



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :
Safa SALMI et Meryem SAYAH

Le : mercredi 10 juillet 2019

Thème **Etude de la contamination bactérienne de** **l'environnement hospitalier** **(Hôpital de Sidi Okba -Biskra-)**

Jury:

| | | | | |
|------|-----------------|-----|----------------------|------------|
| M. | Toufik AMAIRI | MAA | Université de Biskra | Président |
| Mme. | Souad BABA ARBI | MCB | Université de Biskra | Rapporteur |
| M. | Fathi BENBELAID | MCB | Université de Biskra | Examineur |

Année universitaire : 2018 - 2019

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier ALLAH le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

En seconde lieu, nous tenons à remercier notre encadreur Dr. BABA ARBI Souad, d'avoir bien accepté de diriger ce travail, pour sa disponibilité, pour la confiance qu'il a su m'accorder et les conseils précieux qu'il m'a prodigués tout au long de la réalisation de ce projet.

Notre vif remerciement pour les membres du jury à commencer par Mr. AMAIRI

*Qui nous a fait l'honneur de présider notre jury
Mr. BENBELAID d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.
Nous adressons nos remerciements A la direction de l'hôpital pour son accueil et les responsables des services à l'hôpital Sidi Okba qui bien voulu autoriser ce travail*

Nous adressons nos remerciements à toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

Ma chère maman Yamina, La personne la plus chère à mon cœur qui m'a supportée vaillamment pas à pas tout au long de ma vie, Les mots ne suffisent pas pour exprimer toute l'affection que j'éprouve pour toi ; je te dois ma réussite, mon éducation, ma fierté. Tu m'as aimé très profondément et tu as été toujours une mère idéale. Tu es la seule qui comprend ma vie : Je te demande pardon et encore une fois Merci.

Mon cher père Boubaker, Les mots me manquent pour exprimer toute ma fierté qui n'égale que l'accomplissement total de ton devoir de père. Que se travail soit une récompense pour tout ce que vous avait fait pour moi.

Mes chers frères Nour Eddine et Ali, Je ne peux exprimer à tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers vous.

Ma chère sœur Nourhan, je t'aime beaucoup.

Mon chère copine et binôme Safa, Qui est pour moi une vraie sœur.

Mes chères copines Marame, Hanane et Anouar, Merci pour les bons moments qu'on a passés ensemble.

Toute la promotion de MFA

Toute ma famille, Et surtout mes tantes Mabrouka et Fatima merci pour tout ce que vous avez fait pour moi. Tous ceux qui me sont trop chers et que j'ai omis de citer. Sans oublier tous ceux qui m'ont aidé de loin ou de près

Meryem

Dédicace

A l'aide du Dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie à :

Mon cher père (Mohammed) : La plus chère personne dans ma vie, la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le Bonheur de mon existence qui a sacrifié toute sa vie afin de me voir devenir ce que je suis, Je souhaite que Dieu me le garde

Ma chère maman (Fatima), celui qui a été un pilier solide et incontournable pour mon parcours, et qui m'a toujours soutenu en toutes circonstances et qui me donne de la force et la volonté d'avancer, que Dieu vous donne la santé et longue vie.

Mon seul frère (Aymen) ce que je lui souhaite réussit et persévérance.

À mes chères sœurs : marwa et Yasmine qui m'ont donné l'espoir de continuer ce travail.

A ma nièce : (Iline) Que ce travail soit l'occasion de vous exprimer ma profonde affection.

À tous les membres de mes familles : salmi.

À mes chères amies, pour tous les moments que nous avons partagés.

Spécial dédicace à ma binôme : (Meryem) que nous avons partagés ensemble les moments les plus difficiles et nous avons toujours été ensemble.

A ma chère copine : (Hanane) qui étions avec moi depuis mon enfance jusqu'à maintenant que Dieu préserve notre amitié

À toutes les personnes que j'aime et toute la promotion de master 2 de l'année universitaire 2018/2019 et à tous ceux qui m'ont apporté d'aide de près ou de loin.

Safa

Sommaire

Remerciements

Dédicace

Sommaire

Liste des tableaux Erreur ! Signet non défini.

