des ISO pourrait s'expliquer par les mesures préventives adoptées et strictement suivies selon un protocole d'hygiène hospitalière établi par l'équipe hospitalières de notre structure chez toutes les femmes programmées par notre service pour un programme d'intervention gynécologique ou obstétricale. Dans certains cas d'indication d'urgence, comme chez la majorité des patientes césarisées, ce protocole a été interrompu ce qui est considéré comme un facteur prédictif d'ISO. De même, de nombreux auteurs ont rapporté que la césarienne en urgence était fortement corrélée à un risque élevé d'infections (**Shreet al., 2016; Zejnullahuet al., 2019**). Parmi les protocoles de prévention, une prophylaxie antibiotique a été administrée à toutes les patientes 30 min avant l'incision, consistant en une céphalosporine de 1^{ère} génération (céphaléxine). Cette antibioprophylaxie joue un rôle important dans la réduction du taux d'ISO et constitue l'un des critères les plus importants du protocole de préparation per-opératoire du patient (**Anderson et Sexton, 2016**). L'American Society of Health-System Pharmacists recommande l'utilisation de 2 g de céfazoline intraveineuse pour les patients pesant moins de 120kg et de 3g pour les patients pesant plus de

120 kg comme mesure prophylactique pour prévenir la survenue d'une ISO (**Bratzler et al., 2013**). En effet, il existe des preuves solides du rôle protecteur de l'antibioprophylaxie dans la réduction du taux d'ISO, avec des résultats remarquablement bas chez les patients ayant reçu un antibiotique avant l'intervention chirurgicale (**Gupta et al., 2021**). En plus du protocole de prévention et l'antibioprophylaxie, l'une des raisons du faible taux d'ISO dans notre étude pourrait être due à la majeure proportion des patientes ayant des plaies propres contaminées. Il est bien connu que les patients ayant des plaies contaminées ont un risque d'ISO presque trois fois plus élevé que les plaies non contaminées (**Culver et al., 1991; WHO, 2016**). Une autre raison pourrait être le fait que la plupart des césariennes ont été réalisées en moins d'une heure et cela peut être dû à l'expérience de l'équipe chirurgicale comme indiqué par Pathaket al.(**2017**). Des études antérieures indiquent certains facteurs influençant le risque des ISO qui sont liés à la différence dans la variété des comorbidités, les antécédents chirurgicaux, la durée prolongée du séjour hospitalier, le choix de l'antibiothérapie et la précision des données obtenues (**Olsen et al., 2008; Açaret al., 2022**).

2. Facteurs prédictifs des ISO dans notre cohorte de patientes

Tout d'abord, nous rapportons dans ce travail parmi les facteurs prédictifs liés aux patientes, un IMC ≥ 30 kg/m² dans 63% des cas soit une moyenne de $30,8 \pm 5,6$ kg/m². En effet, il a été démontré qu'un IMC élevé est le facteur prédictif le plus important du risque d'ISO après une césarienne (**Olsen et al., 2008; Pathaket al., 2017; Gupta et al., 2021**). Pour ce qui est du facteurs âge, la relation entre l'âge et l'ISO n'est pas encore claire selon Zejnullahu et al.(**2019**). Ils ont constaté que le risque de développer une ISO était significativement plus faible dans le groupe des moins de 35 ans, dans les cas où la durée de l'opération était inférieure à une heure. Ceci contraste avec les données rapportées dans notre étude où la tranche d'âge la plus touchée était celle de 30-40 ans ($33,93 \pm 8,28$ ans) soit 51% des cas pour une durée d'opération de moins d'une heure dans 86% des cas. Nos données sont similaires aux études menées en Angleterre et en Tunisie, avec un âge moyen respectif de $33,1 \pm 5,2$ ans (**Shreeta et al., 2016**) et $31,20 \pm 4,9$ ans (**Merzougiet al., 2018**). D'après une étude Tunisienne indiquant l'âge comme facteur de risque dépendant pour les ISO, le risque d'ISO augmente de 1,07 fois pour chaque année supplémentaire lorsque l'âge maternel augmente d'un an (**Merzougiet al., 2018**).

Deux grandes études ont montré que les facteurs de risque, y compris les maladies systémiques médicales, augmentent le risque d'ISO. Une étude sur les ISO à la suite d'une

césarienne en Tanzanie a montré qu'un score ASA supérieur à 3 augmente environ 2,7 fois le risque d'ISO (**Mpogoroet al., 2014**). D'autres études expliquent également que les patientes diabétiques, en particulier celles dont la glycémie est mal contrôlée, présentent de nombreuses comorbidités, telles que l'obésité, un mauvais état nutritionnel, un mauvais apport périphérique en oxygène et des troubles métaboliques. Pareillement les patientes souffrant de troubles hypertensifs de la grossesse présentent un risque d'ISO 2,9 fois plus élevé (**Black et al., 2014**). Les patientes à antécédents d'accidents vasculaires cérébraux avec déficit neurologique augmentent le risque d'ISO de 4,41 fois (IC 95 % 1,54-12,65 ; $P < 0,001$) (**Lake et al., 2013**).

Bien qu'aucune comparaison n'ait été faite avec le groupe témoin sain dans notre étude, nous tenons à souligner que chez les femmes atteintes d'ISO, la santé maternelle et l'obstétrique ne sont pas des facteurs de risque, et ont été exprimés à des fréquences moyennes comme l'anémie 31%, le diabète 19,2%, le diabète associé à l'hypertension artérielle 7,6%, l'hypertension artérielle 3,8%, la parité ≥ 3 pour 30,6% des cas avec une moyenne de $1,5 \pm 0,5$. Pour ce qui est de la classification des ISO (superficielles ou profonde) toutes les infections de notre échantillonnage d'étude étaient des infections superficielles, à l'exception de deux patientes (3,8 %) ayant manifesté une infection profonde car elles présentaient une endométrite pour la première et une grossesse molaire pour la deuxième parmi leurs antécédents gynécologiques. Des études similaires rapportent que pour les ISO superficielles le risque est multiplié par 1,52 pour les chirurgies gynécologiques (**Morgan et al., 2016**), tandis qu'une autre étude a montré un risque augmenté de 1,79 fois (Pathaket al., 2017). Cela dit, la survenue des ISO n'est pas uniquement associée à la présence de comorbidité, et ne dépend pas uniquement de la profondeur de l'incision. Le risque de développer une ISO après une césarienne ou une intervention gynécologique serait multifactoriel.

Parmi les antécédents chirurgicaux, le seul antécédent commun à nos patientes était l'utérus cicatriciel dans 29% des cas. En effet, l'utérus cicatriciel peut être incriminé comme un facteur de risque de survenue d'ISO puisqu'il semble provoquer une fibrose de la paroi cicatricielle (**Merzouguiet al., 2018**). Sur l'ensemble des patientes incluses, le délai médian de diagnostic de l'ISO était de $2,31 \pm 0,89$ jours postopératoires dans la majorité des cas (63,4%) ; les ISO ont été diagnostiquées dans un délai ≤ 7 jours. Une étude similaire rapporte que les ISO ont été détectées dans les 7 premiers jours postopératoires, ce qui peut être attribué à une contamination ou à une diminution des mesures d'asepsie dans la salle d'opération pendant l'intervention (**Hosmer et Lemesbow, 1980**).

Pendant la période post-opératoire, les ISO sont le plus souvent évaluées en contrôlant le taux de protéine C-réactive (CRP) qui était élevée au moment du prélèvement chez 87% des patientes de notre étude, associé à une symptomatologie spécifique se manifestant par une fièvre à 37°C, rougeurs et enfléments au niveau de la plaie pour la majorité des patientes (71%).

Enfin, l'écoulement purulent secrété dans chaque cas d'ISO a fait l'objet de l'analyse bactériologique pour la suite du travail. La prise en charge hospitalière des ISO de chaque cas a été réalisée par un nettoyage de la plaie en utilisant deux agents antiseptiques (bétadine et eau oxygénée), suivie d'un pansement un jour sur deux et une antibiothérapie à large spectre. La figure 1 indique la corrélation entre l'antibiothérapie et l'évolution favorable de l'infection en fonction de la durée du séjour hospitalier. Parmi les différents antibiotiques prescrits au sein de notre hôpital, cette corrélation nous permet de déduire l'association antibiotique utilisée en thérapie la plus efficace pour les ISO survenu dans notre cohorte d'étude, et qui est représentée par Flagyl/Claforan/Gentamicine.

3. Profil microbiologique des prélèvements de pus

L'analyse bactériologique des échantillons de pus provenant d'ISO ont révélés qu'un total de 65 espèces bactériennes aérobies ont été isolées. Parmi un totale de 52 prélèvements les isolats purs (75%) dépassent les isolats mixtes (25%), ce qui est en accord avec d'autres études analysant le profil microbiologique des ISO (**Amatya et Rijal, 2015; Hope et al., 2019**), mais en désaccord avec une étude en Italie où plus d'isolats mixtes ont été récupérés par rapport aux isolats purs (**Giacometti et al., 2000**). Nous pouvant relier notre résultat à la classed'Altemeire(propre contaminé) de la plaie chirurgicale qui joue un rôle dans la pureté des isolats comme indiqué par la publication de Derick hope disant que les procédures propres étaient associées à des isolats monomicrobiens, tandis que les plaies contaminées et sales étaient associées à des isolats polymicrobiens (**Hope et al., 2019**).

Les isolats de bacilles à Gram négatif et les isolats de cocci à Gram positif représentent respectivement 74% et 26%. Le MALDI-TOF MS a été utilisé comme principal outil d'identification des espèces bactériennes (**Senget al., 2010b**). L'identification des espèces bactériennes appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* dans notre étude a dévoilé que les pathogènes à Gram négatif sont les causes les plus fréquentes d'ISO collectées, prédominé par *E. coli* (51%). Des résultats similaires ont été rapportés par une étude au West African sur les ISO en chirurgie et une seconde étude au Sénégal sur les ISO en Urologie respectivement

avec les taux suivant : 29% et 30% d'*E. coli* (Hope et al., 2019; Ndiayeet al.,2020). Une étude en inde rapporte que les ISO en gynécologie obstétrique sont plus causés par *S. aureus* (47%) (Dhote et Nagdeo, 2018; Shagun et Chaitra, 2020). En effet les microorganismes les plus fréquemment responsables des ISO sont des agents pathogènes commensaux des humains que ce soient des Staphylocoques de la flore cutanée ou des entérobactéries de la flore intestinale (Fouedjioet al., 2021). De plus, l'origine des agents pathogènes en cause des ISO pourrait être attribuée à la diversité de l'habitat des bactéries à Gram négatif, y compris les surfaces inanimées dans les hôpitaux ; ainsi nous pouvons nous appuyer sur notre résultat obtenu par les isolats des surfaces inertes du milieu hospitalier (BGN 79% par rapport aux cocci Gram positif (21%).

4. Profil d'antibiorésistance des espèces bactériennes isolées des prélèvements de pus

Le schéma de résistance aux antimicrobiens des isolats, montre que 65,4% des espèces bactériennes se sont révélées multi-résistantes vis-à-vis des différentes classes d'antibiotiques testés. Dans ce travail les bactéries multi-résistantes les plus isolées appartiennent au groupe des BGN avec un taux de 54% alors que les CGP représentaient un taux de 47% .Chez les entérobactéries la résistance la plus importante a été exprimée contre l'amoxicilline/acide clavulanique 83%. l'amoxicilline 61%et la Cefalotine59%. Des études similaires publiées en Irlande, en Inde et en Afrique ont également montré des fréquences élevéesde 80, 90 et 60%respectivement, vis-à-vis de l'amoxicillin etampicillin-amoxicillin-acide clavulanique (Dhote et Nagdeo, 2018; Hope et al., 2019) contrairement à Pinctonet al.(1993) qui a rapporté une faible fréquence de 26% à l'amoxicillin-acide clavulanique.

Toutefois, les isolats d'enterobactéries identifiés dans notre travail n'ont exprimé aucun autre phénotype de résistance élevée vis-à-vis du reste du panel d'antibiotiques testés. Une entière sensibilité est rapportée contre les carbapénèmes, cela est en accord avec une étude similaire au Sénégal montrant une sensibilité de100% à l'imipenème chez les *E. coli* isolés d'ISO en urologie (Ndiayeet al., 2020).La résistance des entérobactéries aux carbapénèmes demeure rare en Algérie. Les premiers cas ont été décrits en 2013 à Annaba chez *E. coli* (Sassi et al., 2013), puis en 2014 aux hôpitaux de Constantine et d'Alger respectivement chez *E. coli* et *K. pneumoniae* (Agabouet al., 2014). En 2015, une seule étude a été rapportée sur *K.pneumoniae*à Constantine (Cuzonet al., 2015). En 2016, une autre étude a été publiée, à Batna rapportant un autre cas de *K. pneumoniae* résistant aux carbapénèmes (Loucif et al., 2016).A Annaba et Skikda, Mellouket al. (2017) ont rapporté

d'autres espèces, en plus de *K.pneumoniae* et *E. coli*. En effet, *E. cloacae* et *S. marcescens* sont également présentés une résistance aux carbapénèmes et plus précisément à l'ertapénème, A Guelma, Bouguenoun et al. (2017) ont aussi rapporté des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (ertapénème) dont *K. pneumoniae*, *E. coli* et *E. cloacae*. L'absence de résistance aux carbapénèmes est plutôt une situation rassurante vis-à-vis des phénotypes de résistances de nos isolats d'entérobactéries. Or, cela n'exclut pas tout à fait le risque d'évolution vers cette situation, car les options thérapeutiques sont parfois limitées face à des infections à BGN productrices de BLSE par l'utilisation des C3G qui sont considérés comme traitement de choix au niveau des hôpitaux. Leur utilisation massive, même pour des raisons prophylactiques, ne pourrait pas rester sans conséquences.

Dans la présente étude, la résistance des entérobactéries vis-à-vis d'autres classes d'antibiotiques a révélé une résistance modérée pour le triméthoprim (43%) ; nous pouvons rattacher cette légère augmentation au fait que cet antibiotique est prescrit dans l'antibiothérapie initiale chez les patientes manifestant une ISO. Une faible proportion de résistance est rapportée pour le reste des antibiotiques comme la ciprofloxacine, la fosfomycine et la gentamicine respectivement (26,4 %). La colistine reste active et la résistance à cet agent antimicrobien reste marginale et classiquement faible. Dans notre collection, aucune souche n'a été résistante à la colistine. Uniquement un seul phénotype de coexpression a été détecté parmi nos isolats d'entérobactéries il s'agit de 3 souches d'*E. cloacae* (6,5%) exprimant les gènes BLSE TEM-206, CTX-M15 et le gène *aac(6')Ib* de résistance à la gentamicine.

Chez les espèces de *P.putida*, le profil de résistance aux antibiotiques n'est pas significatif vis-à-vis des différents antibiotiques testés. Cela dit, nous rapportant une résistance moyenne de 50% pour la piperacilline-acide clavulanique, l'aztreonam, la fosfomycine, et la gentamicine. En opposition avec une étude sénégalaise qui affirme que *P. aeruginosa* serait parmi les espèces bactériennes les plus isolées des ISO en urologie, et exprimant des taux de résistance assez élevés vis-à-vis des C3G, la colistine, l'imipénème et la gentamicine avec des pourcentages respectifs de 80, 85.7, 78.5 et 25%, (Ndiaye et al., 2020)

Chez les cocci à Gram positif, nous avons identifié *E. faecalis* comme étant l'agent pathogène le plus fréquent (71%), ce qui est en accord avec une étude similaire récemment publiée en Croatie (Bogdanović et Cerovac, 2022). Toutefois, le schéma de résistance aux antimicrobiens des isolats d'*Enterococcus* spp exprime une résistance élevée à l'oxacilline ; ce phénotype sauvage n'est pas pris en considération vis-à-vis du phénotype de résistance

exprimé par ces isolats. Une résistance totale est rapportée pour la clindamycine (100%), ainsi que pour la minocycline et l'érythromycine avec des valeurs respectives de 83% et 66%. De faibles proportions de résistance sont rapportées pour le reste des antibiotiques comme la vancomycine (25%) et la teicoplanine (8%). Selon une étude française, les souches d'*Enterococcus spp* résistantes à la vancomycine sont plus significativement résistantes à d'autres antibiotiques dont l'ampicilline, la gentamicine, les fluoroquinolones et la lincomycine, mais restent sensibles au linézolide, à la rifampicine, à l'acide fusidique et à la tigécycline. Mentionnant aussi, que ce critère est rattaché à la corésistance par des complexes clonaux qui accumulent la résistance aux antibiotiques et qui sont le plus souvent responsables d'épidémies. En vue de l'effectif très réduit des travaux réalisés sur les entérocoques d'origine clinique en Algérie, la comparaison des profils d'antibiorésistance ne peut être effectuée de façon similaire. Néanmoins, Les entérocoques sont des bactéries commensales communes du système digestif humain et animal. *Enterococcus faecalis*, en particulier les souches résistantes à la vancomycine, sont une cause importante des infections nosocomiales telles que la bactériémie, la septicémie, l'endocardite, l'infection des voies urinaires (IVU) et l'infection des plaies. La combinaison d'un agent actif sur la paroi cellulaire (ampicilline, pénicilline ou vancomycine) et d'un aminoglycoside, généralement la gentamicine, a été fréquemment utilisée pour le traitement des infections graves à entérocoques (Zalipour et Esfahani, 2019).

Des travaux ultérieurs renseignent que les staphylocoques sont des composants dominant du microbiome cutané et nasal des patients et du personnel et sont la cause la plus fréquente d'ISO (Zejnullahuet al., 2019). Cela dit, nous ne pouvant pas confirmer cette notion car parmi notre échantillonnage nous avons obtenu un nombre réduit de *Staphylococcus spp* (8%). Nous constatons que le faible taux d'isolement des staphylocoques illustré par nos résultats, contrairement à d'autres travaux, révèlent 45,1 ; 37,3 et 35,7% respectivement (Anguzu et Olila, 2007; Dessalegnat al., 2014; Mengesha et al., 2014) ; ceci est susceptiblement liés à certaines conditions d'isolement et d'identification. Etant donné que leurs profils d'antibiorésistance se sont révélés sensibles à la quasi-totalité des antibiotiques, il s'agit probablement des staphylocoques commensales de la peau sensibles nécessitant des conditions de mise en culture enrichies.

La résistance bactérienne aux antibiotiques est un phénomène mondial qui suscite de plus en plus notre inquiétude. Cette résistance affecte aussi bien les pays développés que, surtout, les pays en voie de développement où cohabitent l'automédication et la vente anarchique des médicaments en dehors des structures légales (Aminov, 2010). Les infections causées par des

bactéries résistantes à Gram négatif ou à Gram positif deviennent très répandues et constituent actuellement une menace sérieuse associée à un fardeau clinique et économique avec des taux élevés de morbidité et de mortalité (**Kaye et Pogue, 2015**).

4. Profil microbiologique des bactéries isolées du milieu hospitalier

Les surfaces hospitalières présentaient des taux de contamination légèrement différents les uns des autres, dont le bloc opératoire (14%), la salle de réanimation (57%) et les chambres (19%). La salle de réanimation constitue le milieu hospitalier où les souches bactériennes ont été le plus isolées. En effet le service de réanimation et de chirurgie sont les plus cités en Algérie (**Dali Ali, 2015**) et même au Maroc (**El ayneet al., 2014**). Les entérobactéries étant des microorganismes commensaux et ubiquitaires du tube digestif, peuvent être responsables d'infections cliniques sur des terrains débilisés. Nous constatons que la diversité microbienne des souches bactériennes isolées en milieu hospitalier pourraient être expliquées par la communauté humaine locale qui passe à travers les lieux, le fait qu'il s'agit des lieux ouverts et fréquentés, quant à l'abondance des prélèvements dépend des différents locaux à prélever (**Pozaet al., 2012**).

Parmi la totalité des espèces bactériennes isolées du milieu hospitalier (n=21), *E. cloacae* représente l'espèce la plus fréquente (38 %); *E. cloacae* est reconnue comme une bactérie hospitalière. Nos résultats sont similaires à ceux retrouvés à Oran (**Dali Ali, 2015**) et à Guelma (**Bouguenoun, 2017**). Le résultat du profil d'antibiorésistance des souches bactériennes isolées du milieu hospitalier n'a montré aucun phénotype de résistance précis et s'est révélé sensible à la majorité des antibiotiques testés. Cette situation reste néanmoins rassurante vis-à-vis de la contamination d'origine hospitalière.

Afin de confirmer la relation entre les espèces d'origine hospitalières et les espèces isolées chez les patientes, un MSP dendrogramme sur MALDI-TOF a été réalisé entre les souches bactériennes appartenant aux mêmes groupes isolées des prélèvements des surfaces inertes et des prélèvements des ISO. Chaque dendrogramme obtenu a permis de faire un typage pour les espèces d'*E. cloacae*, *E. coli* parmi les BGN et les espèces d'*E. faecalis* parmi les CGP. Le MSP dendrogramme est divisé en plusieurs clusters et nous révèle deux différents clusters indiquant une limite arbitraire d'une distance de 100 signifiant une phylogénie rapprochée entre les souches d'origine hospitalière et les souches isolées des ISO. Finalement, le dendrogramme a montré que l'origine des isolats peut influencer le regroupement des souches d'une même espèce dans un seul cluster. Les souches isolées en

réanimation se sont regroupées avec celles isolées des patientes de la même espèce, confirmant l'origine d'une transmission croisée (environnement/patientes). Ce résultats peut répondre à une des hypothèses émise dans ce travail concernant l'origine nosocomiales des ISO.