Liste des figures Erreur ! Signet non défini.

Liste des abréviations Erreur ! Signet non défini.

Introduction générale 1

Première partie : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. L'ENVIRONNEMENT HOSPITALIER

1.1. Définition de l'environnement hospitalier 2

1.2. Principaux germes pouvant être trouvés dans l'environnement 2

1.3. Les facteurs responsables de survie des bactéries dans l'environnement hospitalier
..... 2

1.4. Contamination de l'environnement par les bactéries 3

1.4.1. La contamination des surfaces 3

1.4.2. La contamination de l'air 3

1.5. D'origine de contamination de l'environnement hospitalier 3

Chapitre 2. LES BACTÉRIES RESPONSABLES DES INFECTIONS

NOSOCOMIALES

2.1. Définition des infections nosocomiales 4

2.2. Réservoirs et sources 4

2.2.1. Les infections d'origine « endogène » 4

2.2.2. Les infections d'origine « exogène », 4

2.3. Mécanismes de transmission 4

2.4. Les bactéries responsables des infections nosocomiales 5

2.4.1. Les Cocci Gram positif 5

| | |
|--|---|
| 2.4.1.1. Les <i>staphylocoques</i> | 5 |
| 2.4.2. Les bacilles Gram négative | 6 |
| 2.4.2.1. Les <i>entérobactéries</i> | 6 |
| a. <i>Escherichia coli</i> | 6 |
| b. <i>Klebsiella-Enterobacter-Serratia</i> | 7 |
| 2.4.2.2. Bacilles Gram négatifs non fermentaires | 8 |
| a. <i>Pseudomonas</i> | 8 |

Deuxième partie : PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 3. MATERIELS ET METHODES

| | |
|---|-----------|
| 3.1. Cadre d'étude..... | 10 |
| 3.2. Matériel..... | 10 |
| 3.3. Méthodes..... | 10 |
| 3.3.1. Réalisation des prélèvements | 10 |
| 3.3.2. L'enrichissement..... | 10 |
| 3.3.3. Isolement et purification | 11 |
| 3.3.4. Conservaton des souches | 11 |
| 3.3.5. Identification phénotypique | 11 |
| 3.3.5.1. Caractère macroscopique | 12 |
| 3.3.5.2. Examen microscopique | 12 |
| a. Coloration de Gram | 12 |
| b. Teste oxydase | 13 |
| c. Recherche de catalase | 13 |
| d. Mannitol-mobilité..... | 14 |
| 3.3.5.3. Identification biochimique par la galerie API 20 | 14 |
| a. Galerie API 20 E..... | 14 |
| b. Galerie API 20 NE..... | 16 |
| 3.3.5.4. Etude de la sensibilité aux antibiotiques | 18 |

| | |
|---|----|
| a. Définition et principe | 18 |
| b. Réalisation pratique de l'antibiogramme..... | 18 |
| c. Lecture | 19 |

Chapitre 4. RESULTATS ET DISCUSSION

| | |
|---|------------------------------------|
| 4.1. Prélèvement | 21 |
| 4.2. Analyse des prélèvements au laboratoire | 21 |
| 4.2.1. Aspect macroscopique des isolats..... | 22 |
| 4.2.2. Examen microscopique | 25 |
| 4.2.2.1. Coloration de Gram..... | 25 |
| 4.2.2.2. Pourcentage des souches isolées | 26 |
| 4.2.3. Identification biochimique | 27 |
| 4.2.3.1. Recherche de catalase..... | 27 |
| 4.2.3.2. Test oxydase | 28 |
| 4.2.3.3. Test mannitol-mobilité | 29 |
| 4.2.3.4. Identification par la galerie API 20 | 33 |
| a. Galerie API 20 E..... | 33 |
| b. Galerie API 20 NE..... | 36 |
| 4.3.3. Etude de la sensibilité et la résistance des souches aux antibiotiques (L'antibiogramme)..... | 41 |
| Conclusion..... | Erreur ! Signet non défini. |
| Références bibliographiques | 46 |
| Annexes | |
| Résumés | |