5. Réaction de polymérisation en chaine et séquençage de Sanger

En vue du nombre très réduit des travaux publiés sur les ISO en Algérie ainsi que sur leurs études du profil microbiologique et d'antibiorésistance, notre étude est considérée comme l'une des premières à avoir été réalisée. Nous exposant ici une comparaison à petite échelle des différents gènes et variants de résistance. L'analyse moléculaire révèle 41,3% de BLSE chez les entérobactéries exprimé par 31,5% TEM, 21% SHV et 84,2% CTX-M. Les BLSE de type TEM, SHV et CTX-M ont largement été diffusées dans le monde avec des prévalences variables selon les pays. Ces variations dépendent de plusieurs facteurs parmi lesquels la détection de ces enzymes, la mesure de surveillance des maladies infectieuses, l'utilisation abusive des antibiotiques. Aux Etats-Unis, la prévalence des BLSE a varié de 0 à 25 % avec une moyenne nationale de 3%, jusqu'à dans les années 2007, les enzymes prédominantes étant TEM et SHV et les enzymes de type CTX-M étaient considérées comme rare. Depuis le début du 20^{ème} siècle les enzymes CTX-M ont été détectées dans 38,8% des souches cliniques productrices de BLSE, avec comme déterminants génétiques prédominants, CTX-M-14 et CTX-M-15 (Castanheira et al., 2008). En Europe, la prévalence de ces souches varie en fonction des pays. Une étude récente portant sur *E. coli*, *K.pneumoniae* et *Enterobacterspp* a montré que la prévalence des souches BLSE était de 4,7% en Europe du Nord contre 13,5% au Sud de l'Europe. En France, le changement de bactérie hôte a vu les BLSE émerger des espèces nosocomiales épidémiques classiques *K. pneumoniae*, *Enterobacter spp*, vers *E. coli*. De plus, une augmentation très nette des infections communautaires (notamment urinaires) dues aux bactéries productrices de BLSE a été observée (Nordmann, 2010). En Afrique, l'émergence des BLSE a été signalée dans certains pays de 2005 à 2016 avec des taux variables : 12% au Cameroun, 15% en Afrique du Sud, et de 9 à 56,2% en Côte d'Ivoire (Castanheira et al., 2008). En Afrique du nord elle présentée des taux beaucoup plus élevés, notamment en Tunisie (26,2%) (Messaoudiet al., 2019) et en Algérie (82%) (Bouguenoun, 2017). La résistance des BGN aux antibiotiques pose un grand problème au niveau des hôpitaux algériens et dans le monde entier (Van Duijn et Dautzenberg, 2011; Tani et Arlet, 2014) surtout après la grande diffusion des clones

résistant aux C3G qui ne cesse de se renforcer notamment par l'acquisition de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) et la propagation des clones résistant aux carbapénèmes par l'acquisition de β -lactamases de type carbapénémases qui sont des enzymes plus puissantes que les BGN ont pu produire (Nordmann, 2010; Mathlouthiet al., 2017).

La recherche des supports génétiques par séquençage de Sanger nous a permis de détecter les différents variants des gènes de résistances par PCR chez les entérobactéries et les entérocoques.

Chez les entérobactéries, les gènes des BLSE qui ont été détectés uniquement, étaient en association avec l'expression du gène de résistance à la gentamicine chez 3 (6%) souches d'*Enterobacter cloacae*. Toutefois, un nouveau variant de la famille des TEM a été détecté chez ces entérobactéries; le variant TEM-206 a été détecté chez *E. cloacae* (21%) et *E. coli* (10,5%). Ce variant a été initialement rapporté en Italie chez *K. pneumoniae* dans le service de soins intensifs néonatale, mais rarement isolés en Europe par rapport aux variants de type TEM-24, TEM-3 et TEM-4 et TEM-52 les plus fréquents chez les entérobactéries (Cantón et al., 2008). En Algérie, le variant le plus isolé est TEM-1 rapporté dans des travaux ultérieurs (Belbelet al., 2014; Khennouchiet al., 2015). Par ailleurs, le variant SHV rapporté parmi nos résultats est le SHV-187 chez *K. pneumoniae* (21%) également une première détection en Algérie. Ce variant a initialement été isolé des *K. pneumoniae* d'origine animale en Italie. Tous les variants SHV sont des dérivés de SHV-1 et SHV-2 parmi lesquels SHV-5 et SHV-12 sont les mutants les plus fréquents en Europe (Cantón et al., 2008), tandis qu'en Algérie, les BLSE de type SHV les plus fréquents sont SHV-12, SHV-11, SHV-1, SHV-32 et SHV-133. Les moins répons sont SHV-1a, SHV-2a, SHV-28, SHV-31, SHV-33, SHV-98, SHV-99 et SHV-100. Jusqu'à la fin des années 1990, la majorité des BLSE détectées étaient des dérivés de TEM-1/2 et de SHV-1 (Ramdani-Bougoussa et al., 2011; Abir, 2014; Bouguenoun, 2017). En outre, on rapporte ici l'expression du variant CTX-M15 chez *E. cloacae* (31,5%) *E. coli* (21%) et *M. morgani* (10,5%). Cet enzyme représente actuellement les BLSE les plus fréquentes au sein des entérobactéries au niveau mondial après une diffusion rapide depuis le milieu des années 90. En Algérie, plusieurs études rapportent non seulement la diffusion de CTX-M-15, mais également de CTX-M-3 et CTX-M-28 (Touati et al., 2006; Ramdani-Bougoussa et al., 2011; Belbelet al., 2014). La diffusion du gène CTX-M15 est la conséquence d'une grande dissémination d'un même plasmide ou de plasmides reliés qui possèdent ce gène. Le CTX-M15 a été identifié pour la première fois chez un clone épidémique d'*E. coli*, et il est actuellement le gène de BLSE le plus répons au monde (Hammamiet al., 2012).

Nous estimons dans notre travail, une situation maitrisable de la résistance aux antibiotiques du fait de la détection uniquement des BLSE comme principal phénotype de résistance chez les entérobactéries qu'elles soient d'origine nosocomiales ou communautaires. Toutes les infections ont eu une évolution favorable pendant l'antibiothérapie. Cette situation n'exclue pas une potentielle émergence ou évolution des phénotypes de résistance parmi les ISO.

La résistance des cocci à Gram positif a suscité notre inquiétude en raison de la multirésistance des espèces d'*E. faecium*, avec une résistance à la vancomycine par l'expression du gène *vanA* révélé par la RT-PCR dans 16% des cas parmi la totalité des *Enterococcus spp.* Nous utilisons ici des données de séquençage à lecture courte par un séquençage de nouvelle génération (NGS) (Miseq Illumina) pour la caractérisation génomique de la résistance à la vancomycine chez *E. faecium* résistant à la vancomycine. Les diagnostics moléculaires actuels des agents pathogènes humains fournissent des informations limitées qui ne sont souvent pas suffisantes pour enquêter sur les épidémies et les transmissions. Le NGS détermine la séquence d'ADN d'un génome bactérien complet en une seule séquence, et ces données permettent d'obtenir des informations sur la résistance et la virulence, ainsi que des informations pour le typage utiles pour l'étude des épidémies. Au cours des deux dernières décennies, les méthodes de diagnostic moléculaire ont connu un développement rapide et ont joué un rôle de plus en plus important. Ces méthodes ont permis de réduire le délai entre la réception de l'échantillon et le résultat final, et de détecter des agents pathogènes non cultivables (Deurenberget al., 2017).

6. Séquençage Miseq Illumina

Dans cette étude, nous rapportons la séquence complète du génome de deux souches d'*E. faecium* Q7358 et Q7360 d'origine clinique, isolées de prélèvement d'ISO post-césarienne. Le premier isolat clinique d'Entérocoque résistant à la vancomycine (ERV) en Algérie a été détecté en 2006 à partir d'un échantillon d'urine de la souche *E. faecalis* au centre hospitalier universitaire de Beni-Messous à Alger (Aggouneet al., 2008). Récemment Cheraket al., (2022) ont décrit la première détection du complexe clonal 17 d'*E. faecium* positif au *vanA* dans les eaux usées d'un hôpital à Batna en Algérie. Les ERV ont suscité une grande attention, car peu de données sont disponibles sur le mécanisme moléculaire de cette résistance dans notre pays.

Le profil de résistance des deux souches d'*E. faecium* montre une résistance à la majorité des antibiotiques testés tels que la pénicilline, l'oxacilline, l'amoxicilline, la ceftriaxone, la clindamycine, l'érythromycine, la gentamicine, la vancomycine et la teicoplanine.

L'émergence de l'ERV a soulevé de nombreuses questions au sein de notre équipe, en particulier celles relatives à l'origine de contamination par cette bactérie. La probable origine alimentaire évoquée par plusieurs publications a été d'emblée écartée, l'avoparcine n'étant pas utilisée en Algérie. La succession des caractérisations moléculaires et génomiques établie par des outils de bioinformatique nous révèle une forte ressemblance et rapprochement génétique entre les deux *E. faecium* isolées. De ce fait nous suspectons qu'il s'agit très probablement de la même souche à partir des deux prélèvements par une transmission intra-hospitalière de la patiente 35 à la patiente 38 avec un délai de 21 jours entre les deux interventions, bien que les patientes aient suivi une antibiothérapie probabiliste pendant 4 jours après l'intervention chirurgicale, composée de la céfalexine, du bactrim et la gentamicine ; nous constatons que le rôle de l'antibioprophylaxie ne suffit pas lorsqu'il s'agit de souches hospitalières multirésistantes. En outre, les patientes présentaient également des antécédents médicaux telle qu'un IMC >30, une hypertension et un diabète. Comme plusieurs rapports le révèle, la plupart des souches d'*E. faecium* résistant à la vancomycine (VREfm) ont été isolées chez des patients présentant des comorbidités ou une immunosuppression, notamment des hémopathies malignes, des maladies digestives, des polytraumatismes et des chimiothérapies immunosuppressives (**Razaet al., 2018; Benamrouche et al., 2021**).

7. Analyses bio-informatique des séquences génomiques

L'analyse du génome complet des deux souches à l'aide de différents outils bioinformatiques a révélé que *E. faecium* Q7358 et Q7360 appartiennent au type de séquence ST 80 et au complexe clonal CC17. L'alignement des séquences du génome complet des deux souches avec la base de données GenBank du NCBI database a indiqué qu'elles étaient porteuses d'un plasmide de type rep17/pRUM que nous avons nommé EF_35_Algeria, signalé pour la première fois en Algérie et en Afrique. Le plasmide le plus proche de nos souches *E. faecium* est Efm008 pJEG040, numéro d'accèsion KX810025.1 de la base de données NCBI avec une couverture de 99% et une identité de 99,97% avec notre plasmide. Ce plasmide rep17/pRUM, porte en plus de l'opéron *vanA*, les gènes de résistance *ermB* et *aph3*. Ce réplicon d'environ 120-130 kb découvert pour la première fois en Australie en 2017 (**Wardalet al., 2017**), a déjà été décrit entre 2002-2004 par une étude suédoise antérieure dans

un groupe polyclonal d'*E. faecium* (Sun et al., 2020). Facilement transférable entre *E. faecium*, il a été démontré qu'il héberge en plus un module de stabilité de ségrégation codé par une cassette de toxine-antitoxine, qui favorise le maintien de gènes de résistance antimicrobienne liés et particulièrement présents dans une majorité de souches de type CC17 (Grady et Hayes, 2003; Rosvollet al., 2010). En outre, il est intéressant de noter qu'une étude similaire portant sur ce même plasmide indique qu'il est capable de se propager entre les souches, très probablement en raison de la présence de gènes liés à la conjugaison (Kos et al., 2012). Il a également été rapporté que le plasmide pJEG40 est très similaire au plasmide pS177 qui a transféré une résistance élevée à la vancomycine chez *S. aureus* résistant à la méthicilline, probablement par co-intégration avec un plasmide conjugatif présent chez le donneur d'ERV (Kos et al., 2012).

La représentation circulaire révélée par le logiciel CGView, indique que notre plasmide EF_35_Algerie présente une forte similitude avec le plasmide de la souche WC083 de *S. aureus*, numéro d'accès CP092548.1, avec une couverture de 94% et une identité de 99,94 %. La comparaison des régions homologues partagées par les différents types de plasmides porteurs de *vanA* révèle un élément similaire entre notre plasmide (EF_35_Algerie) et d'autres plasmides de la base de données NCBI (*E. faecium* plasmides pJEG40, *E. faecium* plasmides VB13828, *E. faecium* pJEG40, *E. faecium* plasmids VB13828 et *S. aureus* plasmide WC083S). En plus des gènes de résistance *aph3* et *ermB* trouvés dans l'espèce *E. faecium*, le plasmide *S. aureus* porte les gènes de résistance *tet(s)* et *aph2*.

La succession d'analyse par des logiciels de bioinformatique comme MAUVE, puis les comparaisons par Blast NCBI ont conduit à l'identification de l'élément génétique mobile Tn1546. Ce Tn de la famille des Tn3 comprend cinq gènes impliqués dans la résistance aux glycopeptides (*vanHAXYZ*) et deux gènes régulateurs (*vanRS*) (Gilmoret al., 2014). L'opéron *vanA* est porté par des transposons de type Tn1546, qui présentent un haut degré d'hétérogénéité. Des mutations ponctuelles, des délétions et diverses séquences d'insertion ont toutes été associées aux transposons de type Tn1546 (Sivertsenet al., 2014). Selon la littérature, le Tn1546 se trouve sur des plasmides de type pRUM (prédominant aux États-Unis) et sur des plasmides Inc18 (prédominant en Europe) (Freitaset al., 2016). Plusieurs nouveaux variants du transposon *vanA* Tn1546 ont été fréquemment rencontrés en Europe, en particulier à la fin des années 1990 et dans les années 2000 (Hsiehet al., 2010). La résistance à la vancomycine chez *E. faecium* adaptée aux hôpitaux est conférée par des variants de l'opéron *van*, bien que les plus courantes et les plus pertinentes soient l'opéron *vanA* transporté par le *tn1546*, comme indiqué par nos résultats.

En effet, *E. faecium* de type *vanA*, a montré des résistances de haut niveau à la fois à la vancomycine et à la teicoplanine, pour lesquelles une propagation clonale a été démontrée, en particulier par la diffusion mondiale du CC17 adapté à l'hôpital (Kos et al., 2012 ; Raza et al., 2018). Nous avons pareillement décrit le ST80 avec CC17 qui est le clone. La capacité d'*E. faecium* à acquérir de l'ADN étranger joue un rôle central dans l'évolution de la résistance aux médicaments et dans l'adaptation aux hôpitaux chez cette espèce. Le transfert horizontal de gènes impliquant des plasmides, des prophages, des îlots génomiques, la recombinaison homologue et le chromosome cassette d'*Enterococcus* récemment identifié, sont un moteur important de la diversité et de l'évolution adaptative du génome dynamique d'*Enterococcus*. L'étude des bactéries *E. faecium* en tant qu'agents pathogènes nosocomiaux contribue à l'évolution et à la propagation des *ERVm* (Kos et al., 2012; Gilmore et al., 2014 ; Raza et al., 2018). Diverses études ont identifiées des facteurs de risque, des adaptations et des mécanismes de transmission et d'échec du traitement qui doivent maintenant être exploités pour informer et guider les efforts visant à limiter l'évolution et la propagation des *ERVm* (Reuter et al., 2013; Brodricket al., 2016; Gorri et al., 2019).

Enfin, nous pouvons déduire que l'expression des mécanismes de résistance par différent degré chez différentes espèces bactériennes d'origine nosocomiale ou communautaire, peuvent contribuer à éviter l'effet des antibiotiques prescrits à titre prophylactique. Il est important de comprendre le profil local de sensibilité aux antibiotiques afin de prescrire une antibiothérapie appropriée, en attendant les résultats de l'examen microscopique, de la culture et de l'antibiogramme de l'échantillon de la plaie, pour assurer une meilleure prophylaxie en cas d'infection postopératoire. De plus, il est crucial que les femmes enceintes présentant des pathologies maternelles liées à la grossesse ou présentant une indication d'intervention d'urgence, bénéficient de soins prénatals adéquats et que les infections bactériennes des voies génitales inférieures soient dépistées pendant la grossesse pour prévenir la survenue d'ISO.

8. Forces et limites de l'étude

Forces de l'étude principalement liées à la conception de l'étude :

- Il s'agit d'une étude transversale à recueil prospectif, ce qui nous a permis de récolter toutes les informations concernant les caractéristiques cliniques et paracliniques des patientes et d'établir les scores ASA et d'Altemeier.
- L'analyse bactériologique des prélèvements de pus initié au niveau du laboratoire de recherche à l'université d'Annaba et poursuivi dans un laboratoire de pointe

à Marseille, nous a permis de compléter l'analyse microbiologique et la caractérisation moléculaire des agents pathogènes isolés à partir des prélèvements de pus.

- Un autre point fort de cette étude est l'utilisation de définition d'ISO et d'un protocole d'étude standardisé ce qui nous a permis de comparer les résultats de notre étude aux autres études similaires.

Les limites de l'étude sont principalement liées à :

- La période de l'étude qui a coïncidé avec la période de la pandémie SARS-Covid19, caractérisée par une restriction des déplacements de la population dans le cadre du confinement et surtout un arrêt de toute activité chirurgicale froide ce qui a limité le recrutement des malades pour la pathologie gynécologique.
- D'un autre côté, la taille limitée de l'échantillon fait que les résultats ne sont pas extrapolables à la population générale. Mais ils sont toutes fois intéressants car ils nous ont permis de déterminer une population à risque et d'identifier le profil bactériologiques des ISO dans notre structure.

Conclusion

Cette étude a porté sur l'analyse épidémiologique avec facteurs prédicteurs des infections du site opératoire (ISO) et l'identification des agents pathogènes associés, ainsi que la caractérisations moléculaire des profils de résistance aux antibiotiques par collecte d'une cohorte de 52 patientes opérées entre janvier 2020 et janvier 2022 au niveau du service de gynécologie obstétrique a l'EHS El Bouni-Annaba.

L'approche d'un suivi épidémiologique par l'utilisation de fiche d'enquête s'est avérée intéressante dans l'évaluation et le diagnostic des ISO. Nous avons estimé une incidence de 1,9%. Ce taux est relativement faible par rapport à l'incidence rapportée par des publications similaires dans des régions Africaines. Un niveau éducatif bas et le motif d'urgence des interventions étaient les facteurs prédicteurs sociodémographique les plus rapportés. Au sein de notre cohorte d'étude les interventions obstétricales étaient plus fréquentes que les interventions gynécologiques. Les facteurs prédicteurs liées aux patientes étaient majoritairement l'indice de masse corporelle élevé (63,9%) et l'anémie (31%).

L'analyse bactériologique des prélèvements de pus des ISO, a permis d'identifier les agents pathogènes en cause. Les bacilles à Gram négatif étaient plus fréquents (74%) que les cocci Gram positifs (26%) prédominé par *E. coli*(35,4%). Les profils d'antibiorésistance étudiés nous ont permis de détecter la synthèse uniquement des BLSE (41%) chez les entérobactéries et le gène de résistance à la vancomycine (17%) chez *Enterococcus faecium* comme principal phénotype de résistance.

Les caractérisations moléculaires associées à l'utilisation d'outils en bioinformatique nous ont permis d'avoir recours d'une part au séquençage de Sanger révélant l'expression du variant CTX- M15 (94%) le plus identifié parmi les BLSE soit seul ou en Co-expression avec d'autres BLSE (TEM ; SHV) ou autre gène de résistance (*aac6-Ib*). D'autre part, le séquençage de nouvelle génération Miseq Illumina révèle la présence d'un plasmide de type PRUM-Likerep 17 comme élément génétique mobile porteur de l'opéron *vanA* et exprimant la résistance à la vancomycine chez *E. faecium*.

La survenue des ISO peut être liée à différents facteurs et peut avoir divers origines. Une meilleure connaissance des facteurs de prédilection et des bactéries rencontrées permettrons l'instauration d'un index de risque pour mieux les maîtriser. Le respect des protocoles d'hygiène hospitaliers, une préparation correcte des patients et l'administration d'antibioprophylaxie efficace ont pour objectif de diminuer la fréquence et la gravité des ISO. De ce fait, en pratique médicale la nécessité de la mise en place ou encore la mise en

avant des protocoles pluridisciplinaire regroupant chirurgiens, infirmiers, microbiologistes et pharmaciens, pour une meilleure maîtrise des situations à risque et une diminution de la survenue des ISO. Cette équipe joue également un rôle de formation et d'information des recommandations fournis sur les coûts supplémentaires de ces infections et l'évolution des résistances aux agents antimicrobiens pour limiter le phénomène d'émergence de souches résistantes. Les résultats rapportés sur ce travail peuvent fournir une perspective différente pour améliorer la surveillance des ISO en apportant de nouvelles données à la littérature. Dans la continuité de ce travail, il serait intéressant de réaliser une évaluation des pratiques professionnelles concernant le respect des précautions standards et le contrôle de la consommation d'antibiotiques à large spectre.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Açar, S., Yılmaz, B., Çiftçi, E., & Kumru, P. (2022). Retrospective analysis of surgical site infections after cesarean section: Rates, microbiological profile, and clinical features. *ZEYNEP KAMIL MEDICAL JOURNAL*, 53(1):8-16.

Agabou, A., Pantel, A., Ouchenane, Z., Lezzar, N., Khemissi, S., Satta, D., Lavigne, J. P. (2014). First description of OXA-48-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone ST131 from patients hospitalised at a military hospital in Algeria. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 33: 1641-1646.

Aggoune, N., Chabani, A., Tiouit, D., Naim, M., & Rahal, K. (2008). Premier cas d'*Enterococcus faecalis* résistant à la vancomycine en Algérie. *Médecine et maladies infectieuses*, 38(10):557-558.

Alioua, M.A. (2015) Les Staphylocoques: sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire de *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline. PhD Thesis. Université de Béjaia.

Altemeier, A.(1984) 'Definitions and classifications of surgical infections', *Manual on control of infection in surgical patients*, 1: 19–30.

Amatya, J., Rijal, M. and Baidya, R. (2015). 'Bacteriological study of the postoperative wound samples and antibiotic susceptibility pattern of the isolates in BB hospital', *JSM Microbiol*, 3(1):10-19.

Amazian, K., Rossello, J., Castella, A., Sekkat, S., Terzaki, S., Dhidah, L., Fabry, J. (2010). Prévalence des infections nosocomiales dans 27 hôpitaux de la région méditerranéenne. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 16(10).

Amenu, D., Belachew, T. and Araya, F. (2011) 'Surgical site infection rate and risk factors among obstetric cases of Jimma University Specialized Hospital, Southwest Ethiopia', *Ethiopian journal of health sciences*, 21(2):91–100.

Aminov, R.I. (2010). 'A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future', *Frontiers in microbiology*, 1:134.

Anderson, D. J., Sexton, D. J., & Post, T. (2016). Antimicrobial prophylaxis for prevention of surgical site infection in adults. *UpToDate, Harris a (Ed), UpToDate, Waltham, MA. Accessed on March, 25.*

Ango, P. D., Konan, K. D., Kouamé, K. A., Sai, S. S., Tchimou, A. Y., Adingra, S. C., Boua, N. (2020). Écologie Microbienne des Surfaces et Dispositifs Médicaux au Service de Réanimation du Centre Hospitalier et Universitaire (CHU) de Treichville. *HEALTH SCIENCES AND DISEASE*, 21(1).

Anguzu, J.R. and Olila, D. (2007). 'Drug sensitivity patterns of bacterial isolates from septic post-operative wounds in a regional referral hospital in Uganda', *African health sciences*, 7(3).

Arasu, M. V., Duraipandiyan, V., Agastian, P., & Ignacimuthu, S. (2008). Antimicrobial activity of *Streptomyces spp.* ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamil Nadu. *Journal de Mycologie Médicale*, 18(3):147-153.

Astagneau, P., Daniel, F., Parneix, P., Venier, AG., Malavaud, S, (2009). Reducing surgical site infection incidence through a network: results from the French ISO-RAISIN surveillance system', *J Hosp Infect*, 72(2):127–34.

Arasu, M. V., Duraipandiyan, V., Agastian, P., & Ignacimuthu, S. (2008). Antimicrobial activity of *Streptomyces spp.* ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamil Nadu. *Journal de Mycologie Médicale*, 18(3):147-153.

Authority, E.F.S., Prevention, E.C. for D., and Control. (2021). 'The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019', *EFSA Journal*, 19(4):06490.

Avril, J. L., Dabernat, H., Denis, F., & Monteil, H. (2000). *Bactériologie clinique*, 3: 557-559.

Avril, J. L., & Carlet, J. (1998). *Les infections nosocomiales et leur prévention*, 3:33-7.

Awadalla, S.G., Perkins, R.P. and Mercer, L.J. (1986) 'Significance of endometrial cultures performed at cesarean section.', *Obstetrics and gynecology*, 68(2): 220–225.

Belkaid R, Talhi R, Nait Djoudi K, Larinouna A, Nouri MT, Soukehal A, 2008. Surveillance épidémiologique des infections du site opératoire service d'ophtalmologie CHU de Béni Messous d'Alger en 2005 et 2006 XIXE congrès national de la SFHH - XIXES journées nationales SIIHHF - Paris - 5 et 6 juin 2008.

Belbel, Z., Chettibi, H., Dekhil, M., Ladjama, A., Nedjai, S., & Rolain, J. M. (2014). Outbreak of an armA methyltransferase-producing ST39 *Klebsiella pneumoniae* clone in a pediatric Algerian Hospital. *Microbial Drug Resistance*, 20(4): 310-315.

Benamrouche, N., Guettou, B., Henniche, F. Z., Assaous, F., Laouar, H., Ziane, H., Maamar, H. T. (2021). Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Algeria: phenotypic and genotypic characterization of clinical isolates. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 15(1): 95-101

Benmami S, Guerchani MK, Allam N, 2007. Résultats de la surveillance active sur le taux d'incidence des infections du site opératoire au CHU Mustapha, Alger, Algérie XVIIIe Congrès national de la SFHH - Strasbourg - 7 et 8 juin 2007.

Bezzaoucha A, Atif ML, Bouadda N, Azouaou A, Belouni R, 2007. CHU de Blida, Blida, Algérie - Incidence des infections du site opératoire dans un hôpital universitaire en Algérie : Résultats d'une enquête prospective de six mois dans un service de chirurgie XVIIIe Congrès national de la SFHH - Strasbourg - 7 et 8 juin 2007.

Binda, E., Marinelli, F. and Marcone, G.L. (2014) 'Old and new glycopeptide antibiotics: action and resistance', *Antibiotics*, 3(4): 572–594.

Birgand, G. (2014) Infections du site opératoire: approches originales du diagnostic et de la prévention. PhD Thesis. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.

Bjorgul, K., Novicoff, W.M. and Saleh, K.J. (2010) ‘American Society of Anesthesiologist Physical Status score may be used as a comorbidity index in hip fracture surgery’, *The Journal of arthroplasty*, 25(6): 134–137.

Black, J. D., de Haydu, C., Fan, L., & Sheth, S. S. (2014). Surgical site infections in gynecology. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 69(8): 501-510.

Bocoum, A. et al. (2020) ‘Les infections associées aux soins dans le département de gynécologie-obstétrique du centre hospitalier universitaire gabriel toure de bamako, MALI.’, *Mali Médical*, 35(1).

Bogdanović, G., Cerovac, A., Cerovac, E., Habek, D., Numanović, F., Bećirović, A., ... & Marinović, Ž. (2022). Bacterial causes and antibiotics susceptibility profile of surgical site infection following cesarean section. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology*, 49(4):90.

Boucher, S., Morel Saives, A. and Guitton, E. (2011) ‘Comparaison du pouvoir pathogène de deux souches de E. coli (sérotype O103 Rh+ et sérotype non O103) porteurs du gène «*ea*» après inoculation expérimentale chez le lapin EOPS’, Proc.: 14e Journées de la Recherche Cunicole, 22-23 November, 2011. Le Mans, France. 151, 154.

Boudjemaa, D. (2015). Etude multicentrique de la résistance aux antibiotiques chez *Enterobacter cloacae*. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l’Univers Département de Biologie: Université Abou Bekr Belkaid–Tlemcen.

Bouguenoun, W. (2017) Etude de la résistance aux antibiotiques des bactéries incriminées dans les infections nosocomiales et leur dissémination dans l’environnement hospitalier de la région de Guelma. PhD Thesis. Thèse de doctorat d’état, université Badji Mokhtar, Annaba, 170p.

Bourdillon, R.B. and Colebrook, L. (1946) 'Air hygiene in dressing-rooms for burns or major wounds.', *Lancet*, 561–5.

Braga, M. et al. (1999) 'Perioperative immunonutrition in patients undergoing cancer surgery: results of a randomized double-blind phase 3 trial', *Archives of Surgery*, 134(4): 428–433.

Brahimi, G. and belkaid, R. (2017) Impact de l'application de la procédure check-list sur l'incidence des infections du site opératoire chez les femmes césariées au service de gynécologie-obstétrique du chu de béni messous en 2014-2015. PhD Thesis. 271p.

Bratzler, D. W., Dellinger, E. P., Olsen, K. M., Perl, T. M., Auwaerter, P. G., Bolon, M. K., Weinstein, R. A. (2013). Clinical practice guidelines for antimicrobial prophylaxis in surgery. *Surgical infections*, 14(1): 73-156.

Brodrick, H. J., Raven, K. E., Harrison, E. M., Blane, B., Reuter, S., Török, M. E., Peacock, S. J. (2016). Whole-genome sequencing reveals transmission of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a healthcare network. *Genome medicine*, 8:1-9.

Buxeraud, J. and Faure, S. (2022) 'Les macrolides et apparentés', *Actualités Pharmaceutiques*, 61(618): 23–26.

Cantón, R. et al. (2008). 'Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe', *Clinical Microbiology and infection*, 14:144–153.

Carande-Kulis, V. (2012) 'Guidelines and Recommendations: A CDC Primer'.

Castanheira, M., Mendes, R. E., Rhomberg, P. R., & Jones, R. N. (2008). Rapid emergence of bla CTX-M among Enterobacteriaceae in US medical centers: molecular evaluation from the MYSTIC Program (2007). *Microbial Drug Resistance*, 14(3):211-216.

Cattoir, V. and Giard, J.-C. (2014) 'Antibiotic resistance in *Enterococcus faecium* clinical isolates', *Expert review of anti-infective therapy*, 12(2):239–248.

Cavallo, J.-D., Fabre, R., Jehl, F., Rapp, C., Garrabé, E. (2004) 'Bêtalactamines', *EMC-Maladies infectieuses*, 1(3):129–202.

Chabou, S., Leangapichart, T., Okdah, L., Le Page, S., Hadjadj, L. et Rolain, JM (2016). Test PCR quantitatif en temps réel avec la sonde Taqman® pour une détection rapide de la résistance à la colistine médiée par le plasmide MCR-1. *Nouveaux microbes et nouvelles infections*, 13:71-74.

Charnley J. (1973). Clean air symposium. I. Clean air in the operating room. *Cleve Clin Q*, 40(3):99-114.

Chen, L.F. and Kaye, D. (2011). 'Current use for old antibacterial agents: polymyxins, rifamycins, and aminoglycosides', *Medical Clinics*, 95(4): 819–842.

Cherak, Z., Bendjama, E., Moussi, A., Benbouza, A., Grainat, N., Rolain, J. M., & Loucif, L. (2022). First detection of vanA positive *Enterococcus faecium* clonal complex 17 in hospital wastewater in Algeria: an epidemiological report. *New Microbes and New Infections*, 47: 100977.

Cohen, P.R. (2007). 'Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections: a review of epidemiology, clinical features, management, and prevention', *International journal of dermatology*, 46(1): 1–11.

Control, C. for D. and Prevention (2012). 'Guidelines and Recommendations: A CDC Primer', Atlanta: Office of the Associate Director for Science Centers for Disease Control and Prevention

Courvalin, P. (2008). 'Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance', *Journal of internal medicine*, 264(1): 4–16.

Courvalin P., Leclercq (2012). in *Antibiogramme*. Eska, 2ième édition, Paris, 500.

Creanor, S., Barton, A. and Marchbank, A. (2012) 'Effectiveness of a gentamicin impregnated collagen sponge on reducing sternal wound infections following cardiac surgery: a meta-analysis of randomised controlled trials', *The Annals of The Royal College of Surgeons of England*, 94(4): 227–231.

Culver, D. (1991). 'Surgical wound infection rates by wound class, operative procedure, and patient risk index', *The American journal of medicine*, 91(3): S152–S157.

Cuzon G, Bentchouala C, Vogel A, Héry M, Lezzar A, Smati F, Dortet L, Naas T. (2015). First outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Constantine, Algeria. *Int J Antimicrob Agents*, 46(6):725-727.

Dali, A. (2015) Infections nosocomiales a bactéries multirésistantes (BMR) en réanimation adulte l'EHUO. Profilépidémiologique, facteurs de risque et facteurs pronostiques. PhD Thesis. Thèse de doctorat en sciences médicales. Université d'Oran. Algérie, 214p.

Darling, A.E., Mau, B. and Perna, N.T. (2009). 'Progressive Mauve: Multiple alignment of genomes with gene flux and rearrangement'[Preprint].

Davies, J. and Davies, D. (2010) 'Origins and evolution of antibiotic resistance', *Microbiology and molecular biology reviews*, 74(3): 417–433.

De Kraker, M. E., Davey, P. G. (2011). Mortality and hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus*.

Dechoux, C. (2007) Antibioprophylaxie et infections du site opératoire: applications et évaluation des mesures mises en place dans un hôpital de gynéco-obstétrique.UHP-Université Henri Poincaré. PhD Thesis 113p.

Dessalegn, L., Shimelis, T., Tadesse, E., & Gebre-selassie, S. (2014). Aerobic bacterial isolates from post-surgical wound and their antimicrobial susceptibility pattern: a hospital based cross-sectional study. *J Med Res*, 3(2): 18-23.

Deurenberg, R. H., Bathoorn, E., Chlebowicz, M. A., Couto, N., Ferdous, M., García-Cobos, S., Rossen, J. W. (2017). Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *Journal of biotechnology*, 243: 16-24

Devriese, L., Baele, M. and Butaye, P. (2006) 'The genus *Enterococcus*: taxonomy', *Prokaryotes*, 4: 163–174.

Dhote, N. and Nagdeo, N. (2018). 'Bacteriological profile of surgical site infection and associated risk factors in obstetrics and Gynecology patient', *Panacea Journal of Medical Sciences*, 8(2): 66–69.

Di Benedetto, C., Bruno, A. and Bernasconi, E. (2013). 'Infection du site chirurgical: facteurs de risqué, prévention, diagnostic et traitement', *Rev Med Suisse*, 9: 1832–39.

Elek, S.D. and Conen, P.E. (1957). 'The virulence of *Staphylococcus pyogenes* for man. A study of the problems of wound infection', *British journal of experimental pathology*, 38(6): 573.

Facklam, R.R., Carvalho, M. da G.S. and Teixeira, L.M. (2002) 'History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci', *The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*, 1–54.

Falcone, M., Carfagna, P., Cassone, M., Pistella, E., Pavoni, G., Nofroni, I., Venditti, M. (2002). Staphylococcus aureus sepsis in hospitalized non neutropenic patients: retrospective clinical and microbiological analysis. *Annali Italiani di Medicina Interna: Organo Ufficiale Della Societa Italiana di Medicina Interna*, 17(3): 166-172.

Ferraro, F., Piselli, P., Pittalis, S., Ruscitti, L. E., Cimaglia, C., Ippolito, G., Agresta, A. (2016). Surgical site infection after caesarean section. Space for post-discharge surveillance improvements and reliable comparisons. *New Microbiologica*, 39(2): 134-138

Fouedjio, J. H., Mbongo, J. A., Kamdem, T. A., Meka, E. J., Fouelifack, Y. F., Nkwabong, E., & Tebeu, J. M. (2021). Facteurs Associés aux Infections du Site Opératoire après Césarienne

à Yaoundé.: Infections du site opératoire après césarienne. *HEALTH SCIENCES AND DISEASE*, 22(10).

Fournel, L. (2017). 'Les infections du site opératoire', *Revue francophone de cicatrisation*, 1(2): 27–30.

Fraimow, H.S. (1994). 'Urinary Tract Infection with an *Enterococcus faecalis* Isolate that Requires Vancomycin for Growth', *Annals of Internal Medicine*, 121(1): 22.

Frappier, A., Sonea, S. and Panisset, M. (1955) 'Le pouvoir pathogène des staphylocoques: I-étude comparative de 40 souches à l'aide de quatre méthodes d'infection expérimentale', *Revue canadienne de biologie*, 14(2): 152–172.

Freitas, A.R. et al. (2016). 'Multilevel population genetic analysis of *vanA* and *vanB* *Enterococcus faecium* causing nosocomial outbreaks in 27 countries (1986–2012)', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(12): 3351–3366.

Freney, J. et al. (2007). 'Précis de bactériologie clinique', in *Précis de bactériologie clinique*, 1779–1779.

Frenod, E. (2006) 'Existence result for a model of *Proteus mirabilis* swarm', 697-720.

Friedman, N.D., Temkin, E. and Carmeli, Y. (2016). 'The negative impact of antibiotic resistance', *Clinical Microbiology and Infection*, 22(5): 416–422.

Gadou, V. (2019). Epidémiologie moléculaire des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi résistantes aux aminosides et aux fluoroquinolones dans le district d'Abidjan, Côte d'Ivoire. PhD Thesis. Université Félix Houphouët-Boigny (Abidjan, Côte d'Ivoire); N° ORDRE 2186/2019.

Garnacho-Montero, J. and Amaya-Villar, R. (2010). 'Multiresistant *Acinetobacter baumannii* infections: epidemiology and management', *Current opinion in infectious diseases*, 23(4): 332–339.

- Garrity, G. (2007) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. Springer Science & Business Media. Volume 2.*
- Gastmeier, P. (2006) 'Postdischarge surveillance for surgical site infection: the continuing challenge', *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 27(12): 1287–1290.
- Giacometti, A., Cirioni, O., Schimizzi, A. M., Del Prete, M. S., Barchiesi, F., D'Errico, M., Scalise, G. (2000). Epidemiology and microbiology of surgical wound infections. *Journal of clinical microbiology*, 38(2): 918-922.
- Gibbons, L., Belizán, J. M., Lauer, J. A., Betrán, A. P., Merialdi, M., & Althabe, F. (2010). The global numbers and costs of additionally needed and unnecessary caesarean sections performed per year: overuse as a barrier to universal coverage. *World health report*, 30(1): 1-31.
- Gilmore, M. S., Clewell, D. B., Ike, Y., & Shankar, N. (2014). *Enterococci: From commensals to leading causes of drug resistant infection* [Internet].
- Gomaa, K., Abdelraheim, A. R., El Gelany, S., Khalifa, E. M., Yousef, A. M., & Hassan, H. (2021). Incidence, risk factors and management of post cesarean section surgical site infection (SSI) in a tertiary hospital in Egypt: a five year retrospective study. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 21:1-9.
- Goossens, H., Ferech, M., Vander Stichele, R., & Elseviers, M. (2005). Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *The Lancet*, 365(9459): 579-587.
- Gorrie, C., Higgs, C., Carter, G., Stinear, T. P., & Howden, B. (2019). Genomics of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Microbial genomics*, 5(7): e000283
- Grady, R. and Hayes, F. (2003). 'Axe–Txe, a broad-spectrum proteic toxin–antitoxin system specified by a multidrug-resistant, clinical isolate of *Enterococcus faecium*', *Molecular microbiology*, 47(5):1419–1432.

Grant, J.R. et al. (2023). 'Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes', *Nucleic Acids Research*, 326.

Gribi, K. (2016). Isolement et caractérisation de bactéries pathogènes nosocomiales dans deux milieux hospitaliers Chlef et Batna. Université de Chlef. PhD Thesis.

Griffiths, S.M. et al. (2016). 'A Galaxy-based bioinformatics pipeline for optimised, streamlined microsatellite development from Illumina next-generation sequencing data', *Conservation Genetics Resources*, 8: 481–486.

Guetarni, N. (2014). Les Infections du Site Opératoire au CHU d'Oran. PhD Thesis. Thèse de Médecine Oran.

Gupta, S., Manchanda, V., Sachdev, P., Saini, R. K., & Joy, M. (2021). Study of incidence and risk factors of surgical site infections in lower segment caesarean section cases of tertiary care hospital of north India. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 39(1): 1-5.

Gupta, S. K., Padmanabhan, B. R., Diene, S. M., Lopez-Rojas, R., Kempf, M., Landraud, L., & Rolain, J. M. (2014). ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(1): 212-220.

Hammami, S., Boubaker, I. B. B., Saidani, M., Lakhal, E., Hassen, A. B., Kamoun, A., ... & Redjeb, S. B. (2012). Characterization and molecular epidemiology of extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacter cloacae* isolated from a Tunisian hospital. *Microbial Drug Resistance*, 18(1): 59-65.

Hamza, R. (2010). 'Epidemiologie des infections associees aux soins healthcare associated infections epidemiology', *Revue Tunisienne d'Infectiologie-Janvier*, 4: 1–4.

Hart, C.A. (2006) 'Klebsiella, citrobacter, enterobacter and serratia spp', *Principles and practice of Clinical Bacteriology*, 377–386.

- Hartmann, M. (2005). 'La vision célinienne de l'Histoire dans Semmelweis', *Études céliniennes*, (1): 59–67.
- He, L. X., Pan, J., Chen, S. Y., Wang, A. X., Xie, C. M., & Shen, Z. Y. (2005). Clinical study of teicoplanin in the treatment of patients with Gram-positive cocci: the Chinese experience. *Zhonghua nei ke za zhi*, 44(5): 337-341
- Hope, D., Ampaire, L., Oyet, C., Muwanguzi, E., Twizerimana, H., & Apecu, R. O. (2019). Antimicrobial resistance in pathogenic aerobic bacteria causing surgical site infections in Mbarara regional referral hospital, Southwestern Uganda. *Scientific reports*, 9(1): 17299.
- Horan, T.C., Andrus, M. and Dudeck, M.A. (2008) 'CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting', *American journal of infection control*, 36(5): 309–332.
- Hosmer, D.W. and Lemeshow, S. (1980). 'Goodness of fit tests for the multiple logistic regression model', *Communications in statistics-Theory and Methods*, 9(10): 1043–1069.
- Hsieh, Y. C., Lee, W. S., Ou, T. Y., & Hsueh, P. R. (2010). Clonal spread of CC17 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with multilocus sequence type 78 (ST78) and a novel ST444 in Taiwan. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 29: 25-30
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2006). The Family Enterobacteriaceae. *Practical Handbook of*, 217.
- Joly, B. and Reynaud, A. (2003). Entérobactéries: systématique et méthodes de diagnostic. Éd. Tec & Doc.
- Kaye, K.S. and Pogue, J.M. (2015) 'Infections Caused by Resistant Gram-Negative Bacteria: Epidemiology and Management', *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 35(10): 949–962.

Keller, R., Pedroso, M. Z., Ritchmann, R., & Silva, R. M. (1998). Occurrence of virulence-associated properties in *Enterobacter cloacae*. *Infection and immunity*, 66(2): 645-649.

Khenouchi, N. C. E. H., Loucif, L., Boutefnouchet, N., Allag, H., & Rolain, J. M. (2015). MALDI-TOF MS as a tool to detect a nosocomial outbreak of extended-spectrum- β -lactamase-and ArmA methyltransferase-producing *Enterobacter cloacae* clinical isolates in Algeria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(10): 6477-6483.

Kitzis, M. and Andreassian, B. (1993). Risques infectieux en chirurgie. Ellipses.

Klebsiella, M., Serratia, S. and Cedecea, E. (2016). 'Chapitre 30. Bacilles à Gram négatif aérobies et aéro-anaérobies 303', *Bactériologie médicale: Techniques usuelles*, 302.

Klein, G. (2003) 'Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of *Enterococci* from food and the gastro-intestinal tract', *International journal of food microbiology*, 88(2-3): 123-131.

Kos, V.N. et al. (2012) 'Comparative genomics of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and their positions within the clade most commonly associated with Methicillin-resistant *S. aureus* hospital-acquired infection in the United States', *MBio*, 3(3): 10-1128.

Krieger, Y., Walfisch, A. and Sheiner, E. (2017) 'Surgical site infection following cesarean deliveries: trends and risk factors', *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 30(1):8-12.

Labandeira-Rey, M. et al. (2007). '*Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia', *Science*, 315(5815): 1130-1133.

Lake, A. G., McPencow, A. M., Dick-Biascoechea, M. A., Martin, D. K., & Erekson, E. A. (2013). Surgical site infection after hysterectomy. *American journal of obstetrics and gynecology*, 209(5), 490-e1.

- Larouche, G. (2001) 'Les quinolones: des années soixante à aujourd'hui', *Pharmactuel*, 34(2).
- Le Loir, Y., Baron, F. and Gautier, M. (2003). 'Staphylococcus aureus and food poisoning.', *Genetics and molecular research: GMR*, 2(1): 63–76.
- Le Minor, L. and Richard, C. (1993) Laboratory methods for the identification of enterobacteria. Institut Pasteur.
- Lee, I.K. and Liu, J.-W. (2006). 'Clinical characteristics and risk factors for mortality in Morganella morganii bacteremia.', *Journal of microbiology, immunology, and infection*, 39(4): 328–334.
- Lilani, S.P. et al. (2005). 'Surgical site infection in clean and clean-contaminated cases', *Indian journal of medical microbiology*, 23(4): 249–252.
- Lockhart, S.R. et al. (2007). 'Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004', *Journal of clinical microbiology*, 45(10): 3352–3359.
- Lorenz, T.C. (2012) 'Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies', *Journal of Visualized Experiments*, (63): 3998.
- Loucif, L., Kassah-Laouar, A., Saidi, M., Messala, A., Chelaghma, W., & Rolain, J. M. (2016). Outbreak of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* involving a sequence type 101 clone in Batna University Hospital, Algeria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(12): 7494-7497.
- Loucif, L., Chelaghma, W., Bendjama, E., Cherak, Z., Khellaf, M., Khemri, A., & Rolain, J. M. (2022). Detection of bla OXA-48 and mcr-1 Genes in Escherichia coli Isolates from Pigeon (*Columba livia*) in Algeria. *Microorganisms*, 10(5):975.
- Lucet, J.-C. and Birgand, G. (2011). 'Les bacilles à Gram négatif multi-résistants: où va-t-on?', *Journal des Anti-infectieux*, 13(2): 122–132.

Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML, Silver LC, Jarvis WR. Guideline for prevention of surgical site infection, (1999). Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 20(4):250-78.

Mathlouthi, N., Al-Bayssari, C., Bakour, S., Rolain, J. M., & Chouchani, C. (2017). Retracted Article: Prevalence and emergence of carbapenemases-producing Gram-negative bacteria in Mediterranean basin. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(1):43-61.

Mellouk, F. Z., Bakour, S., Meradji, S., Al-Bayssari, C., Bentakouk, M. C., Zouyed, F., Rolain, J. M. (2017). First detection of VIM-4-producing *Pseudomonas aeruginosa* and OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in Northeastern (Annaba, Skikda) Algeria. *Microbial Drug Resistance*, 23(3): 335-344.

Mengesha, R. E., Kasa, B. G. S., Saravanan, M., Berhe, D. F., & Wasihun, A. G. (2014). Aerobic bacteria in post surgical wound infections and pattern of their antimicrobial susceptibility in Ayder Teaching and Referral Hospital, Mekelle, Ethiopia. *BMC research notes*, 7:1-6.

Merzougui, L., Marwen, N., Hannachi, H., Asma, M., Elhaj, O. B., Waddah, M., & Fatnassi, R. (2018). Incidence et facteurs de risque de l'infection du site opératoire après césarienne dans une maternité de Tunisie. *Santé publique*, 30(3): 339-347.

Messaoudi, A. Wejdène Mansour, Nedja Jaidane, Chrifa Chaouch, Nouredine Boujaâfar, Olfa Bouallègue. (2019). 'Epidemiology of resistance and phenotypic characterization of carbapenem resistance mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* isolates at Sahloul University Hospital-Sousse, Tunisia', *African Health Sciences*, 19(2): 2008–2020.

Meyer, M. and Kircher, M. (2010). 'Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing', *Cold Spring Harbor Protocols*, (6): 5448.

'Microbiologie generale', Hayette, M.P,(2012), Microbiologie générale et clinique, France: ERPI, Editions du Renouveau Pédagogique Inc. BROCK BIOLOGY, 62pg.

Miliotis, M.D. and Bier, J.W. (2003). International handbook of foodborne pathogens. CRC Press.

Mingeot-Leclercq, M.-P., Glupczynski, Y. and Tulkens, P.M. (1999). 'Aminoglycosides: activity and resistance', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(4): 727–737.

Morgan, D. M., Swenson, C. W., Streifel, K. M., Kamdar, N. S., Uppal, S., Burgunder-Zdravkovski, L., Campbell, D. A. (2016). Surgical site infection following hysterectomy: adjusted rankings in a regional collaborative. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 214(2): 259-e1.

Moussa, N. and Moussaoui, F.Z. (2016). Recherche des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi dans les viandes de volaille. PhD Thesis. Université laarbi tebessi tebessa.

Mpogoro, F.J. et al. (2014). 'Incidence and predictors of surgical site infections following caesarean sections at Bugando Medical Centre, Mwanza, Tanzania', *Antimicrobial resistance and infection control*, 3: 1–10.

El ayne Nabila, S., Adil, E., Abedelaziz, C., Nabila, A., Samir, H., & Abdelmajid, S. (2014). Role de l'environnement hospitalier dans la prevention des infections nosocomiales: surveillance de la flore des surfaces a l'hopital el idrissi de kenitra-Maroc. *European Scientific Journal*, 10(9).

NDIAYE, M., SARR, A., THIAM, A., DIAW, E., SINE, B., HAIBA, S. (2020). Infection du site opératoire en urologie, *journal el hakim*, 32(5):57-62.

Ngah, J.E., Bénet, T. and Djibrilla, Y. (2016). 'Incidence of surgical site infections in sub-Saharan Africa: systematic review and meta-analysis', *The Pan African medical journal*, 24: 171–171.

Ngaroua, N., Ngah, J. E., Bénet, T., & Djibrilla, Y. (2016). Incidence des infections du site opératoire en Afrique sub-saharienne: revue systématique et méta-analyse. *Pan African Medical Journal*, 24(1).

Nkondjock, A. and Ghadirian, P. (2005) 'Facteurs de risque du cancer du sein', *médecine/sciences*, 21(2), pp. 175–180.

Nordmann, P. (2010). 'Résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif', *médecine/sciences*, 26(11): 950–959.

Nordman P, Poirel L (2014). Résistances aux antibiotiques émergentes et importantes chez les bactéries Gram négatif : épidémiologie, aspects théoriques et détection. *Rev Med Suisse*, (10): 902-7

Novick, R.P. and Subedi, A. (2007). 'The SaPIs: mobile pathogenicity islands of *Staphylococcus*', *Superantigens and Superallergens*, (93): 42–57.

Ogston, A. (1881). 'Report upon micro-organisms in surgical diseases', *British medical journal*, 1(1054): 369-b2.

O'Hara, C.M., Brenner, F.W. and Miller, J.M. (2000). 'Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*', *Clinical microbiology reviews*, 13(4): 534–546.

Olsen, M. A., Butler, A. M., Willers, D. M., Devkota, P., Gross, G. A., & Fraser, V. J. (2008). Risk factors for surgical site infection after low transverse cesarean section. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 29(6): 477-484.

Opatowski, M. (2020). Résistance bactérienne aux antibiotiques, apport du système national des données de santé. PhD Thesis. Université Paris-Saclay.

Organization, W.H. (2015). 'Global action plan on antimicrobial resistance'.

Organization, W.H. (2016). Global guidelines for the prevention of surgical site infection.

Ouedraogo, W.P. (2020). Détection de la résistance à la vancomycine par mise en évidence d'une activité D-Ala-D-Ala dipeptidase. PhD Thesis. Normandie Université.

Pathak, A., Mahadik, K., Swami, M. B., Roy, P. K., Sharma, M., Mahadik, V. K., & Lundborg, C. S. (2017). Incidence and risk factors for surgical site infections in obstetric and gynecological surgeries from a teaching hospital in rural India. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, (6): 1-8.

Pear, S.M. (2007). 'Patient risk factors and best practices for surgical site infection prevention', *Manag Infect Control*, 56: 1–3.

Pinchon, T.M., Emerique, P. and Demange, C. (1993). 'Consommation d'antibiotiques et profils de sensibilité de quelques micro-organismes dans un centre hospitalier général', *Médecine et maladies infectieuses*, 23(5): 360–366.

Pittet, D., Simon, A., Hugonnet, S., Pessoa-Silva, C. L., Sauvan, V., & Perneger, T. V. (2004). Hand hygiene among physicians: performance, beliefs, and perceptions. *Annals of internal medicine*, 141(1): 1-8.

Poitras, E. and Houde, A. (2002) 'La PCR en temps réel: principes et applications', *Reviews in biology and biotechnology*, 2(2): 2–11.

Porter, M. (2021). '*Enterococcus faecalis*: caractéristiques, morphologie, pathogénèse'.

Poza M, Gayoso C, Gómez MJ, Rumbo-Feal S, Tomás M, Aranda J, Fernández A, Bou G. (2012). Exploring bacterial diversity in hospital environments by GS-FLX Titanium pyrosequencing. *PLoS One*.;7(8):44105.

Ramdani-Bouguessa, N., Manageiro, V., Jones-Dias, D., Ferreira, E., Tazir, M., & Caniça, M. (2011). Role of SHV β -lactamase variants in resistance of clinical *Klebsiella pneumoniae* strains to β -lactams in an Algerian hospital. *Journal of medical microbiology*, 60(7): 983-987.

Rmoul A, (2014). Sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire des bactéries responsables d'infections respiratoires basses. Université Badji Mokhtar Annaba. PhD Thesis 157p.

Rayane, B. and Elhouda, B.N. (2022). 'Isolement et Identification d'*Enterobacter sp.* et l'étude de la résistance aux antibiotiques'. Université Constantine 1. PhD thesis, 104p.

Raza, T., Ullah, S. R., Mehmood, K., & Andleeb, S. (2018). Vancomycin resistant *Enterococci*: A brief review. *J Pak Med Assoc*, 68(5): 768-772.

Reuter, S., Ellington, M. J., Cartwright, E. J., Köser, C. U., Török, M. E., Gouliouris, T., Peacock, S. J. (2013). Rapid bacterial whole-genome sequencing to enhance diagnostic and public health microbiology. *JAMA internal medicine*, 173(15): 1397-1404.

Rice, J.M. (2019) 'Immunosuppression', Tumour Site Concordance and Mechanisms of Carcinogenesis [Preprint].

Ritter, M.A. and Campbell, E.D. (1988). 'Retrospective evaluation of an iodophor-incorporated antimicrobial plastic adhesive wound drape.', *Clinical orthopaedics and related research*, (228): 307–308.

Rosenthal, V. D., Richtmann, R., Singh, S., Apisarnthanarak, A., Kübler, A., Viet-Hung, N., International Nosocomial Infection Control Consortium. (2013). Surgical site infections, International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 30 countries, 2005–2010. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 34(6): 597-604.

Rosvoll, T. C., Pedersen, T., Sletvold, H., Johnsen, P. J., Sollid, J. E., Simonsen, G. S., Sundsfjord, A. (2010). PCR-based plasmid typing in *Enterococcus faecium* strains reveals widely distributed pRE25-, pRUM-, pIP501-and pHT β -related replicons associated with glycopeptide resistance and stabilizing toxin–antitoxin systems. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 58(2): 254-268.

Sara, M. (2020). 'Épidémiologie et résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées d'infections urinaires en milieu hospitalier (HMRUC)'.

Sarkozy, G. (2001). 'Quinolones: a class of antimicrobial agents', *Veterinarni medicina-praha*, 46(9/10): 257–274.

Sassi, A., Loucif, L., Gupta, SK, Dekhil, M., Chettibi, H. et Rolain, JM (2014). Gène codant pour la carbapénémase NDM-5 dans des isolats cliniques multirésistants d'*Escherichia coli* d'Algérie. *Agents antimicrobiens et chimiothérapie*, 58 (9):5606-5608.

Saunders, L., Perennec-Olivier, M., Jarno, P., L'Hériteau, F., Venier, A. G., Simon, L., RAISIN group. (2014). Improving prediction of surgical site infection risk with multilevel modeling. *PloS one*, 9(5): 95295.

Sava, I.G., Heikens, E. and Huebner, J. (2010) 'Pathogenesis and immunity in *Enterococcal* infections', *Clinical microbiology and infection*, 16(6): 533–540.

Seng, P., Rolain, J. M., Fournier, P. E., La Scola, B., Drancourt, M., & Raoult, D. (2010). MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future microbiology*, 5(11): 1733-1754.

Sergent, A. P., Slekovec, C., Pauchot, J., Jeunet, L., Bertrand, X., Hocquet, D., Talon, D. (2012). Contamination bactérienne de l'environnement hospitalier lors du changement de pansements des plaies chroniques. *Revue de chirurgie orthopédique et traumatologique*, 98(4): 393-398.

Shagun, P.M. and Chaitra, S. (2020). 'A study of microbiological analysis and its sensitivity pattern of postoperative wound infections in obstetrics and gynecology department: retrospective study in tertiary institute in Mangalore, Karnataka, India.', *International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology*, 9(5): 1784–1788.

Shree, R., Park, S. Y., Beigi, R. H., Dunn, S. L., & Krans, E. E. (2016). Surgical site infection following cesarean delivery: patient, provider, and procedure-specific risk factors. *American journal of perinatology*, 33(2): 157-164.

Sievert, D. M., Ricks, P., Edwards, J. R., Schneider, A., Patel, J., Srinivasan, A., ... & Fridkin, S. (2013). Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 34(1): 1-14.

Sivertsen, A., Billström, H., Melefors, Ö., Liljequist, B. O., Wisell, K. T., Ullberg, M., Hegstad, K. (2014). A multicentre hospital outbreak in Sweden caused by introduction of a vanB2 transposon into a stably maintained pRUM-plasmid in an *Enterococcus faecium* ST192 clone. *PLoS One*, 9(8): 103274.

Strickertsson, J. A., Desler, C., Martin-Bertelsen, T., Machado, A. M. D., Wadstrøm, T., Winther, O. Friis-Hansen, L. (2013). *Enterococcus faecalis* infection causes inflammation, intracellular oxphos-independent ROS production, and DNA damage in human gastric cancer cells. *PloS one*, 8(4): 63147.

Sun, L. et al. (2020). ‘Emergence of vanA-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* ST 78 strain with a rep2-type plasmid carrying a Tn1546-like element isolated from a urinary tract infection in China’, *Infection and drug resistance*, 949–955.

Sweet, R. L., & Gibbs, R. S. (2012). *Infectious diseases of the female genital tract. Lippincott Williams & Wilkins.*

Tani, Z.B.A.-K. and Arlet, G. (2014). ‘Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie’, *Pathologie Biologie*, 62(3): 169–178.

Tarfani Y, Makhlouf F, Ferrah F-Z, Djoudi F-Z. Tendances évolutives des infections du site opératoire (ISO) dans 7 services de chirurgie du CHU de Bab El Oued D’Alger Algérie XVIe Congrès national de la SFHH REIMS 02 et 03 juin 2005.

Tartari, E. and Mamo, J. (2011). ‘Pre-educational intervention survey of healthcare practitioners’ compliance with infection prevention measures in cardiothoracic surgery: low compliance but internationally comparable surgical site infection rate’, *Journal of Hospital Infection*, 77(4): 348–351.

Tayeb M R, Zemmallache Meghni A, Nemiche I, Bouklikha M, Amiri F, Benahmed N, 2010. Les infections nosocomiales du site opératoire Service de Maternité EHS de Tlemcen.

Tjade, O.H. and Gabor, I. (1980) 'Evaluation of airborne operating room bacteria with a Biap slit sampler', *Epidemiology & Infection*, 84(1): 37–40.

Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, M. J., Cucarella, C., Lamata, M., Lasa, I. (2001). The *enterococcal* surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Applied and environmental microbiology*, 67(10): 4538-4545.

Touati, A., Benallaoua, S., Forte, D., Madoux, J., Brasme, L., & De Champs, C. (2006). First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Béjaia, Algeria. *International journal of antimicrobial agents*, 27(5): 397-402.

Tran, T. S., Jamulitrat, S., Chongsuvivatvong, V., & Geater, A. (1998). Postoperative hospital-acquired infection in Hungvuong obstetric and Gynaecological hospital, Vietnam. *Journal of Hospital Infection*, 40(2): 141-147.

Trépout, S. (2008) Etude de l'assemblage du système d'efflux membranaire MexAB-OprM impliqué dans la résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa*: caractérisation combinée par Microbalance à cristal de quartz avec mesure de dissipation et cryo-tomographie électronique. PhD Thesis. Bordeaux 1.

Trivin, F. and Le Bricon, T. (2003). 'Nouvelles techniques d'électrophorèse : applications aux protéines et à l'ADN', *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 18(1): pp. 11–22.

Vakulenko, S.B. and Mobashery, S. (2003). 'Versatility of aminoglycosides and prospects for their future', *Clinical microbiology reviews*, 16(3): 430–450.

Van Boeckel, T. P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B. T., Levin, S. A., & Laxminarayan, R. (2014). Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet infectious diseases*, 14(8): 742-750.

Van Duijn, P.J., Dautzenberg, M.J. and Oostdijk, E.A. (2011). 'Recent trends in antibiotic resistance in European ICUs', *Current opinion in critical care*, 17(6): 658–665.

Volke, D.C., Calero, P. and Nikel, P.I. (2020). '*Pseudomonas putida*', *Trends in Microbiology*, 28(16): 512–513.

Waglechner, N. and Wright, G.D. (2017) 'Antibiotic resistance: it's bad, but why isn't it worse?', *BMC biology*, 15(1): 1–8.

Waldvogel, F. A., Vaudaux, P. E., Pittet, D., & Lew, P. D. (1991). Perioperative antibiotic prophylaxis of wound and foreign body infections: microbial factors affecting efficacy. *Reviews of infectious diseases*, 13: 782-S789.

Walsh, C. (2003). Antibiotics: actions, origins, resistance. *American Society for Microbiology* (ASM).

Wardal, E., Kuch, A., Gawryszewska, I., Żabicka, D., Hryniewicz, W., & Sadowy, E. (2017). Diversity of plasmids and Tn 1546-type transposons among *VanA Enterococcus faecium* in Poland. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 36: 313-328.

Witchitz, J.L. (1978). 'Aminosides: Mode d'action et mecanisme de resistance'.

Yoshimura, Y., Kubo, S., Hirohashi, K., Ogawa, M., Morimoto, K., Shirata, K., & Kinoshita, H. (2003). Plastic Iodophor Drape during Liver Surgery Operative Use of the Iodophor-impregnated Adhesive Drape to Prevent Wound Infection during High Risk Surgery. *World journal of surgery*, 27: 685-688.

Zalipour, M., Esfahani, B.N. and Havaei, S.A. (2019). 'Phenotypic and genotypic characterization of glycopeptide, aminoglycoside and macrolide resistance among clinical isolates of *Enterococcus faecalis*: a multicenter based study', *BMC*, 12(1): 292.

Zejnnullahu, V. A., Isjanovska, R., Sejfiija, Z., & Zejnnullahu, V. A. (2019). Surgical site infections after cesarean sections at the University Clinical Center of Kosovo: rates, microbiological profile and risk factors. *BMC infectious diseases*, (19): 1-9.

Zerouki, A., Abada, S., Tali-Maamar, H., Rahal, K., & Naim, M. (2015). Caractérisation des infections du site opératoire à *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline en chirurgie orthopédique et traumatologique dans un hôpital algérien. *Revue de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique*, 101(2): 176-180.

Zerrouki, M. (2020): 'Les infections à *Proteus-Morganella-Providencia* (PMP)'

Les références web:

Web 1 : Antimicrobial prophylaxis for prevention of surgical site infection in adults. Consulter le 25/03/2023 : <https://medilib.ir/uptodate/show/4043>

Web 2 : BioMérieux France, 2016. Galeries d'identification API. Consulter le 20/06/2022: <https://www.biomerieux.fr/diagnostic-clinique/galeries-didentification-api>.

Web 3 : Kahlmeter, G et al. (2019) ' European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Technical Notes on antimicrobial susceptibility testing, CASFM2019. Consulté le 29/09/2022: <https://www.sfm-microbiologie.org/2021/04/23/casfm-avril-2021-v1-0>.

Web 4 : Prévention de la résistance aux antibiotiques : une démarche « une seule santé ». Novembre 2023. France. Disponible sur <https://anses.hal.science/anses-04453507v1/document> (consulter le 17/12/2021).

Web 5 : Réseau Algérien de surveillance de la résistance aux antibiotiques-rapport (AARN) (2020). Pasteurdz. Consulté le 12/06/2023: <https://www.aarn.pasteur.dz/images/pdf/rapport/rapport>.

Web 6 : Stockholm, 2017. Surveillance des infections du site opératoire et indicateurs de prévention dans les hôpitaux européens - Protocole HAISSI. Consulté le 14/08/2023: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-surgical-site-infections-and-prevention-indicators-european>.

Annexes

Annexes 1

Fiche d'enquête Étude bactériologique des infections du site opératoire

Numéro d'enregistrement :

IDENTIFICATION DE LA PATIENTE

Date et heure d'entrée : date de sortie :

Nom : Prénom : Age :

- Profession de la femme: -Profession du mari :

-Niveau d'instruction : Aucun -Primaire -Moyen -Secondaire -Universitaire

Provenance : Maison Cabinet privé Centre de santé de référence -autre à préciser
.....

Résidence :- TEL :

Statut Matrimonial : mariée célibataire divorcée veuve

-Niveau socioéconomique : Bas Moyen Elevé

ANTECEDENTS

Médicaux : anémie - HTA - Drépanocytaire - Diabète - Infection urinaire - Autres à préciser :

Chirurgicaux : si oui , ATCDS d'infection post opératoire

Gynécologiques : a- leucorrhée pathologique b- prurit c- dyspareunie d- autres à préciser :

Obstétricaux : Gestite : Parité : -Nombre d'avortement/...../

Nombre d'enfants vivants/...../ -Nombre d'enfants décédés/...../

Circonstance de l' intervention chirurgicale

Type d'intervention : Date de l'intervention

Motif d'intervention

Condition césarienne : a- programmée b- urgence

Type d'opérateur : **Résident** : - R3 -R4 - R5 - **Assistant** :

Type d'anesthésie : Générale -Locorégionale

Durée de l'intervention **Heure de l'intervention**

Jour de l'intervention : jour de semaine week end

Préparation de la patiente : toilette abdominale avant l'intervention - douche à domicile le jour de l'intervention. - Dépilation

Antibioprophylaxie peropératoire : Oui /non - **type** :

Antibioprophylaxie post opératoire : a- amoxicilline b- gentamycine

c- ceftriaxone d- metronidazole e- autres :

Drainage : - Oui - Non

Qualité de l'hémostase : bonne - difficile - mise en place de matériel étranger :

Durée de l'intervention :

Classe de contamination d'altmeier : **-Score ASA** :

Durée du séjour hospitalier :

Condition d'accouchement par voie base : - programmée - urgence

RPM : - Oui Non -Nbre de toucher : **Durée du travail** :.....

Age de la grossesse :- à terme - prématurée

Durée d'hospitalisation (nombre de jour) :

Autres :

Diagnostic de l'infection

Site de l'infection :.....

Délai entre l'acte chirurgical et le début d'infection :

Infection intra-hospitalière :.....