Liste des Tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1. Les antibiotiques testés..... | 19 |
| Tableau 2. Les résultats des prélèvements bactériologiques..... | 21 |
| Tableau 3. Aspect de culture des bactéries trouvées sur gélose bromocrésol pourpre (BCP), Hiktoen et Chapman (B : milieu BCP, H : Hiktoen, C : Chapman, A : air, h : Humide, S : sèche, IF : médecine interne femme, IH : médecine interne homme, M : maternité, P : pédiatre, L : laboratoire, U : urgence). | 22 |
| Tableau 4. Les résultats des tests biochimique (catalase, oxydase et mannitol-mobilité) des isolats..... | 29 |
| Tableau 5. Répartition des CGP et BGN | 30 |
| Tableau 6. Le pourcentage et la répartition des souche selon les services. | 31 |
| Tableau 7. La répartition des souches selon les sites des prélèvements. | 33 |
| Tableau 8. Résultat de la galerie API 20E de la souche (H.S.22)..... | 34 |
| Tableau 9. Résultat de la galerie API 20E de la souche (B.S.25). | 34 |
| Tableau 10. Résultat de la galerie API 20E de la souche (B.h.19). | 35 |
| Tableau 11. Résultat de la galerie API 20E de la souche (H.S.22)..... | 36 |
| Tableau 12. Résultat de la galerie API 20NE de la souche (H.S.13)..... | 37 |
| Tableau 13. Résultat de la galerie API 20NE de la souche (B.S.24). | 37 |
| Tableau 14. Résultat de la galerie API 20NE de la souche (B.S.10). | 38 |
| Tableau 15. Résultat des tests biochimique classique de la souche (C.S.10). | 39 |
| Tableau 16. Résultat des tests biochimique classique de la souche (C.S.24). | 40 |
| Tableau 17. Résultat de l'antibiogramme des souches isolées. | 42 |

Liste des Figures

| | |
|--|----|
| Figure 1. Aspect macroscopique des cultures bactérienne sur le milieu bromocrésol..... | 24 |
| Figure 2. Aspect macroscopique des cultures bactérienne sur le milieu Chapman..... | 24 |
| Figure 3. Aspect macroscopique des cultures bactérienne sur le milieu Hektoen. | 25 |
| Figure 4. Observation microscopique des Cocci à Gram positive | 25 |
| Figure 5. Observation microscopique des bacilles à Gram négative isolé à partir service maternité (B.S.25). | 26 |
| Figure 6. Observation microscopique des bacilles à Gram négative isolé à partir de service d'urgence de bloc chirurgicale (H.S.30). | 26 |
| Figure 7. Pourcentage des souches CGP et BGN isolées..... | 27 |
| Figure 8. La formation de bulles de gaz de test catalase de la souche (B.S.13)..... | 28 |
| Figure 9. Observation du résultat positif de test oxydase de la souche (H.S.30). | 28 |
| Figure 10. Résultats de test mannitol-mobilité..... | 29 |
| Figure 11. La répartition des souches dans l'environnement hospitalier..... | 31 |
| Figure 12. Graphique représente le pourcentage et la répartition des souches selon les services. | 32 |
| Figure 13. Graphique représente le pourcentage et la répartition des souches selon les sites des prélèvements. | 33 |
| Figure 14. Résultat de la galerie API 20 E de la souche (H.S.22). | 34 |
| Figure 15. Résultat de la galerie API 20 E de la souche (B.S.25)..... | 35 |
| Figure 16. Résultat de la galerie API 20 E de la souche (B.h.19). | 36 |
| Figure 17. Résultat de la galerie API 20 E de la souche (H.S.9). | 36 |
| Figure 18. Résultats de la galerie API 20 NE de la souche (H.S.13). | 37 |
| Figure 19. Résultats de la galerie API 20 NE de la souche (B.S.24). | 38 |
| Figure 20. Résultats de la galerie API 20 NE de la souche (B.S.10). | 39 |
| Figure 21. Résultat des tests biochimique classique de la souche (C.S.10). | 40 |
| Figure 22. Résultat des tests biochimique classique de la souche (C.S.24). | 41 |
| Figure 23. Graphique représente le pourcentage et la répartition des souches. | 41 |
| Figure 24. Représentation graphique des profils des souches isolées vis-à-vis des antibiotiques testés. | 43 |

Liste des abréviations

| | |
|-----------------|---|
| ADH : | Arginine dihydrolase |
| ADI : | Acide adipique |
| AML: | Amoxicilline |
| AMY: | Amygdaline |
| API 20: | Analytical profile index 20 Non Entérobactéries |
| NE: | |
| API 20E: | Analytical profile index 20E (E= Entérobactéries) |
| ARA: | L-arabinose |
| ATB: | Antibiotique |
| AUG: | Amoxicilline acide clavulanique |
| BCP : | La gélose bromocrésol pourpre |
| BGN : | Bacille Gram négatif |
| BHIB : | Bouillon Cœur cerveau |
| C : | Chloramphénicol |
| C° : | Degrés Celsius |
| CAP : | Acide caprique |
| CGP : | Cocci Gram positif |
| CIT : | Citrate de sodium |
| CN : | Gentamicine |
| ESC : | Esculine citrate de fer |
| GEL : | Gélatine |
| GLU : | Glucose |
| GN : | Gélose nutritive |
| GNT : | Potassium gluconate |
| H2S : | Sulfure d'hydrogène |
| HK : | Hektoen |
| IN : | Infection Nosocomiale |
| IND : | Indole |
| LDC : | Lysine décarboxylase |
| MAL : | D-maltose |
| MAN : | D-mannitol |
| MEL : | D-melibiose |

| | |
|---------------|---|
| M-H : | Milieu Muller Hinton pour l'antibiogramme |
| MLT : | Acide malique |
| N2 : | Azote |
| NA : | Acide nalidixique |
| NAG : | N-acétyl-glucosamine |
| NIT : | Nitrate réductase |
| NO2: | Nitrites |
| NO3: | Nitrates |
| O2: | Oxygène |
| ODC: | Ornithine decarboxylase |
| ONPG: | Ortho-Nitrophényl- β -galactoside |
| OX: | Oxydase |
| PAC: | Acide phénylacétique |
| S: | Streptomycin |
| S L: | Service de laboratoire |
| S M: | Service maternité |
| S MIF: | Service médecine interne femme |
| S MIH: | Service médecine interne homme |
| S P: | Service pédiatre |
| S U: | Service urgence |
| SAC: | D-saccharose |
| TRP: | L-tryptophane |
| URE: | Uréase |
| VP: | Vogues Proskauer |

Introduction générale

L'hôpital est un lieu où l'on traite mais c'est également un lieu où le risque d'infection est très important et où les germes deviennent de plus en plus résistants. De ce fait, les infections contractées au niveau de l'hôpital sont reconnues comme des problèmes majeurs de santé publique de par leur fréquence, leur coût et leur gravité qui touche aussi bien les patients et leurs entourages que l'ensemble des professionnels de santé (Chibi, 2015).

À l'hôpital, les surfaces susceptibles d'entrer en contact avec le patient soit directement, soit indirectement par l'intermédiaire de dispositifs médicaux ou les mains des personnes peuvent constituer des réservoirs microbiens. Ces surfaces sont régulièrement colonisées par des microorganismes qui sont d'origines diverses et peuvent être issus de patients, du personnel soignant ou des visiteurs. Elles constitueraient donc une niche écologique de bactéries multirésistantes pouvant être un réservoir à partir duquel différentes infections peuvent se développer (Méité et al., 2010).

L'environnement hospitalier est largement contaminé par des micro-organismes d'origine humaine ou spécifiquement environnementaux. Cette contamination varie qualitativement et quantitativement dans le temps, d'un établissement à un autre et, au sein d'un même établissement, en fonction des services, des patients, des soins et techniques pratiqués. Les microorganismes présents dans l'environnement hospitalier sont extrêmement variés (bactéries, levures, champignons filamenteux, virus et parasites) et peuvent appartenir aussi bien aux espèces opportunistes qui ne manifestent leur virulence que sur un organisme dont les défenses immunitaires sont affaiblies, qu'aux espèces habituellement pathogènes pour l'homme (Cavallo et al., 2002).