-Infection extrahospitalière :

Facteurs de risques liés à l'infection : a- source endogène b- source exogène

Les complications infectieuses bactériennes : a- endométrite b- suppuration pariétale c- pelvis péritonite d- endométrite plus suppuration pariétale - pelvis péritonite plus endométrite

Infection après chirurgie du sein notion de chimiothérapie : - oui - non

Autres site d'infection à préciser :

Signes cliniques :

a- température :

b- Lochies : b-1 : hémorragique b-2 : serohématiques b-3 : séreuses

b-4 : fétides

c- Utérus : c-1 : mauvaise involution utérine c-2 : douloureux à la mobilisation

c-3 : col béant au toucher vaginal

d- plaie opératoire : d-1 : écoulement purulent d-2 : lâchage de la paroi d-3 : éviscération

Germes isolés : a- bacille a gram négatif : a-1 : *E coli* a-2 : *Proteus mirabilis*

a-3 : *Proteus vulgaris* a-4 : autres à préciser

b- cocci a gram positif : b-1 : *Staphylococcus aureus* b-2 : *Streptococcusagalactiae*

b-3 : autres à préciser :

Résultats

Traitement :

Reprise chirurgicale oui/non - délai : -type : -suture de la paroi - suture de l'éviscération

Antibiothérapie oui/non type :

Synthocinone

Autres TRT :

Soins post opératoire :

a- rythme des pansements : a-1 : quotidien a-2 : biquotidien a-3 : un sur deux

b- type de pansement : pansement simple - autre :

Les produits utilisés lors des pansements :

a- Bétadine b- eau oxygénée e- autres a précisé:

Evolution favorable - **défavorable**

Analyses Microbiologiques

e

Type du prélèvement :

Examen microscopique : a- état frais b- coloration de Gram

Examen macroscopique : a- milieux solide

a1- gélose nutritive a2- gélose au sang a3- milieu Mac conkey

a4- milieu Chapman a5- gélose au cétrimide a6- gélose SS

b- milieu liquide

Identification biochimique : a- test oxydase b- test catalase c- galeries miniaturisés

c1- API 20E c2- API 20NE c3- API STAPH c4- API STREP c5- API CANDIDA

Souches bactérienne isolées :

Antibiogramme :

Analyses biologiques

e

Numération formule sanguine : GB.....

Groupage sanguin : A+ A- B+ B- O+ O- AB+ AB-

Bilan de coagulation : a- TP b- TCA

Dosage de la créatinine :

Protéine C réactive :

Annexes 2

Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api 20E (BioMérieux)

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	Ortho-nitro-phenylgalactosidase	Beta-galactosidase	Incolore	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orangé
LDC	Lysine	Lysine decarboxylase	Jaune	Orangé
ODC	Ornithine	Ornithine decarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
CIT	Citrate de sodium	Utilisation du citrate	Vert	Bleu-vert/vert
H2S	Thiosulfate de sodium	Production d'H2S	Incolore/gris	Dépôt noire/fin
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA Immédiat Jaune Marronfoncé	
IND	Tryptophane	Production d'indole	IND/2min, max Jaune anneauorange	
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoine	VP1+VP2 / 10min Incolore rosé-rouge	
GEL	Gélatine de kohn	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noire
GLU	Glucose	Fermentation/oxydation	Bleu	Jaune
MAN	Mannitol	Fermentation/oxydation	Bleu	Jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxydation	Bleu	Jaune
SOR	Sorbitol	Fermentation/oxydation	Bleu	Jaune
RHA	Rhamnose	Fermentation/oxydation	Bleu	Jaune
SAC	Saccharose	Fermentation/oxydation	Bleu	Jaune
MEL	Melibiose	Fermentation/oxydation	Bleu	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/oxydation	Bleu	Jaune
ARA	Arabinose	Fermentation/oxydation	Bleu	Jaune
Ox	Sur papier filtre	Cytochrome-oxydase	OX / 5-10 min Incolore Anneauviolet	

Tableau de lecture de l'API 20 NE (BioMérieux SA)

Tests	Composants actifs	Résultats	
		Négatif	Positif
NO3	Potassium nitrate	Incolore Rose après Zn	rose-rouge Incolore après Zn
TRP	l-tryptophane (formation d'indole)	Incolore à vert/jaune	Rose
GLU	D-glucose (fermentation)	Bleu à vert	Jaune
ADH	L-arginine arginine (dihydrolase)	Jaune	Orange/rose/rouge
URE	Urée (uréase)	Jaune	Orange/rose/rouge
ESC	Esculine et citrate de fer	Jaune	Gris/marron/noir
GEL	Gélatine	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment noir
PNPG	4-bitrophényl-BD-galactopyranoside	Incolore	Jaune
GLU	D-glucose	Transparence	Trouble
ARA	L-arabinose	Transparence	Trouble
MNE	D-mannose	Transparence	Trouble
MAN	D-mannitol	Transparence	Trouble
NAG	N-acétylglucosamine	Transparence	Trouble
MAL	D-maltose	Transparence	Trouble
GNT	Potassium gluconate	Transparence	Trouble
CAP	Acide caprique	Transparence	Trouble
ADI	Acide adipique	Transparence	Trouble
MLT	Acide malique	Transparence	Trouble
CIT	Trisodium citrate	Transparence	Trouble
PAC	Acide phénylacétique	Transparence	Trouble

Tableau de lecture de l'API Staph

Tests	Composants actifs	Réaction d'enzyme	Résultats	
			Négatif	Positif
0	Aucun	Témoin négatif	Rouge	
GLU	D-glucose	Acidification à partir du carbohydrate	Rouge	Jaune
FRU	D-fructose			
MNe	D-mannose			
MAL	Maltose			
LAC	Lactose			
TRE	D-tréhalose			
MAN	D-mannitol			
XLT	Xylitol			
MEL	D-melibiose			
NIT	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites	Nit1+Nit2 pendant 10min Incolore ou rouge Rose pale	
PAL	B naphtyl acide phosphate	Phosphate alcalin	ZymA+ZymB Pendant 10min Jaune violet	
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétone Methylocarbinol	VP1+VP2 pendant 10min Incolore ou Rose	violet
RAF	Raffinose	Acidification à partir du carbone hydrate	Rouge	Jaune
XYL	Xylose			
SAC	Saccharose			
MDG	-méthyl de glucide			
NAG	N-acétyl glucosamine			
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge
URE	Urease	Urease	Jaune/orange	Violet

Tableau de lecture de l'API Strepto

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS			
				NEGATIF		POSITIF	
VP	sodium pyruvate	1,9	production d'acétoïne (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / jusqu'à 10 min (3)			
				Incolore		Rose-Rouge	
HIP	acide hippurique	0,4	hydrolyse (acide HIPpurique)	NIN / jusqu'à 10 min			
				Incolore/Bleu pâle Gris-bleuté		Bleu foncé/Violet	
ESC	esculine citrate de fer	1,16 0,152	hydrolyse β-glucosidase (ESCuline)	4 h	24 h	4 h	24 h
				Incolore Jaune pâle	Incolore Jaune pâle Gris clair	Noir Gris	Noir
PYRA	acide pyroglutamique-β-naphtylamide	0,0256	PYRrolidonyl Arylamidase	ZYM A + ZYM B / 10 min (PYRA à LAP) (1) au besoin décoloré par éclaircissement intense			
				Incolore ou Orange très pâle		Orange	
□GAL	6-bromo-2-naphtyl-□D-galactopyranoside	0,0376	□-GALactosidase	Incolore		Violet	
βGUR	acide naphthol-ASBI-glucuronique	0,0537	β-GIUcuRonidase	Incolore		Bleu	
βGAL	2-naphtyl-βD-galactopyranoside	0,0306	β-GALactosidase	Incolore ou Violet très pâle		Violet	
PAL	2-naphtyl phosphate	0,0244	Phosphatase ALcaline	Incolore ou Violet très pâle		Violet	
LAP	L-leucine-β-naphtylamide	0,0256	Leucine AminoPeptidase	Incolore		Orange	
ADH	L-arginine	1,9	Arginine DiHydrolase	Jaune		Rouge	
<u>RIB</u> <u>ARA</u> <u>MAN</u> <u>SOR</u> <u>LAC</u> <u>TRE</u> <u>INU</u> <u>RAF</u> <u>AMD</u>	D-ribose	1,4	acidification (RIBose)	4 h	24 h	4 h	24 h
				Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
	L-arabinose	1,4	acidification (ARAbinose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
	D-mannitol	1,36	acidification (MANnitol)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
	D-sorbitol	1,36	acidification (SORbitol)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
	D-lactose (origine bovine)	1,4	acidification (LACtose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
	D-tréhalose	1,32	acidification (TREhalose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
	inuline	5,12	acidification (INUline)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
	D-raffinose	3,12	acidification (RAFFinose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
	amidon (2)	2,56	acidification (AMiDon)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
GLYG	glycogène	1,28	acidification (GLYcoGène)	Rouge ou Orange		Jaune franc	

Productions Scientifiques

Liste des articles :

Article publié :

Algerian postcaesarean surgical site infections: A cross-sectional investigation of the epidemiology, bacteriology, and antibiotic resistance profile

Chahinez Boutefnouchet a,b,c, Hayet Aouras MD d, Nour Chems El Houda Khennouchi PhD e, Hajira Berredjem PhD a, Jean-Marc Rolain PharmD, PhD b,c, Linda Hadjadj PhD b,c,

Article en soumission :

Genomic characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with *Tn1546*-plasmid *rep17* from obstetrics and gynecology setting, Algeria

Chahinez Boutefnouchet ^{1,2,3}, Hajira Berredjem ^{1*}, Hayet Aouras ⁴, Linda Hadjadj ^{2,3}, Jean-Marc Rolain ^{2,3}, and Seydina M. Diene^{2,3}

Liste des communications :

Communications internationales :

Communications affichées :

- 1) 1er séminaire international de l'Association Scientifique Algérienne de Recherche en Infectiologie, 27 et 28 Avril 2023, Sofitel Alger, par une communication affichée intitulée : Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from healthcare associated infection in obstetric gynecology

Communications orales :

- 2) Séminaire international sur les sciences naturelles et de la vie en ligne, organisé par international journal of human settlements le 19 et 20 février 2021, par une communication orale intitulée : *Enterobacteriaceae* productrices de β -lactamases et résistantes à la gentamicine isolée d'infections post-césariennes.
- 3) Séminaire international sur l'importance des méthodes moléculaires en microbiologie en ligne, organisé par l'école kbs le 24 juillet 2021, par une communication orale intitulée : dépistage du *staphylococcus aureus* non sensible à la vancomycine, isolés de plaie post-opératoire en gynécologie obstétrique.

- 4) Séminaire international sur les sciences agricoles, biologiques et de la vie en ligne, organisé par Trakya University, Edirne, Turkey, le 1 et le 3 septembre, par une communication orale intitulée *Methods for determination of colistin resistance in different Enterobacterial isolates of clinical origin*
- 5) 1er colloque international sur l'Hygiène des surfaces en milieu Hospitalier et Agroalimentaire, 9 et 10 mai 2023, au Parc National Plateau Lella Setti Tlemcen, par une communication orale intitulée : *Cross transmission of *Enterobacter cloacae* isolated from surface inert in service of obstetrics gynaecology at EHS el Bouni Annaba*

Communications nationales :

Communications affichées :

- 1) Première journée scientifique sur l'hygiène hospitalière el Bouni, le 22 juin 2021 par une communication affichée intitulée : *profil d'antibiorésistance d'agents pathogènes isolés sur les surfaces internes, du service de gynécologie obstétrique à l'EHS el Bouni.*
- 2) 25ème congrès de la société Algérienne de gynécologie obstétrique et le 16ème congrès de la société africaine de gynécologie obstétrique, du 26 au 29 Mai 2022 Blida-Algérie, par une communication affichée intitulée : *Incidence et Profil Bactériologique des Infections du Site Opératoire chez les Patientes Césarisées*



Contents lists available at ScienceDirect

American Journal of Infection Control

journal homepage: www.ajicjournal.org

Major Article

Algerian postcaesarean surgical site infections: A cross-sectional investigation of the epidemiology, bacteriology, and antibiotic resistance profile

Chahinez Boutefnouchet ^{a,b,c}, Hayet Aouras MD ^d, Nour Chems El Houda Khennouchi PhD ^e, Hajira Berredjem PhD ^a, Jean-Marc Rolain PharmD, PhD ^{b,c}, Linda Hadjadj PhD ^{b,c,*}

^a Laboratoire de Biochimie et Microbiologie Appliquée, Département de Biochimie, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar-Annaba, Algeria

^b Aix Marseille University, IRD, APHM, MEPHI, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Marseille Cedex 05, France

^c IHU Méditerranée Infection, France

^d Etablissement Hospitalier de Santé Abdallah Nouaouria "El Bouni" Annaba, Algeria

^e Laboratoire de Biotechnologie des substances naturelles et applications, Université L'arbi Ben M'hidi, Oum El Bouaghi, Algeria

Key Words:

Cesarean section
ESBL
vanA gene

Background: Surgical site infections (SSIs) are one of the most common health care-associated infections in low and middle-income countries. The aims of this cross-sectional descriptive study were to estimate the frequency of postcaesarean infection with associated clinical characteristics and the antibiotic resistance profile of bacterial isolates.

Methods: Patients who underwent a cesarean section at the obstetrics and gynecology department of the hospital in Annaba, Algeria were included. Each woman was followed postoperatively for 30 days and sociodemographic data were collected. Culture-based microbiological methods were used to identify the causative bacteria and determine their antibiotic resistance phenotype and molecular characterization.

Results: Among 1,810 patients, we recorded 36 (1.9%) SSIs. Most patients had undergone an emergency delivery (75%) and low educational level (72.2%). The most frequent maternal pathologies were Body Mass Index ≥ 30 (63.9%), scarred uteri (58.3%), anemia (55.6%), and an American Society of Anaesthesiologists score between II and III (33.3%). Of the 43 bacteria isolated, *Enterobacteriaceae* were the most frequent (62.8%), predominated by *Escherichia coli* strains (43.5%), a majority of which were extended-spectrum β -lactamases carriers (62.9%). Although gram-positive cocci were less frequent (37.2%), a majority of *Enterococcus faecalis* (56.2%) were observed and 2 strains of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* harboring the *vanA* gene were identified.

Conclusions: Extensive surveillance of at-risk populations should be integrated to prevent the occurrence of SSIs.

© 2023 Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

BACKGROUND

Surgical site infections (SSIs) are ranked second among nosocomial infections and are estimated to affect 2 million people per year, with between 5% and 15% requiring hospitalization.¹ In high-income countries, SSI rates following gynecological surgery are reported to be similar to those for other surgical procedures.² In cesarean (CS) deliveries, the SSI rate is between 3% and 15% in the United States,^{3,4} and a cumulative rate of 2.9% has been reported from 20 European Union countries.⁵ CS section is the most common obstetric surgical procedure worldwide. Its global rates (including both emergency and elective) are ranging from 5% to 20% and are continuing to rise in both developed and developing countries.^{6,7} In sub-Saharan Africa, where CS constitutes up to 80% of the surgical workload, high rates

* Address correspondence to Linda Hadjadj, PhD, Aix Marseille Univ, IRD, APHM, MEPHI, IHU Méditerranée Infection, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 19–21 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France.

E-mail address: linda.hadjadj@univ-amu.fr (L. Hadjadj).

Funding/support: This work was supported by the Algerian Ministry of High Education and Scientific Research, under the number: PRFU D00L04UN230120200023. This work was supported by the French Government under the "Investissement d'avenir" program managed by the "Agence Nationale de la Recherche ANR", (Méditerranée Infection 10-IAHU-03). This work was supported by Région Provence-Alpes-Côte d'Azur and European FEDER PRIMI funding.

Conflicts of interest: None to report.

of SSIs after CS have been reported: 19% in Kenya,⁸ 16.2% in Nigeria,⁹ and 10.9% in Sierra Leone.¹⁰ These infections are the underlying cause of 11% of maternal deaths and a quarter of newborn deaths, and multiple complications.¹⁰ In Africa, the rate of postoperative infection remains high (between 15% and 25%) leading to an increased length of hospitalization, higher treatment costs, and a heavier workload for health care staff.¹¹

To date, very few data are available on SSIs in Algeria. One study in 2015 reported an SSI rate of 5.4% in general surgery in northern Algeria.¹² Contamination of the surgical site can be caused either by exogenous microorganisms related to the environment or to contact with staff, or by endogenous microorganisms related to the commensal flora of the patient.¹³ Despite the use of prophylactic antibiotics before and after surgery, in combination with other infection control measures, SSIs remain a significant risk for postoperative patients. Treatment based on empirical antibiotic therapy may select resistant mutants and lead to treatment failure in some cases.^{14,15} The implementation of a program combining surveillance and the prevention of nosocomial infections has led to a reduction in the frequency of these infections in many countries, including Algeria.¹² To our knowledge, the present study is the first in Algeria to report the frequency and clinical characteristics of patients with SSIs after undergoing a CS section, as well as the microbiological profile of associated bacteria.

METHODS

Study design

A descriptive cross-sectional study with prospective data collection was conducted on women admitted between January 2020 and September 2021 in the obstetrics and gynecology department of the hospital.

Patient's characteristics

Patients admitted to the obstetrics and gynecology department who underwent a CS section were included in this study, as recommended by the US Center for Disease Control.¹⁶ The surgical wound was inspected at the time of the first dressing and then daily until discharge. The patient was then followed for 30 days post-operatively. Case definitions and diagnostic criteria for SSIs were conducted if the patient had one or more of the following signs: purulent discharge, localized pain or tenderness, localized swelling, local erythema or warmth, whether or not associated with fever, and confirmed by isolation of a bacteria on pus cytobacteriological evaluation.

The inclusion criteria were all patients who underwent a CS section in the hospital and who presented with an SSI within 24 hours of the operation until 30 days after the operation, and who answered all questions in the survey form. Patients who had undergone a CS section outside the hospital were excluded from the study.

Patient preparation and prevention

All the operations followed the same strict hygiene protocol established by our hospital facility. This consisted of an antiseptic treatment with a vaginal pessary the day before the operation, extensive disinfection of the abdominal region with an antiseptic solution on the day of the operation, and again before entering the operating room. Moreover, the admission of first-generation antibiotic prophylaxis cephalosporin (cefalexin) 30 minutes before surgery. After the surgical procedure, preventive antibiotic therapy was systematically administered for 48 hours (cefalexin 1 g 4 times per

day, metronidazole 500 mg twice a day, gentamicin 80 mg twice a day). The dressing was first checked 48 hours after the operation. After the first signs of infection, a combination of antibiotics is prescribed to patients according to availability (Table 2).

Data and sample collection

Data were collected from medical records including delivery and operating room records using a special proforma, and with the consent of each patient included in the study. Demographic, clinical, and obstetric characteristics of each case were recorded, including place of residence, age, antenatal care, antibiotic prophylaxis, parity, medical complications such as diabetes mellitus, hypertension and anemia, duration of the CS surgery, and length of hospital stay (Tables 1 and 2).

Isolates and identification

All pus samples were immediately transported to the laboratory for further processing. Each pus sample was first enriched on brain heart infusion broth (Condalab) for 24 hours at 37°C. The culture was then performed on MacConkey agar (Beckton Dickinson) and Columbia blood agar (bioMérieux) at the same time. Isolated bacterial strains were identified using matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) (BrukerDaltonics)¹⁷ at the Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée Infection in Marseille, France.

Antibiotic susceptibility testing

Antibiotic susceptibility testing was carried out on Mueller-Hinton agar (bioMérieux) using the standard disk diffusion method according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing recommendations.¹⁸ Three different panels of 16 antibiotic disks (i2a) were used for *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus spp.*, and *Staphylococcus spp.* isolates, respectively (Fig 2). For vancomycin-resistant strains, minimum inhibitory concentrations of vancomycin were determined using the E-test method (bioMérieux) and interpreted in accordance with European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines.

Molecular characterization

All *Enterobacteriaceae* strains were tested for the presence of extended-spectrum β -lactamases (ESBL) genes (*bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, and *bla_{CTX-M}*), carbapenemase genes (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, and *bla_{OXA-48}*), and colistin resistance genes (*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, and *mcr-8*) using real-time Polymerase Chain Reaction (PCR).^{19,20} Standard PCR was performed to confirm the presence of RT-PCR amplified genes. Sanger sequencing was performed on all positive standard PCR products to screen for genetic variants. All gram-positive cocci strains were screened for the *vanA* and *vanB* genes, as previously described.²¹

Statistical analysis

Results for variables related to wound infection complications were collected in a structured proforma and analyzed using the statistical package for the social sciences version 23. Continuous variables were expressed as descriptive statistics, mean, standard deviation (SD) and categorical variables were expressed as frequencies, and the χ^2 test was applied to find the association between different variables. *P*-values of less than .05 were considered to be significant.

RESULTS

Demographic and clinical data

Of a total 1,810 CS procedures performed during our study period, 36 patients manifested a postsurgical infection. These 36 patients constituted our sample series, representing an incidence of 1.9%. Twenty-seven of these CS procedures were carried out in emergency (75%).

The medical predictive variants related to post-CS infection were mainly characterized by scarred uteri as the only common surgical antecedent (58.3%). Patient-related maternal pathologies were anemia (55.6%), diabetes (27.7%), pre-eclampsia associated with diabetes (11.1%), and an American Society of Anaesthesiologists score of between II and III (33.3%) (Table 1).

Socially, the patients in our study had a low educational level (72.2%). All operations were performed according to Altemeier's contamination class 2. The patients in our study series were referred for CS section surgery following various obstetric indications including fetal distress (51%), macrosomia (25%), breech position (12%), fluid reversal (9%), and retroplacental haematoma (3%) (Table 2). Nevertheless, no hemorrhage was recorded in these cases of SSI.

The mean age of the patients was 33.93 ± 8.28 years with extremes ranging from 24 to 43 years. The median Body Mass Index (BMI) ≥ 30 was 30.80 ± 5.60 in 63.9%. Regarding gynecological history, indicated by parity ≥ 3 , it was 2.50 ± 1.50 in 30.6% (Table 2).

The mean time to infection after surgery was 6.29 ± 4.956 days. The average duration of the CS section was reported as 48.04 ± 10.93 minutes, and duration > 60 minutes was observed only for 13.9% of cases. Among the biological parameters confirming infection, we have an average CRP of 84.44 ± 61.83 mg/L in 88.9% of cases, and the average length of postoperative stay is 10.76 ± 6.24 days. However, the length of the postoperative stay for some patients was > 16 days in 19.4%. The demographic and clinical characteristics of patients with SSIs after the CS section were described in Table 2.

Bacterial strains and microbiological tests

Of 36 culture-positive samples, 64% were found to be monomicrobial samples and 36% were polymicrobial samples. A total of 43 bacterial isolates were recovered. From all bacterial isolates, we identified 62.8% *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*) and 37.2% gram-positive cocci (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis*). For the monomicrobial samples, *E coli* was the main isolate (43.5%) followed

by *K pneumoniae* and *E cloacae* (17.4%), *E faecalis* and *S epidermidis* (8.7%). For the polymicrobial samples, we observed the combination of *E cloacae* and *E faecalis* (53.8%), followed by *E coli* and *S aureus* (23%), *E coli* and *E faecium* (15.4%) and *K pneumoniae* and *S epidermidis* (7.8%) (Fig 1).

Of all the strains isolated, 63% showed multidrug resistance, defined as nonsusceptibility to three or more of the antibiotics. For *Enterobacteriaceae*, high resistance was expressed to amoxicillin (88%), amoxicillin-clavulanic acid (84%), ceftriaxone (72%), amikacin (84%), and ciprofloxacin (60%). The same isolates showed low resistance to ertapenem (7%) and fosfomycin (3%), but were fully susceptible to piperacillin-tazobactam, imipenem, and colistin (Fig 2a).

From the gram-positive cocci, *Enterococcus* species were the most resistant to the antibiotics tested, with resistance to penicillin and amoxicillin (77%), ceftriaxone (76%), rifampicin (70%), minocycline and linezolid (62%), erythromycin (47%), gentamicin (24%), vancomycin (8%) (Fig 2b). Resistance to vancomycin was expressed in both *E faecium* strains with a minimum inhibitory concentration > 256 $\mu\text{g/mL}$.

All isolated *Staphylococcus spp.* were found to be sensitive to almost all antibiotics tested, except to penicillin and fusidic acid (60%), erythromycin (30%) and nitrofurantoin (20%) (Fig 2c).

AMX: Amoxicillin; AMC: Amoxicillin + clavulanic acid; CF: Cefalotin; FEP: Cefepime; CRO: Ceftriaxone; ERM: Ertapenem; IMP: Imipenem; TZP: Piperacillin/tazobactam; SXT: Sulfamethoxazole-trimethoprim; PT: Pristinamycin; CIP: Ciprofloxacin; Fos: Fosfomycin; DOX: Doxycycline; GM: Gentamicin; AK: Amikacin; FT: Nitrofurantoin; CO: Colistin; PG: Penicillin G; OX: Oxacillin; CX: Cefoxitin; E: Erythromycin; VAN: Vancomycin; TEC: Teicoplanin; MN: Minocycline; LZD: Linezolid; RA: Rifampicin; FA: Fusidic acid; CL: Clindamycin.

Molecular characterization

Of the 27 *Enterobacteriaceae* isolated, 62.9% of the strains carried ESBL genes. *E cloacae* was the majority producer of ESBL genes (*bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-206}) followed by *E coli* (*bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-206}), and *K pneumoniae* (*bla*_{SHV-187}, *bla*_{CTX-M-15}) (Fig 1, Table 3). The presence of carbapenemase and *mcr* genes was not detected in all our isolates. Vancomycin resistance expressed by the *vanA* gene in both *E faecium* isolates was detected (Fig 1).

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study in Algeria that provides an overview of the rate of post-CS section infection with their predictive factors, as well as the first to provide the antibiotic resistance profile of associated bacteria. We report a rate of 1.9% in Algeria, which is low compared to similar studies elsewhere in Africa, with an incidence of 10.9% in Sierra Leone,¹⁰ 7.3% in sub-Saharan Africa,²² and 5% in Tunisia.²³ Furthermore, this rate is low compared to studies carried out in Egypt with 5.3%²⁴ and in Brazil with 3.4%.²⁵ In contrast, our results are in line with other studies in developed countries such as 1.2% in Norway,²⁶ 1.75% in Italy,²⁷ and 1% in France.²⁸ This discrepancy could be attributed to differences in the quality of care and surgical services between countries. Differences in sample size, sociodemographic backgrounds, and length of hospitalization between studies also play a significant role in these variations.^{10,11,29}

However, the low frequency of SSIs observed in our study could be explained by the preventive measures adopted and which are strictly followed, according to a hospital hygiene protocol applied to all women scheduled by our service for a programmed intervention. In some cases where the surgery takes place in an emergency, as in

Table 1
Basic obstetric characteristics of ISS

		Maternal pathology related to postcaesarean SSI	
		χ^2	P-values
ASA			
I	24 (66.7)	2	.10
II and III	12 (33.3)		
Maternal pathology			
No systemic disease	2 (5.6)		
Anemia	20 (55.6)	10	.0003
Diabetes	10 (27.7)	3.30	.03
Pre-eclampsia/diabetes	4 (11.1)	0.10	.30
Surgical history			
Scarred uteri	21 (58.3)	0.30	.20
No abnormality detected	15 (41.7)		

ASA, American Society of Anaesthesiologists; Min, minimum; Max, maximum.

Table 2
Demographic and clinical characteristics of patients with SSIs following cesarean section

Variables		Effectif n (%)	Mean \pm SD	Median (Min-Max)
Educational level	≥ 10 years of study	10 (27.8)	-	-
	< 10 years of study	26 (72.2)	-	-
Age	< 30	13 (36.1)	33.93 \pm 8.28	31.50 (24-43)
	≥ 30	23 (63.9)	-	-
Body mass index (kg/m ²)	< 30	13 (36.1)	30.80 \pm 5.60	31 (23-44)
	≥ 30	23 (63.9)	-	-
Parity	< 3	25 (69.4)	2.50 \pm 1.50	1 (1-6)
	≥ 3	11 (30.6)	-	-
Time from intervention to infection(days)	≤ 7	23 (63.9)	6.29 \pm 4.956	6 (2-25)
	> 7	13 (36.1)	-	-
Plan of the intervention	Elective	9 (25)	-	-
	Emergency	27 (75)	-	-
Presence of premature rupture of membranes	Yes	9 (25)	-	-
	No	27 (75)	-	-
Type of anesthesia	General	9 (25)	-	-
	Spinal anesthesia	27 (75)	-	-
Hemostasis	Good	27 (75)	-	-
	Difficult	9 (25)	-	-
Draining	Yes	3 (8.3)	-	-
	No	33 (91.7)	-	-
Indication for CS	Foetal distress	18 (50)	-	-
	Macrosomia	9 (25)	-	-
	Breech position	5 (14)	-	-
	Fluid reversal	3 (8)	-	-
	Retroplacental haematoma	1 (3)	-	-
Doctor grade	Medical interns	32 (88.9)	-	-
	Assistant and professor	4 (11.1)	-	-
Duration of CS (min)	< 60	31 (86.1)	48.04 \pm 10.93	45 (35-75)
	> 60	5 (13.9)	-	-
CRP (mg/L)	< 6	4 (11.1)	84.44 \pm 61.83	64 (6-258)
	> 10	32 (88.9)	-	-
Antibiotic therapy	Cefacet/Gentamicin/Bactrim	12 (33)	-	-
	Cefacet/Gentamicin/Flagyl	9 (25)	-	-
	Cefacet/Gentamicin	6 (17)	-	-
	Flagyl/Claforan/Gentamicin	4 (11)	-	-
	Claforan/Gentamicin	3 (8)	-	-
	Bactrim/Flagyl/Gentamicin	2 (6)	-	-
Postoperative stay (days)	≤ 16	29 (80.6)	10.76 \pm 6.24	10 (2-34)
	> 16	7 (19.4)	-	-

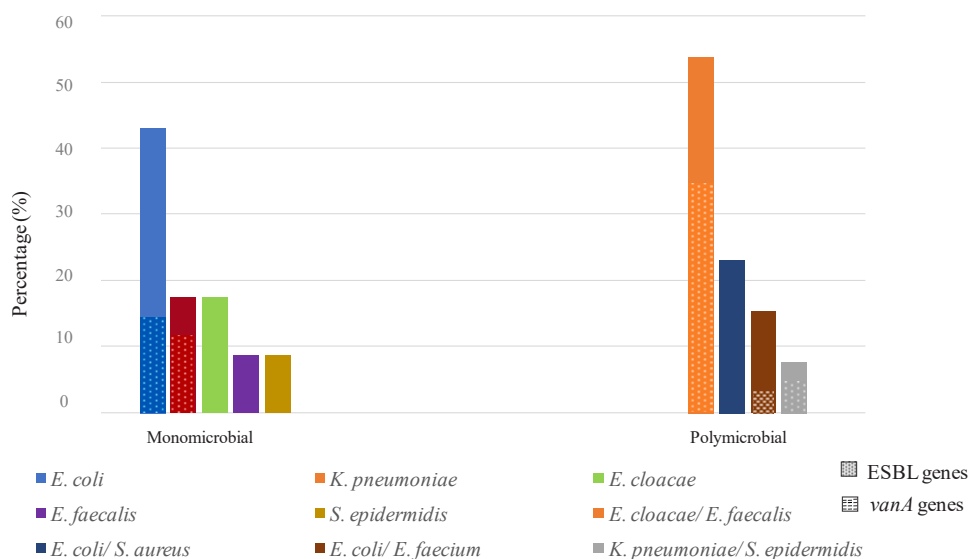


Fig. 1. Distribution of the different bacterial species isolated according to the type of microbial contamination (monomicrobial: 64% and polymicrobial: 36%) and the proportion of their antibiotic resistance genes detected in SSIs after cesarean section.

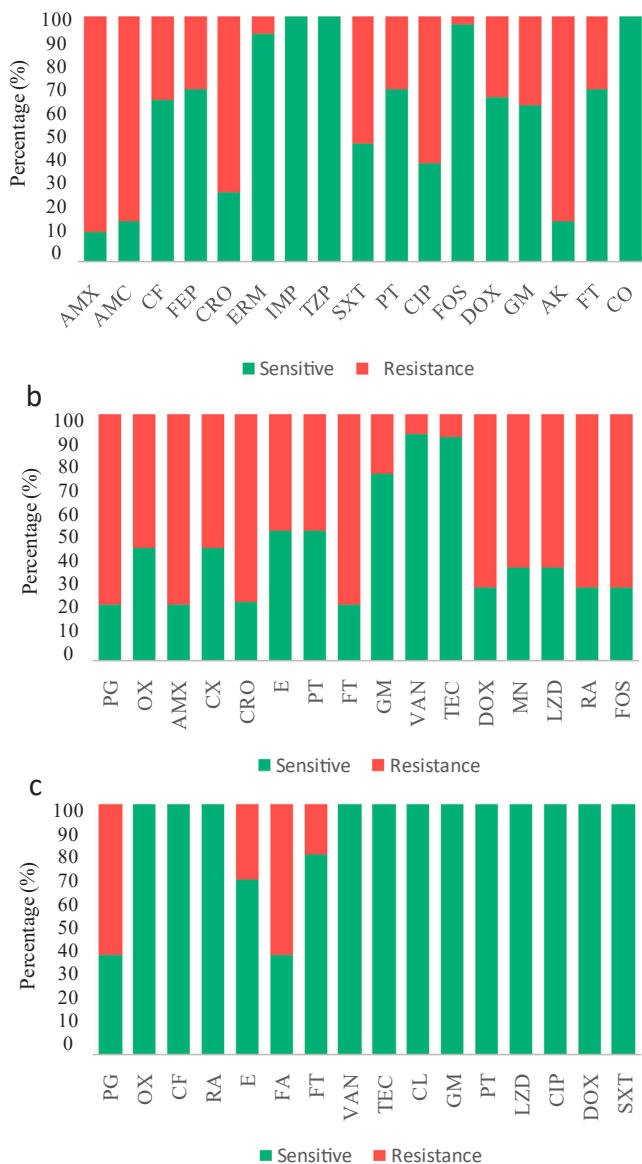


Fig. 2. Susceptibility and resistance patterns of *Enterobacteriaceae* (A), *Enterococcus* spp (B), and *Staphylococcus* spp (C) strains.

the majority of patients in our study (75%), this protocol may not be followed or may be interrupted. This is considered to be a predictor of an SSI. Similarly, many authors have reported that emergency CS surgery was strongly correlated with a high risk of infections.^{29,30} In addition, risk factors for SSIs were indicated by differences in the variety of comorbidities, surgical history, prolonged length of hospital stay, choice of antibiotic therapy, and accuracy of data obtained.^{24,31} In low-income countries, the health care system is fragile and not very accessible for populations with a low socio-economic status. Moreover, these populations often have a low level of education and are less aware of their clinical condition. Prenatal care, prevention of maternal pathologies, and risk factors for SSI after CS are underdeveloped.^{32,33}

Furthermore, it has been shown that a high BMI is the most important predictor of the risk of SSIs after the CS section.^{24,31} In our series, 63.9% of women who underwent SSIs had a BMI ≥ 30 . However, the relationship between age and SSIs is not yet clear. A study published in Kosovo showed the risk of developing an SSI was significantly lower in the under-35 age group, in cases where the

operation lasted less than 1 hour.³¹ Our results report that the most affected age group was 33.93 ± 8.28 years (63.8%), which is similar to studies conducted in England and Egypt, with a mean age of 33.10 ± 5.20 years³⁴ and 31.20 ± 4.90 years,²³ respectively, but higher than the Sierra Leone study, with a mean age of 26.4 ± 0.7 years.¹⁰ Regarding the conditions under which the operation was performed, 86% of the cases lasted less than 1 hour. All infections were superficial wounds and the only common surgical history between our patients was a scarred uterus. Indeed, a scarred uterus can be incriminated as a risk factor for the occurrence of an SSI, since it seems to cause fibrosis of the scarwall.²³ Each case was treated by incision, followed by dressing as required on a daily basis. The median time at which the SSI was diagnosed was 6.29 ± 4.95 days postoperatively for the majority of cases (63.9%). It was previously reported that the risk of SSIs increases 7.4-fold in the presence of other comorbidities, including anemia,³¹ pre-eclampsia, and diabetes.³¹ This study revealed various clinical features of SSIs after CS sections: 47.2% of the patients were anemic, 27.7% were diabetic and 11.1% had a combination of diabetes and pre-eclampsia. Anemia is considered to be an important factor in postoperative infections due to the attenuation of the immune defense mechanisms.^{23,24} Hyperglycemia also encourages the occurrence of SSIs by disrupting the defense mechanism by altering the activity of polynuclear and phagocytosis.⁴

Antibiotic prophylaxis was administered to all patients 30 minutes prior to incision. This antibiotic prophylaxis plays an important role in reducing the rate of SSIs and is one of the most important criteria in the intraoperative patient preparation protocol.³¹ Unfortunately, antibiotic supply is a major concern in some countries. Universal preoperative antibiotic coverage is generally rare in low-income wards. Following CS, incomplete antibiotic administration is an important predictor of infection, increasing this risk by 2 and a half times for each missed dose.³⁵ In a context of scarce resources, World Health Organization recommendations no longer support a strategy of prolonged antibiotic prophylaxis.³⁶ Although they are indispensable against infections, their misuse can lead to the development of multiresistant bacteria.^{14,15}

Bacteriologic analysis of pus samples from SSIs isolated a total of 43 aerobic bacteria, with pure isolates outnumbering mixed isolates by 64% to 36%. The microorganisms most often responsible for SSIs are common human commensals and vary mainly according to the microbial ecology of the department in question or the reservoir, but also according to the degree of contamination of the surgical site. Therefore, the class of the surgical wound plays a role in the purity of isolates according to the Altmeier classification, with clean procedures being associated with monomicrobial isolates, while contaminated and dirty wounds are associated with polymicrobial isolates.³⁷ In our study, all surgical procedures were clean-contaminated, which explains the predominance of monomicrobial specimens.

Enterobacteriaceae isolates and gram-positive isolates accounted for 62.8% and 37.2% of cases, respectively. This could be attributed to the diversity of habitats of gram-negative bacteria, including inanimate surfaces in hospitals, and the possible contamination of the intestinal tract during surgery. In our study, *E. faecalis* was isolated as the most common gram-positive bacteria, which is in agreement with a similar Croatian study.³⁸ Molecular analysis of resistance phenotypes to different β -lactam antibiotics reveals a prevalence of 39.35% for ESBL-producing *Enterobacteriaceae*, expressed by TEM-206, SHV-187, and CTX-M15. Antibiotic resistance in gram-negative bacilli has become a major public health problem in Algeria over the last 10 years.³⁹ Indeed, there has been a significant increase in ESBL-producing strains, particularly those carrying the CTX-M-3 and CTX-M-15 enzymes.⁴⁰ This resistance, present in different ecosystems, has become endemic.³⁹ In contrast, the discovery of vancomycin-

Table 3
Phenotypic and genotypic characteristics of seventeen *Enterobacteriaceae* strains isolated from SSI after cesarean section

Patients	Age(years)	Indication for CS	ISO classification	Strains	Antibiotic therapy	ESBL genes		
						<i>bla</i> _{SHV-187}	<i>bla</i> _{TEM-206}	<i>bla</i> _{CTX-M15}
1	41	Breech	Superficial wound	<i>E coli</i>	Bactrim, Flagyl, Gentamicin	-	+	+
2	24	Breech	Superficial wound	<i>E coli</i>	Cefalexin, Flagyl, Gentamicin	-	+	+
3	37	Breech	Superficial wound	<i>E coli</i>	Flagyl, Gentamicin, Claforan	-	-	+
4	27	Fetal distress	Deep wound	<i>E coli</i>	Bactrim, Gentamicin, Claforan	-	-	+
5	41	Retroplacental hematoma	Superficial wound	<i>E coli</i>	Cefalexin, Claforan, Gentamicin	-	-	+
6	43	Fetal distress	Superficial wound	<i>E cloacae</i>	Cefalexin, Gentamicin	-	-	+
7	35	Macrosomia	Superficial wound	<i>E cloacae</i>	Cefalexin, Gentamicin	-	+	+
8	26	Macrosomia	Superficial wound	<i>E cloacae</i>	Flagyl, Gentamicin, Claforan	-	+	+
9	27	Breech	Deep wound	<i>E cloacae</i>	Cefalexin, Gentamicin, Flagyl	-	+	+
10	32	Fetal distress	Superficial wound	<i>E cloacae</i>	Bactrim, Flagyl, Gentamicin	-	+	+
11	28	Fetal distress	Superficial wound	<i>E cloacae</i>	Cefalexin, Flagyl, Gentamicin	-	-	+
12	32	Fetal distress	Superficial wound	<i>E cloacae</i>	Bactrim, Gentamicin, Claforan	-	-	+
13	37	Breech	Superficial wound	<i>K pneumoniae</i>	Bactrim, Flagyl Gentamicin	+	-	+
14	41	Fetal distress	Superficial wound	<i>K pneumoniae</i>	Cefalexin, Flagyl, Gentamicin	+	-	+
15	39	Fluid reversal	Superficial wound	<i>K pneumoniae</i>	Flagyl, Gentamicin, Claforan	+	-	-
16	42	Fetal distress	Superficial wound	<i>K pneumoniae</i>	Cefalexin, Gentamicin, Bactrim	+	-	-
17	29	Breech	Superficial wound	<i>K pneumoniae</i>	Cefalexin, Gentamicin, Bactrim	+	-	+

ESBL, extended-spectrum β -lactamases.

resistant *E faecium* through the expression of the *vanA* gene has raised concerns. Although described in the North-West of Algeria, these strains are not very frequent in the country.²¹ The presence of these different bacteria may be due to errors in the choice and dosage of prescribed antibiotics and in particular to antibiotic prophylaxis that is not adapted to the local antibiotic sensitivity profile. Antibiotic therapy must, therefore, be adapted to the local ecosystem.

CONCLUSIONS

This study demonstrated a low incidence of SSIs in our hospital. The presence of SSIs is mostly associated with a bacteriological profile, with ESBL resistance in *Enterobacteriaceae*. In addition, sporadic cases of vancomycin resistance in *E faecium* have also been observed.

Nevertheless, the data from our study highlight the need for closer monitoring of patients with comorbidities and risk factors such as overly prolonged operations, emergency surgery, BMI \geq 30, anaemia, and a scarred uterus. Prenatal care and patient education, especially for this risk population, must be systematic. In addition, it is important to understand the local antibiotic sensitivity profiles. Therefore, regular national epidemiological surveillance is necessary to prescribe appropriate antibiotic therapy. All these measures combined with optimal hygiene practices, will reduce the rate of SSIs and improve patient health.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the local ethics committee from the CHU Ibn Roched (No.: 1726). Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Acknowledgments

The obstetrics and gynecology department staff of the Abdallah Nouaouria, EHS “El Bouni”, are kindly acknowledged for supplying the clinical data and additional information for this study. Special thanks to Prof. Kamel Amoura and his team for their technical help. We are grateful to the patients who participated in the study.

References

1. Avalos-Bock S. Knocking out nosocomial infections. *Nursing*. 2004;34:24–25.
2. Black JD, de Haydu C, Fan L, Sheth SS. Surgical site infections in gynecology. *Obstet Gynecol Surv*. 2014;69:501–510.
3. Mahdi H, Goodrich S, Lockhart D, DeBernardo R, Moslemi-Kebria M. Predictors of surgical site infection in women undergoing hysterectomy for benign gynecologic disease: a multicenter analysis using the national surgical quality improvement program data. *J Minimally Invasive Gynecol*. 2014;21:901–909.
4. Krieger Y, Walfisch A, Sheiner E. Surgical site infection following cesarean deliveries: trends and risk factors. *J Matern-Fetal Neonat Med*. 2017;30:8–12.
5. Prevention E.C. for D, Control. Surveillance of surgical site infections in European hospitals—HAISSI protocol. Published online 2012.
6. Alfouzan W, Al Fadhli M, Abdo N, Alali W, Dhar R. Surgical site infection following cesarean section in a general hospital in Kuwait: trends and risk factors. *Epidemiol Infect*. 2019;147:e287.
7. Saleem Z, Godman B, Hassali MA, Hashmi FK, Azhar F, Rehman IU. Point prevalence surveys of health-care-associated infections: a systematic review. *Pathogens Glob Health*. 2019;113(4):191–205.
8. Koigi-Kamau R, Kabare LW, Wanyoike-Gichuhi J. Incidence of wound infection after caesarean delivery in a district hospital in central Kenya. *East Afr Med J*. 2005;82(7):357–361.
9. Morhason-Bello IO, Oladokun A, Adedokun BO, Obisesan KA, Ojengbode OA, Okuyemi OO. Determination of post-caesarean wound infection at the University college hospital Ibadan Nigeria. *Niger J Clin Pract*. 2009;12:1–5.
10. Di Gennaro F, Marotta C, Pisani L, et al. Maternal caesarean section infection (MACSI) in Sierra Leone: a case–control study. *Epidemiol Infect*. 2020;148:e40.
11. Ngaroua N, Ngah JE, Bénét T, Djibrilla Y. Incidence des infections du site opératoire en Afrique sub-saharienne: revue systématique et méta-analyse. *Pan Afr Med J*. 2016;24:1.
12. Atif ML, Azouaou A, Bouadda N, Bezzaoucha A, Si-Ahmed M, Bellouni R. Incidence and predictors of surgical site infection in a general surgery department in Algeria. *Revue d'épidémiologie et de sante publique*. 2015;63:275–279.
13. Dhote N, Nagdeo N. Bacteriological profile of surgical site infection and associated risk factors in obstetrics and Gynecology patient. *Panacea J Med Sci*. 2018;8:66–69.
14. Goldberg H, Shenhar C, Tamir H, et al. Predictors of surgical site infection after radical cystectomy: should we enhance surgical antibiotic prophylaxis. *World J Urol*. 2019;37:1137–1143.
15. Kaczmarek K, Lemiński A, Bańcarz A, Zakrzewska A, Słojewski M. Post-operative infections among patients undergoing radical cystectomy at a tertiary center. *Surg Infect*. 2018;19:451–458.
16. Carande-Kulis V. Guidelines and Recommendations: A CDC Primer. Published online 2012.
17. Seng P, Rolain JM, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M, Raoult D. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol*. 2010;5:1733–1754.
18. CASFM2019_V1.0.pdf. Accessed September 25, 2023. https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2019/02/CASFM2019_V1.0.pdf.
19. Dandachi I, Chabou S, Daoud Z, Rolain JM. Prevalence and emergence of extended-spectrum cephalosporin-, carbapenem- and colistin-resistant gram negative bacteria of animal origin in the Mediterranean Basin. *Front Microbiol*. 2018;9:2299.
20. Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes. *Eurosurveillance*. 2018;23.