La présence d'un micro-organisme dans l'environnement hospitalier n'est pas une condition suffisante pour l'impliquer dans la survenue d'une infection. Celle-ci nécessite l'association de plusieurs facteurs liés au micro-organisme, à la voie de transmission, à la porte d'entrée et à la réceptivité de l'hôte (Cavallo et al., 2002).

L'objectif de cette étude est de :

- ✓ Recherche et identification des bactéries de l'environnement hospitalier (surface, air) qui peuvent causer des infections.
- ✓ Évaluation de la qualité d'hygiène dans l'environnement hospitalier.

Partie bibliographique

Chapitre 1

L'environnement hospitalier

1.1. Définition de l'environnement hospitalier

Le terme d'environnement hospitalier regroupe habituellement l'air, l'eau, les surfaces, le linge, les aliments, les dispositifs médicaux et les déchets (Cavallo et al., 2002) ; qui sont susceptibles d'entrer en contact avec le patient, les visiteurs et le personnel d'une structure d'hospitalisation (Bouaziz et Ramdane, 2006).

1.2. Principaux germes pouvant être trouvés dans l'environnement

L'environnement hospitalier est largement contaminé par des micro-organismes d'origine humaine ou spécifiquement environnementaux (Weber et Rutala, 1997).

Les microorganismes présents dans l'environnement hospitalier sont extrêmement variés (bactéries, levures, champignons filamenteux, virus et parasites) et peuvent appartenir aussi bien aux espèces opportunistes qui ne manifestent leur virulence que sur un organisme dont les défenses immunitaires sont affaiblies, qu'aux espèces habituellement pathogènes pour l'homme (CTIN, 2002).

Parmi ces microorganismes, les bactéries jouent un rôle potentiel dans les infections hospitalières (Debabza, 2015) :

- Les saprophytes qui vivent naturellement dans le milieu extérieur comme *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Legionella*, *Bacillus* (Lionel, 2003).
- Les commensaux de l'être humain, qui sont des " Parasites " facultatifs et appartiennent à la flore cutanée, digestive ou respiratoire, par exemple : *E. coli*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, ils peuvent d'ailleurs servir d'indicateurs de contamination dans l'environnement (Lionel, 2003).
- Les pathogènes spontanés pour l'être humain, tels : *Salmonella*, *Yersinia*, *Listeria* (Lionel, 2003).

1.3. Les facteurs responsables de survie des bactéries dans l'environnement hospitalier

La flore retrouvée sur les surfaces dépend de plusieurs facteurs comme l'activité humaine qui entraîne un apport de micro-organismes par le patient lui-même, par les soignants et par les visiteurs (Barbut, 2003).

La contamination des surfaces dépend, outre de la qualité du bionettoyage, de nombreux facteurs liés au microorganisme : sa durée de vie sur un support inerte (qui varie en fonction de la matière, de la température, de la dessiccation), de son adhérence à la surface, de sa

capacité à produire un biofilm et de sa capacité à résister aux conditions défavorables (sporulation) (Barbut, 2003).

1.4. Contamination de l'environnement par les bactéries

1.4.1. La contamination des surfaces

Présence de microorganismes sur une des surfaces (corps humain ou objet) sans invasion des tissus ou sans réaction physiologique (site web).

1.4.2. La contamination de L'air

Les micro-organismes de l'air sont généralement véhiculés par des supports de taille variable : poussières (10 à 100 μm), gouttelettes et microgouttelettes émises par les voies respiratoires humaines ou par aérosolisation (10 à 1 000 μm) et noyaux de condensation (*droplet nuclei*) issus de l'évaporation des gouttelettes (2 à 5 μm) (Hajjar et al., 2000).

1.5. D'origine de contamination de l'environnement hospitalier

Il s'agit de l'homme ou de son environnement :

➤ L'homme

Il est, soit le patient malade, soit le patient colonisé (sans signes de maladie ou porteur asymptomatique), mais le personnel et les visiteurs peuvent également être en cause. Les sites propices à jouer ce rôle de réservoir sont : la peau (mains, poignets, périnée, plaies cutanées ...), les muqueuses (rhinopharynx ...), les cheveux et les sécrétions pathologiques (Lionel H, 2003).