21. Zerrouki H, Rebiahi SA, Hadjadj L, et al. High frequency and diversity of Vancomycin-resistant Enterococci (VRE) in Algerian healthcare settings. *Infect Genet Evol.* 2021;92:104889.
22. Chu K, Maine R, Trelles M. Cesarean section surgical site infections in sub-saharan africa: a multi-country study from medecins sans frontieres. *World J Surg.* 2015;39:350–355.
23. Merzougui L, Marwen N, Hannachi H, et al. Incidence and risk factors of surgical site infection following caesarean section in a Tunisian maternity unit. *Sante Publique.* 2018;30:339–347.
24. Gomaa K, Abdelraheim AR, El Gelany S, Khalifa EM, Yousef AM, Hassan H. Incidence, risk factors and management of post cesarean section surgical site infection (SSI) in a tertiary hospital in Egypt: a five year retrospective study. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2021;21:1–9.
25. Carvalho RLR, de Campos CC, Franco LM, de C. Rocha ADM, Ercole FF. Incidence and risk factors for surgical site infection in general surgeries. *Revista Latino-Americana Enfermagem.* 2017;25:e2848.
26. Eriksen HM., Sæther AR, Løwer HL, et al. Infections after caesarean sections. *Tidsskrift for Den norske legeforening.* Published online; 2009.
27. Ferraro F, Piselli P, Pittalis S, et al. Surgical site infection after caesarean section. Space for post-discharge surveillance improvements and reliable comparisons. *New Microbiol.* 2016;39:134–138.
28. Saunders L, Perennec-Olivier M, Jarno P, et al. Improving prediction of surgical site infection risk with multilevel modeling. *PLoS One.* 2014;9:e95295.
29. Pathak A, Mahadik K, Swami MB, et al. Incidence and risk factors for surgical site infections in obstetric and gynecological surgeries from a teaching hospital in rural India. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2017;6:1–8.
30. Zejnnullahu VA, Isjanovska R, Sejfića Z, Zejnnullahu VA. Surgical site infections after cesarean sections at the University Clinical Center of Kosovo: rates, microbiological profile and risk factors. *BMC Infect Dis.* 2019;19:1–9.
31. Zejnnullahu VA, Isjanovska R, Sejfića Z, Zejnnullahu VA. Surgical site infections after cesarean sections at the University Clinical Center of Kosovo: rates, microbiological profile and risk factors. *BMC Infect Dis.* 2019;19:1–9.
32. Seni J, Najjuka CF, Kateete DP, et al. Antimicrobial resistance in hospitalized surgical patients: a silently emerging public health concern in Uganda. *BMC Res Notes.* 2013;6:1–7.
33. Tadesse BT, Ashley EA, Ongarello S, et al. Antimicrobial resistance in Africa: a systematic review. *BMC Infect Dis.* 2017;17:1–17.
34. Shree R, Park SY, Beigi RH, Dunn SL, Krans EE. Surgical site infection following cesarean delivery: patient, provider, and procedure-specific risk factors. *Am J Perinatol.* 2016;33:157–164.
35. van Schalkwyk J, Van Eyk N, Yudin MH, et al. Antibiotic prophylaxis in obstetric procedures. *J Obstetr Gynaecol Canada.* 2010;32:878–884.
36. *Lignes Directrices Mondiales Pour La Prévention Des Infections Du Site Opératoire.* Organisation mondiale de la santé; 2018.
37. Hope D, Ampaire L, Oyet C, Muwanguzi E, Twizerimana H, Apecu RO. Antimicrobial resistance in pathogenic aerobic bacteria causing surgical site infections in Mbarara regional referral hospital, Southwestern Uganda. *Sci Rep.* 2019;9:1–10.
38. Bogdanović G, Cerovac A. Bacterial causes and antibiotics susceptibility profile of surgical site infection following cesarean section. Published online; 2022.
39. Tani ZBAK, Arlet G. Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie. *Pathol Biol.* 2014;62:169–178.
40. Ramdani-Bougoussa N, Manageiro V, Jones-Dias D, Ferreira E, Tazir M, Caniça M. Role of SHV β -lactamase variants in resistance of clinical *Klebsiella pneumoniae* strains to β -lactams in an Algerian hospital. *J Med Microbiol.* 2011;60:983–987.

1 **Genomic characterisation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium***
2 **with *Tn1546*-plasmid *rep17* in obstetrics and gynaecology settings in Algeria**

3 Chahinez Boutefnouchet^{1,2}, Hajira Berredjem^{1*}, Hayet Aouras³, Linda Hadjadj², Jean-Marc
4 Rolain², and Seydina M. Diene²

5

6

7 **1.** Laboratoire de Biochimie et Microbiologie Appliquées (LBMA), Département de
8 Biochimie, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar-Annaba, 23000, Algeria.

9 **2.** Aix Marseille Université, MEPHI, IRD, APHM, IHU-Méditerranée Infection, Faculté de
10 Pharmacie, 19-21 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille CEDEX05, France.

11 **3.** Etablissement Hospitalier de Sante Abdallah Nouaouria “El Bouni” Annaba, 2300, Algeria.

12

13 ***Correspondence:** Dr. Chahinez Boutefnouchet

14 Laboratoire de Biochimie et Microbiologie Appliquée (LBMA), Département de Biochimie,
15 Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar-Annaba, 23000, Algérie

16 Email: chahinezboutef@gmail.com; Tel: +213 (0) 558817367

17

18 **Keywords:** *Enterococcus faecium*, vancomycin-resistant *Enterococci*, *vanA*, whole-genome
19 sequencing, *Tn1546*-like element, plasmid *rep17* pRUM-like.

20 **Abstract:**

21 *Enterococcus faecium* represents a prominent global public health concern,
22 particularly in populations with heightened vulnerability. The emergence of vancomycin-
23 resistant *E. faecium* (VREfm) has significantly hindered therapeutic interventions. In this
24 study, we present a comprehensive analysis detailing the whole-genome characterisation of
25 *vanA*-type vancomycin-resistant *E. faecium* strains, meticulously isolated from instances of
26 surgical site infections (SSI). Two occurrences of VREfm were identified in patients
27 hospitalised within the obstetrics and gynaecology department due to post-operative wound
28 infections. Whole-genome sequencing, using Miseq Illumina and encompassing the
29 exploration of plasmids, resistance genes, and the elucidation of phylogenetic relationships,
30 was meticulously conducted. The genome assembly of both *E. faecium* Q7358 and *E. faecium*
31 Q7360 isolates resulted in a chromosomal length of 2 923 802-bp (with a GC content of
32 37.76%) and 2 927 224-bp (with a GC content of 37.74%), respectively. The genome
33 annotation unveiled the presence of a myriad of antibiotic resistance genes, encompassing the
34 *vanA* operon, the *ant(6)-Ia*, *aph(3)-III*, and *aac(6)-aph(2)-I* aminoglycoside resistance genes,
35 and the macrolide resistance gene, *ermB*. Genotyping using multi-locus sequence typing
36 (MLST) elucidated their affiliation with the ST80 clone. Furthermore, a comparative genomic
37 analysis exposed a *rep17* plasmid harbouring a Tn1546 type element, previously unreported
38 in Algeria. Our findings delineate the genomic attributes of two clinical VREfm ST80
39 isolates, bearing a *vanA* plasmid, within the hospital setting in Algeria. These results
40 underscore the potential for *E. faecium* ST80 to evolve into a *vanA* epidemic clone within
41 healthcare facilities.

42

1. Introduction

Enterococci are members of the intestinal microbiota of animals and humans, and have been widely regarded as an indicator for the detection of antimicrobial resistance of gram-positive bacteria [2]. Moreover, *Enterococci* have also aroused clinical concern because of their implication in a wide diversity of infections [21]. *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* are the clinically most important species among *Enterococci*. With a high mortality rate, they have emerged as a major contributor to outbreaks and infections linked to healthcare settings [3]. The wide spread of Vancomycin Resistance *Enterococcus* (VRE) is an important issue in healthcare establishments around the world. The first isolate of the VRE strain in Algeria was achieved in 2010 [3, 14]. Despite the intrinsic resistance of *Enterococci* to several classes of antimicrobials, rates of acquired antimicrobial resistance (AMR) in *E. faecium*, including vancomycin-resistant *E. faecium* (VREfm) have been rising steadily over recent decades [10]. Vancomycin is a glycopeptide antibiotic which inhibits gram-positive bacterial cell wall biosynthesis by binding the murein pentapeptide precursors, the D-alanyl-D-alanine leading to bacterial death [16]

However, due to massive use of glycopeptide, the first vancomycin-resistant VREfm emerged in 1986 [20], mediated by the acquisition of vancomycin resistance genes, including *vanA*, *B*, *D*, *E*, *F*, *G*, *L*, *M*, and *N*, with *vanA* being the most clinically relevant determinant. These vancomycin resistance genes are responsible for replacing the final D-alanine of the murein pentapeptide precursor with a D-lactate or a D-serine, leading to the non-binding or decreased binding of the glycopeptide to its target [31]. A lot of questions remain unanswered, and significant regional variations in the molecular epidemiology of plasmids containing *vanA* may exist. However, genomic data can be used to understand the evolution and the high genomic plasticity of VRE.

67 In this study, we used short-read sequencing data (Illumina Miseq) to perform
68 complete genome sequencing to determine the resistance genes and their genetic environment
69 in two *E. faecium* isolates of clinical origin.

70 **2. Materials and Methods**

71 **2.1. Ethics statement**

72 This study was approved by the local ethics committee (No. 1726) at the Ibn Rochd
73 hospital in Annaba, and was conducted in line with the declaration of Helsinki. All patients
74 provided their written informed consent before enrolment.

75 **2.2. Bacterial isolates and antimicrobial susceptibility testing**

76 The study design is described in a previous publication [5]. The samples were collected
77 from the hospital ward while the patients were in hospital and were initially analysed at the
78 LBMA laboratory, starting with enrichment on nutrient broth (Condalab, Madrid, Spain),
79 followed by screening by selecting them on Columbia blood agar (bioMérieux, Marcy
80 l'Etoile, France), and finally storage at -20 °C in nutrient broth with 30% added glycerol.
81 These strains were transported to the IHU-Méditerranée Infection in Marseille where they
82 were identified using MALDI-TOF MS (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen,
83 Germany)[19].

84 In line with the European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing (EUCAST,
85 Version 1.0, available at www.eucast.org, nd), the resistance phenotype of the isolates was
86 assessed by testing their susceptibility against a panel of 16 antibiotics on Mueller Hinton
87 agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) using disk diffusion (i2a, Montpellier, France). The
88 E-test method (bioMérieux) was used to determine the minimum inhibitory concentration
89 (MIC) of vancomycin, and the results were interpreted in accordance with the EUCAST
90 guidelines.

91

92 **2.3. Molecular characterisation and whole-genome sequencing**

93 The isolates were tested for the presence of the *vanA* and *vanB* genes using real-time PCR.
94 The *vanA* and *vanB* primer and probe sequences were based as previously described (Zerrouki
95 *et al.*, 2021 and Hansen *et al.*, 2021). Whole-genome sequencing of these strains was
96 performed using MiSeq Illumina technologies (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) in order
97 to determine the vancomycin genes, clonal relationship, the typing, and the genetic
98 environment for these strains.

99 **2.4. Bioinformatics analysis**

100 The short-read data produced by Illumina sequencing were analysed using tools available
101 in Galaxy with default parameters (<https://galaxy.migale.inrae.fr/>) (Galaxy, n.d.). De novo
102 assembly was performed using Spades, quality control with Quast, and genome annotation
103 using the Prokaryotic Genome Annotation. Acquired antimicrobial resistance genes were
104 identified using the ARG-ANNOT database available on the ABRicate pipeline [12].
105 Determination of the average nucleotide identity between the strains was achieved using the
106 Type Strain Genome Server (TYGS)[23].

107 MLST analysis was carried out *in silico* to determine the sequence type (ST) of strain
108 isolates, using the MLST database available at the following address
109 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>) (PubMLST-Public databases for molecular typing
110 and microbial genome diversity, nd). In addition, the genetic background was reconstructed
111 by comparing the gene sequence using the Mauve tool [8]. A BLASTn alignment was
112 performed with the closest sequences, allowing us to deduce the plasmid type, which was then
113 confirmed using Plasmid finder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) [34].
114 Circular representations of the genome and plasmid were produced using the CGview server
115 [32].

116

117 **3. Results**

118 **3.1 Patient information and strain isolation**

119 Two isolates of *E. faecium* (*E. faecium* Q7358 and *E. faecium* Q7360) were isolated on
120 enriched media from pus samples taken from two different patients with SSI, in obstetrics-
121 gynaecology after emergency caesarean deliveries. The two patients were aged 42 and 27,
122 respectively, and had an immunodepression profile (Table 1). All patients received first
123 generation cephalosporin for antibioprohylaxis prior to surgery and were put on triple
124 therapy consisting of cefalexin, bactrim, and gentamicin upon hospitalisation. Isolates were
125 identified using the Microflex LT MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics,
126 Bremen, Germany) after transport to the IHU-Méditerranée Infection, Marseille.

127 **3.2. Antimicrobial resistance and molecular characterisation**

128 The two strains were resistant to most antibiotics tested (Table 1) and were susceptible
129 only to pristinamycin, teicoplanin, doxycycline, minocycline, and linezolid. The MIC was
130 only tested against vancomycin. *E. faecium* Q7358 and *E. faecium* Q7360 were highly
131 resistant, with an MIC exceeding 256 mg/L. According to the RT-PCR results, the resistance
132 of these strains is due to the expression of the vancomycin resistance gene, *vanA*.

133 **3.3. Environment and genetic organisation of *vanA***

134 The genetic organisation of plasmid EF_35_Algeria is presented in Figure 1. It is a *rep17*-
135 type plasmid. This plasmid was obtained by reconstituting and reorganising the genome
136 contigs obtained by complete sequencing, performed on the Mauve tool, followed by
137 alignment on the NCBI database of BLASTn matches of the contigs assembled *de novo* using
138 the previously characterised plasmids pJEG40, VB13828, pRUM*rep17* (GenBank accession
139 number KX810025, CP071960, MW821651), respectively. *In silico* typing of plasmid
140 replicons from the two *E. faecium* isolates was performed using BLASTn and the gram-
141 positive database available on PlasmidFinder. The results are illustrated in the CGview

142 circular representation (Figure 1A). The genetic environment of the *vanA* operon was also
143 analysed. This 10 851-pb genetic material was analysed by Mauve for contig reconstruction
144 and alignment based on BLASTn matches of *de novo* assembled contigs (Figure 1B).

145 **3.4. Genome comparison with closely related species**

146 Phylogenetic analysis based on a comparison of the genomes of different species of *E.*
147 *faecium* enabled us to illustrate a circular representation (Figure 2). The *E. faecium* Q7358
148 and *E. faecium* Q7360 genomic sequences are closely linked, with the two circles
149 corresponding to each of the genomes, as shown in the figure legend. This analysis confirms
150 the identity between two strains Q7358 and Q7360 indicated by Tygs, as reported above. It
151 also allows us to confirm the degraded phylogenetic relationship between four other genomes
152 of different strains of *E. faecium*, based on a phylogenetic tree.

153

154 **4. Discussion**

155 The first clinical isolate of VRE was detected in 2006 from a *E. faecalis* strain in a
156 urine sample at the Beni-Messous university hospital in Algiers [1]. Since there is lack of
157 information on the molecular mechanism underlying this resistance in this country, VRE has
158 aroused particular interest [2, 3, 7, 35]. [7] described the first detection of *vanA* positive *E.*
159 *faecium* clonal complex 17 in hospital wastewater in Algeria.

160 In this study, we report the complete genome sequence of two strains of *E. faecium*, Q7358
161 and Q7360, of clinical origin, isolated from SSI after caesarean section. The resistance profile
162 of both *E. faecium* strains shows resistance to the majority of tested antibiotics, such as
163 penicillin, oxacillin, amoxicillin, ceftriaxone, clindamycin, erythromycin, gentamicin,
164 vancomycin, and teicoplanin. The emergence of VRE has raised a number of questions, in
165 particular in relation to the origin of this bacterium. We immediately dismissed the probable
166 dietary origin mentioned by several publications, given that avoparcin is not used in Algeria

167 [1]. At no time during the questioning of patients and studying their medical records was it
168 indicated that they had taken vancomycin, although the antibiotic selection from the patients'
169 digestive flora appears to be the most likely hypothesis. The imported origin of the strain is
170 difficult to prove unless an in-depth genetic study is carried out.

171 Based on molecular biology investigations, the results of the genomic system for
172 constructing multiple genome alignments and the TYGS indicated close identity between the
173 two strains of *E. faecium*. They are most likely the same strain, and we suspect hospital
174 transmission from patient 1 to patient 2 with a 21-day delay between the two procedures, even
175 though the patients received probabilistic antibiotic therapy, consisting of cefalexin, bactrim
176 and gentamicin, for four days after the surgical procedure. During the post-partum period,
177 patient 1 developed renal complications and had to undergo dialysis in another hospital
178 department. The pathogen could, therefore, probably have been contracted in these conditions.
179 In addition, both patients also had a predominated maternal pathology, including a BMI > 30,
180 hypertension, and diabetes. Consistent with multiple reports, the majority of VREfm strains
181 were isolated in patients undergoing immunosuppressive chemotherapy or with comorbid
182 conditions such as gastrointestinal disorders, metastatic cancer, polytrauma, or haematological
183 malignancies [4, 26].

184 Analysis of the complete genome of the two strains using different bioinformatics
185 tools revealed that *E. faecium* Q7358 and Q7360 belong to the ST 80 sequence type and to the
186 CC17 complex clonal. Alignment of the full genome sequences of both *E. faecium* strains
187 with the NCBI GenBank database indicated that they carried a plasmid typerep17/pRUM that
188 we have named EF_35_Algeria, reported for the first time in Algeria and Africa. The most
189 closely related plasmid, the *E. faecium* strain Efm008 pJEG040 plasmid, accession number
190 KX810025.1 in the NCBI database, showed 99% coverage and 99.97% identity with our
191 plasmid (Figure 1A). The rep17/pRUM plasmid, discovered for the first time in Australia in

192 2017, carries the operon *vanA*, *ermB* and *aph3* resistance genes, toxin-antitoxin cassette and
193 replicons *rep17*, *rep2* and *US15* [13]. The *rep17/pRUM* replicon of approximately 120-130 kb
194 was previously described between 2002 and 2004 in a Swedish study of a polyclonal group of
195 *E. faecium* [33]. Easily transferable between *E. faecium*, this replicon contains a segregation
196 stability module encoded by a toxin-antitoxin cassette, which promotes the preservation of
197 genes associated with antimicrobial resistance [11]. In particular, it has been shown that
198 *rep17/pRUM* replicons with the cassette are present in a majority of CC17-type strains [29].
199 Furthermore, it is interesting to note that a similar study reporting this same plasmid indicated
200 that it is able to propagate between strains, most likely due to the presence of conjugation-
201 related genes [13]. It has also been reported that plasmid pJEG40 is very similar to plasmid
202 pS177, which transferred high vancomycin resistance to methicillin-resistant *Staphylococcus*
203 *aureus*, likely by co-integration with a conjugative plasmid present in the VRE donor [18].
204 Moreover, as illustrated by the circular representation of the CG view, our plasmid
205 EF_35_Algeria has strong similarity with the plasmid of the *S. aureus* strain WC083,
206 accession number CP092548.1, with coverage of 94%, and 99.94% identity (Figure 1A). The
207 comparison of the homologous regions shared by the different types of plasmids carrying
208 *vanA* (Figure 1B) reveals a similar element between our plasmid (EF_35_Algeria) and other
209 plasmids in the NCBI database (*E. faecium* plasmids pJEG40, *E. faecium* plasmids VB13828,
210 *S. aureus* WC083). In addition to the *aph3* and *ermB* resistance genes found in the *E. faecium*
211 species, the *S. aureus* plasmid carries the *tet(s)* and *aph2* resistance genes.

212 The *vanA* operon is carried by the Tn1546 mobile genetic element of type Tn3 and
213 includes two regulatory genes (*vanRS*) and five genes involved in glycopeptide resistance
214 (*vanHAXYZ*). This transposon is characterised by a high degree of heterogeneity, point
215 mutations, deletions and various insertion sequences [25, 30].

216 Since they were first described in 1986, VRE have been the subject of an increasing
217 number of reports, with remarkable epidemiological differences in various geographical areas.
218 This Tn1546-linked resistance phenotype is found on pRUM plasmids (predominant in the
219 USA), and on Inc18 plasmids (predominant in Europe) [9] [17, 22]. Acquired resistance to
220 vancomycin has mainly been detected in *Enterococcus faecium*, although *Enterococcus*
221 *faecalis* is the main species encountered in human infections. Hospital-adapted VREfm carry
222 variants of the van operon, although the most common and relevant are the *vanA* operon,
223 carried by Tn1546, as indicated by our results, or the *vanB* operon, carried by Tn1549, as
224 described in other studies [24, 28]. However, VREfm type *vanA* was highly resistant to
225 vancomycin and teicoplanin, for which worldwide clonal propagation has been demonstrated,
226 through the spread of the CC17 complex adapted to hospital settings [13, 18]. In Algeria,
227 ST80 has been previously described in Batna in 2018 and 2022, in Algiers in 2021, and in this
228 present study. We described ST80 with CC17, which is the *E. faecium* clone of clinical origin,
229 emerging worldwide. However, Inc18 and pRUM plasmids can harbour resistance genes to
230 many other antibiotics and may contribute to the spread of vancomycin resistance. which is
231 remains unknown and The molecular epidemiology of *vanA*-containing plasmids can differ
232 considerably from one region to another [10].