➤ L'environnement

Il joue un rôle de gîte épidémiologique par le biais des surfaces (poignées – robinets - téléphones ...) des objets (matériel médico -chirurgical), des zones humides (siphon des lavabos et douches, vases de fleurs ...) et parfois, paradoxalement, des désinfectants (Lionel H, 2003).

Chapitre 2

Les bactéries responsables des infections nosocomiales

2.1. Définition des infections nosocomiales

Le terme nosocomial, vient du grec « nosos » signifiant maladie et secondairement de « nosokomeone » qui signifie hôpital ; il qualifie ce qui se rapporte à ce milieu, ce qui se contracte lors d'un séjour hospitalier (Margot et Chantal, 2009).

L'infection nosocomiale est une Infection acquise dans le cadre d'une activité de soins, qu'elle soit ambulatoire ou hospitalière. Elle est généralement acquise plus de 48h après l'admission (Menzinger et *al*, 2008).

2.2. Réservoirs et sources

Le réservoir d'un agent infectieux est l'endroit où il maintient sa présence en se multipliant. Ce réservoir peut être humain, animal, environnemental ou mixte. La source est le lieu de contact entre l'agent infectieux et l'hôte (SFAR et SRLF, 2009).

2.2.1. Les infections d'origine « endogène »

Il s'agit de la microflore saprophyte du malade lui-même, constituée des bacilles à Gram négatif et plus accessoirement les levures (*Candida*) qui remplacent les Cocci à Gram positif ou les anaérobies. Les microflores saprophytes colonisent les sites préférentiels chez le malade entraînant une infection de l'appareil urinaire, des plaies opératoires, ou du parenchyme pulmonaire (SFAR, 2002).

2.2.2. Les infections d'origine « exogène », il s'agit :

- Soit d'infections croisées, transmises d'un malade à l'autre par les mains ou les instruments de travail du personnel médical ou paramédical.
- Soit d'infections provoquées par les micro-organismes portés par le personnel soignant.
- Soit d'infections liées à la contamination de l'environnement hospitalier, elle comprend les divers appareillages d'assistance respiratoire et de monitoring par voie intravasculaire, les lavabos, les instruments (stéthoscope, tensiomètre...), les liquides et les tubulures, la nourriture et l'air ambiant (SFAR, 2002).

2.3. Mécanismes de transmission

On peut citer quatre mécanismes de transmission :

➤ L'auto-infection

Le patient s'infecte par ses propres germes de sa flore originale ou de sa microflore remaniée. Les malades auto-infectés constituent une source importante de germes et sont souvent à l'origine d'hétéro-infection (Qassimi, 2010).

➤ **L'hétéro-infection**

Cette infection résulte de la contamination d'un malade par les germes d'un autre malade (Qassimi, 2010).

➤ **La xéno-infection**

Elle est due à l'entrée dans la communauté hospitalière des nouveaux malades, plus rarement de personnel ou des visiteurs porteurs d'une maladie infectieuse (Qassimi, 2010).

➤ **L'exo-infection**

Elle est liée à des erreurs ou à des insuffisances dans les techniques d'asepsie (Qassimi, 2010).

2.4. Les bactéries responsables des infections nosocomiales

Les bactéries représentent la majorité des pathogènes responsables d'infections Nosocomiales (allegranzi B et al., 2011).

2.4.1. Les Cocci Gram positif

2.4.1.1. Les staphylocoques

➤ **Habitat**

Les staphylocoques sont des bactéries fréquemment retrouvées dans l'environnement, l'eau, l'air, et l'aliment, ils sont commensaux des peaux, des muqueuses de l'homme et des animaux. Il colonise préférentiellement les fosses nasales mais aussi d'autres sites cutanés tels que les aisselles et la gorge (Lowy, 1998).

➤ **Caractères bactériologiques**

Les staphylocoques appartiennent à la famille des *Staphylococcaceae* du phylum de

Firmicutes, sont des bactéries Gram positif, aéro-anaérobie facultatif, disposées en diplocoques ou en grappe de raisins, immobiles, non sporulés, catalase-positif, oxydase-négatif (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009).