233 The ability of *E. faecium* to acquire foreign DNA has played a central role in the
234 evolution of drug resistance and adaptation to hospitals in this species. Different
235 recombinations within the core genome of *E. faecium* strains transmitted between these
236 species by horizontal gene transfer involving plasmids, prophages, and genomic clusters are
237 an important driver of the diversity and adaptive evolution of the dynamic *E. faecium* genome
238 [13, 18, 25].

239 Various studies have revealed risk factors, changes, and mechanisms of transmission
240 and therapeutic failure that must now be exploited to inform and guide efforts to limit the

241 evolution and spread of VREfm [6, 10, 27]. New molecular biology techniques and the
242 precision of WGS can reveal the complexity of resistance mechanisms at various levels,
243 enabling a better understanding of this problem and providing evidence of concrete action
244 leading to effective therapeutic solutions.

245 **5. Conclusions**

246 Our study reports for the first time the presence of a pRUM rep17 plasmid named
247 EF_35_Algeria, carrying the Tn1546 of the *vanA* operon, isolated from hospital-acquired,
248 post-caesarean infections. This opportunistic pathogen has long been isolated from hospital-
249 acquired infections and has become resistant to available antibiotic treatments. The use of
250 new molecular biology technology, in particular the use of WGS, as demonstrated in this
251 study, allows for the reliable detection of variations in the genomic sequence and a better
252 understanding of the genetic mechanisms that underpin the evolution and adaptation of this
253 nosocomial pathogen.

254

255 **Author Contributions:** SMD and JMR designed the study; HA provided clinical data and
256 patient information; CB, HB, and LH performed microbiology analyses; CB and SDM drafted
257 the manuscript; CB, HA, HB, LH, JMR, and SMD made corrections and critical revisions. All
258 authors approved the final version of the manuscript.

259 **Acknowledgements:** We are grateful to the patients who participated in the study.

260 **Funding:** This study was supported by the Algerian Ministry of Higher Education and
261 Scientific Research, under No. PRFU D00L04UN230120200023 and by the French
262 Government under the “Investissements d’avenir” programme managed by the Agence
263 Nationale de la Recherche (ANR; Reference: Méditerranée Infection 10-IAHU-03).

264 **Data Availability Statement:** The data presented in this study are provided in this article.

265 **Conflicts of Interest:** The authors have no competing interests to declare.

266 **Sequences accession :** The whole genome sequences (WGS) of both sequenced isolates, *E.*
267 *faecium* EF_35 and *E. faecium* EF_38, are ongoing to be submitted in the genbank database
268 under the Bioproject accession number : JBAIVL000000000 and JBAIVM000000000
269 respectively.

270

Figure legend

271 **Figure 1 a:** Circular representation of the *vanA*-encoding plasmid. **b:** Schematic
272 representation of the genetic environment of the *vanA* gene located on Transposon 1546 and
273 its comparison with the transposon of reference.

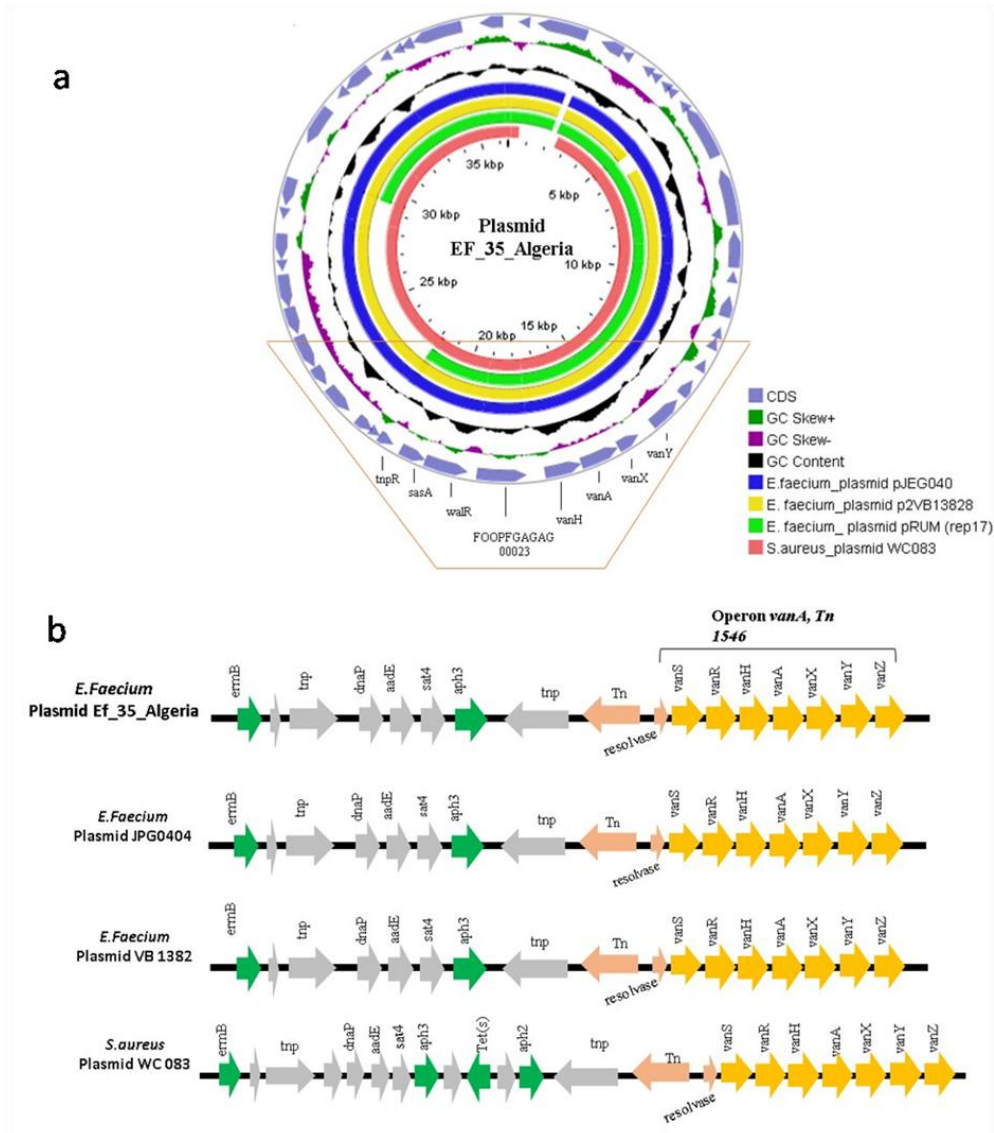
274 **Figure 2:** Circular map of the *E. faecium* EF_35 and *E. faecium* EF_38 chromosome and its
275 genomic comparison with the four closest *Enterococcus faecium* genomes.

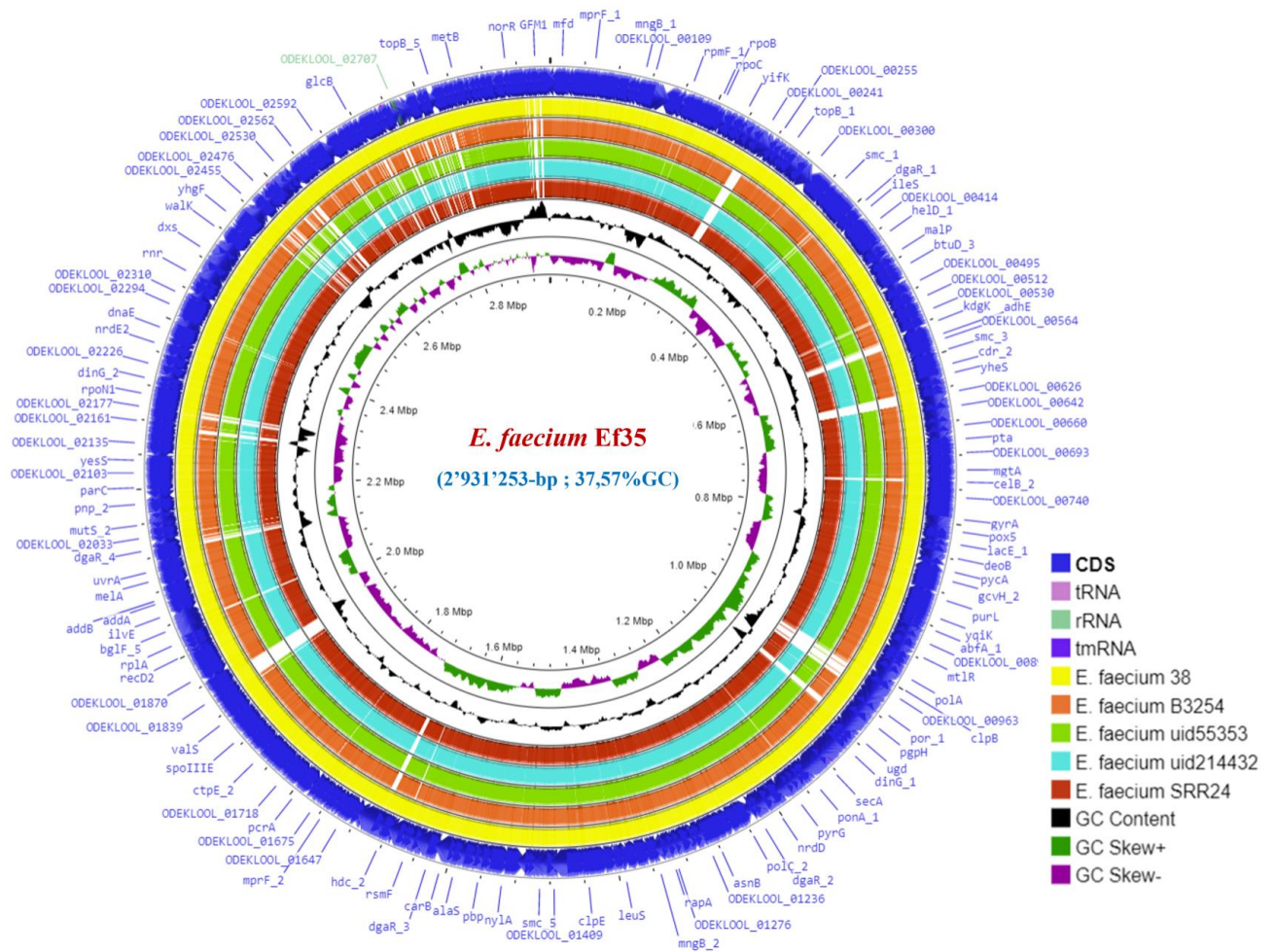
276

277 **Table 1.** Clinical features, resistance phenotype, and genotype of *E. faecium* EF_35 and
 278 EF_38 isolates.

	Patient 1	Patient 2
Metadata associated with the two <i>E. faecium</i> isolates		
Age (years)	42	27
Surgical procedure	caesarean section	caesarean section
Indication	Retroplacental haematoma	foetal distress
Condition	Emergency	Emergency
Antibiotic therapy	Cefacet, Bactrim, gentamicin	Cefacet, Bactrim, gentamicin
CRP (mg/L)	196	86
Nature of sample	Pus	Pus
Date of sampling	08/03/2021	24/03/2021
Strain	<i>Enterococcus faecium</i> EF_35	<i>Enterococcus faecium</i> EF_38
Resistance phenotype	PG, OX, AMX, CRO, CLI, E, GM, VA, FT, RA, FOS,	PG, OX, AMX, CRO, CLI, E, GM, VA, TEC
Vancomycin MIC	> 256 ug/ml	> 256 ug/ml
Genome analysis		
Size (pb)	2 920 940	2 924 737
% GC content	37.76	37.76
Number of contigs	153	173
Aminoglycoside resistance genes	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')</i> ; <i>aac(6')-Ii</i> ; <i>ant(6)-Ia</i> ; <i>aph(3')-III</i>	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')</i> ; <i>aac(6')-Ii</i> ; <i>ant(6)-Ia</i> ; <i>aph(3')-III</i>
Macrolide resistance genes	<i>erm(B)</i>	<i>erm(B)</i>
Vancomycin resistance genes	<i>vanH</i> ; <i>vanA</i> ; <i>vanX</i>	<i>vanH</i> ; <i>vanA</i> ; <i>vanX</i>
Sequence typing (ST)	ST80	ST80

279 CRP: C-reactive-protein; MIC: minimum inhibitory concentration; PG: penicillin G; OX:
 280 oxacillin; AMX: amoxicillin/clavulanic acid; CRO: ceftriaxone; CLI: clindamycin; E:
 281 erythromycin; GM: gentamicin; VA: vancomycin; FT: furanes; RA: rifampicin; FOS:
 282 Fosfomycin. ST: Sequence Type; CC17: Complex Clonal 17.





286

287 **Figure 2.**

References

- 289 1. Aggoune N, Chabani A, Tiouit D, Naim M, Rahal K (2008) Premier cas d'Enterococcus faecalis
290 résistant à la vancomycine en Algérie. Médecine et maladies infectieuses 38:557–558
- 291 2. Aggoune N, Chabani A, Tiouit D, Naim M, Rahal K (2008) First case of vancomycin-resistant
292 Enterococcus faecalis in Algeria. Medecine et Maladies Infectieuses 38:557–558
- 293 3. Benammar S, Pantel A, Aujoulat F, Benmehidi M, Courcol R, Lavigne J-P, Romano-Bertrand S,
294 Marchandin H (2018) First molecular characterization of related cases of healthcare-associated
295 infections involving multidrug-resistant Enterococcus faecium vanA in Algeria. Infection and
296 Drug Resistance 11:1483
- 297 4. Benamrouche N, Guettou B, Henniche FZ, Assaous F, Laouar H, Ziane H, Djennane F, Tiouit D,
298 Bentchouala C, Yamouni F (2021) Vancomycin-resistant Enterococcus faecium in Algeria:
299 phenotypic and genotypic characterization of clinical isolates. The Journal of Infection in
300 Developing Countries 15:95–101
- 301 5. Boutefnouchet C, Aouras H, Khennouchi NCEH, Berredjem H, Rolain JM, Hadjadj L (2023)
302 Algerian post-caesarean surgical site infections: a cross-sectional investigation of the
303 epidemiology, bacteriology, and antibioresistance profile. American Journal of Infection Control
- 304 6. Brodrick HJ, Raven KE, Harrison EM, Blane B, Reuter S, Török ME, Parkhill J, Peacock SJ
305 (2016) Whole-genome sequencing reveals transmission of vancomycin-resistant Enterococcus
306 faecium in a healthcare network. Genome medicine 8:1–9
- 307 7. Cherak Z, Bendjama E, Moussi A, Benbouza A, Grainat N, Rolain J-M, Loucif L (2022) First
308 detection of vanA positive Enterococcus faecium clonal complex 17 in hospital wastewater in
309 Algeria: an epidemiological report. New Microbes and New Infections 47:100977
- 310 8. Darling AE, Mau B, Perna NT (2009) Progressive Mauve: Multiple alignment of genomes with
311 gene flux and rearrangement. arXiv preprint arXiv:0910.5780
- 312 9. Freitas AR, Tedim AP, Francia MV, Jensen LB, Novais C, Peixe L, Sánchez-Valenzuela A,
313 Sundsfjord A, Hegstad K, Werner G (2016) Multilevel population genetic analysis of vanA and
314 vanB Enterococcus faecium causing nosocomial outbreaks in 27 countries (1986–2012). Journal
315 of Antimicrobial Chemotherapy 71:3351–3366
- 316 10. Gorrie C, Higgs C, Carter G, Stinear TP, Howden B (2019) Genomics of vancomycin-resistant
317 Enterococcus faecium. Microbial genomics 5:
- 318 11. Grady R, Hayes F (2003) Axe–Txe, a broad-spectrum proteic toxin–antitoxin system specified
319 by a multidrug-resistant, clinical isolate of Enterococcus faecium. Molecular microbiology
320 47:1419–1432
- 321 12. Gupta SK, Padmanabhan BR, Diene SM, Lopez-Rojas R, Kempf M, Landraud L, Rolain J-M
322 (2014) ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in
323 bacterial genomes. Antimicrobial agents and chemotherapy 58:212–220
- 324 13. van Hal SJ, Espedido BA, Coombs GW, Howden BP, Korman TM, Nimmo GR, Gosbell IB,
325 Jensen SO (2017) Polyclonal emergence of vanA vancomycin-resistant Enterococcus faecium in
326 Australia. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 72:998–1001

- 327 14. Hamidi M, Ammari H, Ghaffor M, Benamrouche N, Tali-Maamar H, Tala-Khir F, Younsi M,
328 Rahal K (2013) Émergence d'Enterococcus faecium résistant aux glycopeptides en Algérie: à
329 propos d'un cas. *Annales de Biologie Clinique*. pp 104–106
- 330 15. Hansen SK, Andersen L, Detlefsen M, Holm A, Roer L, Antoniadis P, Skov MN, Hammerum
331 AM, Kemp M (2021) Using core genome multilocus sequence typing (cgMLST) for
332 vancomycin-resistant Enterococcus faecium isolates to guide infection control interventions and
333 end an outbreak. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 24:418–423
- 334 16. Hollenbeck BL, Rice LB (2012) Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus.
335 *Virulence* 3:421–569
- 336 17. Hsieh Y-C, Lee W-S, Ou T-Y, Hsueh P-R (2010) Clonal spread of CC17 vancomycin-resistant
337 Enterococcus faecium with multilocus sequence type 78 (ST78) and a novel ST444 in Taiwan.
338 *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* 29:25–30
- 339 18. Kos VN, Desjardins CA, Griggs A, Cerqueira G, Van Tonder A, Holden MT, Godfrey P, Palmer
340 KL, Bodi K, Mongodin EF (2012) Comparative genomics of vancomycin-resistant
341 Staphylococcus aureus strains and their positions within the clade most commonly associated
342 with Methicillin-resistant S. aureus hospital-acquired infection in the United States. *MBio*
343 3:e00112-12
- 344 19. Lalaoui R, Djukovic A, Bakour S, Hadjadj L, Sanz J, Salavert M, López-Hontangas JL, Sanz
345 MA, Ubeda C, Rolain J-M (2019) Genomic characterization of Citrobacter freundii strains
346 coproducing OXA-48 and VIM-1 carbapenemase enzymes isolated in leukemic patient in Spain.
347 *Antimicrobial Resistance & Infection Control* 8:1–6
- 348 20. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P (1988) Plasmid-mediated resistance to vancomycin
349 and teicoplanin in Enterococcus faecium. *New England Journal of Medicine* 319:157–161
- 350 21. Li J, Yang L, Huang X, Wen Y, Zhao Q, Huang X, Xia J, Huang Y, Cao S, Du S (2022)
351 Molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors of Enterococcus
352 faecalis from ducks at slaughterhouses. *Poultry Science* 101:101646
- 353 22. Malathum K, Singh KV, Weinstock GM, Murray BE (1998) Repetitive sequence-based PCR
354 versus pulsed-field gel electrophoresis for typing of Enterococcus faecalis at the subspecies
355 level. *Journal of Clinical Microbiology* 36:211–215
- 356 23. Meier-Kolthoff JP, Göker M (2019) TYGS is an automated high-throughput platform for state-
357 of-the-art genome-based taxonomy. *Nature communications* 10:2182
- 358 24. Naser SM, Vancanneyt M, Hoste B, Snauwaert C, Vandemeulebroecke K, Swings J (2006)
359 Reclassification of Enterococcus flavescens Pompei et al. 1992 as a later synonym of
360 Enterococcus casseliflavus (ex Vaughan et al. 1979) Collins et al. 1984 and Enterococcus
361 saccharominimus Vancanneyt et al. 2004 as a later synonym of Enterococcus italicus Fortina et
362 al. 2004. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 56:413–416
- 363 25. Palmer KL, van Schaik W, Willems RJ, Gilmore MS (2014) Enterococcal genomics.
364 *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection* [internet]
- 365 26. Raza T, Ullah SR, Mehmood K, Andleeb S (2018) Vancomycin resistant Enterococci: A brief
366 review. *J Pak Med Assoc* 68:768–772
- 367 27. Reuter S, Ellington MJ, Cartwright EJ, Köser CU, Török ME, Gouliouris T, Harris SR, Brown
368 NM, Holden MT, Quail M (2013) Rapid bacterial whole-genome sequencing to enhance
369 diagnostic and public health microbiology. *JAMA internal medicine* 173:1397–1404

- 370 28. Reynolds PE, Courvalin P (2005) Vancomycin resistance in enterococci due to synthesis of
371 precursors terminating in D-alanyl-D-serine. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49:21–25
- 372 29. Rosvoll TC, Pedersen T, Sletvold H, Johnsen PJ, Sollid JE, Simonsen GS, Jensen LB, Nielsen
373 KM, Sundsfjord A (2010) PCR-based plasmid typing in *Enterococcus faecium* strains reveals
374 widely distributed pRE25-, pRUM-, pIP501- and pHT β -related replicons associated with
375 glycopeptide resistance and stabilizing toxin–antitoxin systems. *FEMS Immunology & Medical
376 Microbiology* 58:254–268
- 377 30. Sivertsen A, Billström H, Melefors Ö, Liljequist BO, Wisell KT, Ullberg M, Özenci V,
378 Sundsfjord A, Hegstad K (2014) A multicentre hospital outbreak in Sweden caused by
379 introduction of a vanB2 transposon into a stably maintained pRUM-plasmid in an *Enterococcus
380 faecium* ST192 clone. *PLoS One* 9:e103274
- 381 31. Stogios PJ, Savchenko A (2020) Molecular mechanisms of vancomycin resistance. *Protein
382 Science* 29:654–669
- 383 32. Stothard P, Grant JR, Van Domselaar G (2019) Visualizing and comparing circular genomes
384 using the CGView family of tools. *Briefings in Bioinformatics* 20:1576–1582
- 385 33. Sun L, Xu J, Wang W, He F (2020) Emergence of vanA-type vancomycin-resistant
386 *Enterococcus faecium* ST 78 strain with a rep2-type plasmid carrying a Tn1546-like element
387 isolated from a urinary tract infection in China. *Infection and Drug Resistance* 949–955
- 388 34. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM,
389 Larsen MV (2012) Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *Journal of
390 antimicrobial chemotherapy* 67:2640–2644
- 391 35. Zerrouki H, Rebiahi S-A, Hadjadj L, Ahlem F, Elhabiri Y, Sedrati T, Rolain J-M, Diene SM
392 (2021) High frequency and diversity of Vancomycin-resistant Enterococci (VRE) in Algerian
393 healthcare settings. *Infection, Genetics and Evolution* 92:104889
- 394 36. Galaxy. <https://usegalaxy.org.au/>. Accessed 12 Feb 2023
- 395 37. PubMLST - Public databases for molecular typing and microbial genome diversity. In:
396 PubMLST. <https://pubmlst.org/>. Accessed 12 Feb 2023
- 397