Ce genre regroupe plus d'une trentaine d'espèces dont : *S. aureus*, *S. epidemidis*, *S. haemolyticus*, sont les plus fréquemment rencontrées en bactériologie clinique (Lowy, 1998).

➤ **Pouvoir pathogène**

Environ 30% de la population héberge *le staphylocoque doré* de manière permanente, il s'agit des porteurs asymptomatiques (VandenBergh et al., 1999). Cette espèce est un pathogène nosocomial important, elle est responsable d'infections cutanées et muqueuses ainsi que des septicémies, le plus souvent acquises au cours des hospitalisations (Prescott et Pastey, 2010 ; Ghernaout, 2013).

2.4.2. Les bacilles Gram négative

2.4.2.1. Les entérobactéries

Les entérobactéries appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*. Sont des bactéries Gram négatif, aéro-anaérobie facultatif de forme bacille, immobiles ou mobiles par ciliature péritriche (Avril et al., 2000). Elle regroupe 130 espèces dont les plus fréquemment rencontrés en bactériologie clinique sont : *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter sp*, *Proteus sp*, *Serratia sp*, *Providencia sp* (Cartier et al., 1996).

a. Escherichia coli

E. coli est l'espèce type du groupe des entérobactéries. Elle est appelée communément « colibacille » (Berche et al., 1988 ; Flandrois, 1997).

➤ Habitat

Bactérie commensale du tube digestif, *E. coli* est l'espèce la plus importante des anaérobies facultatifs de l'intestin.

Caractère bactériologie

E. coli ou colibacille est une bactérie asporulée, mobile grâce à une ciliature péritriche (Avril et al., 2000).

Elle se développe en 24 heures à 37°C sur les milieux gélosés en donnant des colonies rondes, lisses, à bords réguliers, non pigmentées. Sur les milieux lactosés, les colonies sont généralement lactose positif. Sur gélose au sang, elles peuvent être hémolytiques (Avril et al., 2000). *E. coli* possède une catalase mais elle est dépourvue d'oxydase (Avril et al., 2006 ; Flaudrois, 2004).

➤ Pouvoir pathogène

L'*E. coli* est responsables d'infections extra-intestinales (Infections urinaires, Infections abdominales, infections méningées néonatales (*E. coli* k1), septicémies avec choc septique due à l'endotoxine O (Avril et al., 2000).

Il est également le germe préférentiel des infections urinaires. En milieu hospitalier, ces infections sont en rapport essentiellement avec l'utilisation fréquente des sondes urinaires (Isenberg, 1992 ; Eisenstein et Zaleznif, 2000).

b. *Klebsiella-Enterobacter-Serratia*

Le groupe *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* (K.E.S) rassemble plusieurs espèces bactériennes longtemps considérées comme commensales et actuellement responsables d'un grand nombre de complications infectieuses en milieu hospitalier. (Berche et *al.*, 1988 ; Flandrois, 1997 ; Avril et *al.*, 2000).

➤ *Klebsiella*

Habitat

Les espèces du genre *Klebsiella* sont présentes dans le monde entier, en particulier dans les régions tropicales et subtropicales. Elles sont ubiquistes, c'est-à-dire qu'on les rencontre partout, notamment dans les milieux forestiers, le sol, eaux de surface, eaux usées (Janda et Abbott, 2006).

Caractère bactériologique

Les *Klebsiella* sont des bacilles à Gram négatif (coloration bipolaire fréquente), toujours immobiles, très souvent encapsulées (Richard et Grimont, 1992).

Sur les milieux classiques d'isolement pour les entérobactéries (Drigalski, EMB, Hektoen, Mac Conkey) (Le Minor et Véron, 1989 ; Freney et Bollet, 2000).

Les *Klebsiella* sont des bactéries immobiles, non sporulées, aéro-anaérobies, ayant un métabolisme respiratoire et fermentatif, fermentant le glucose avec production de gaz, oxydase négative, catalase positive (Jarlier et Nordman, 2000 ; Nauciel, 2000).

➤ *Enterobacter*

Habitat

Les *Enterobacter* sont des commensaux du tube digestif de l'homme et des animaux. On les trouve dans les eaux, sur le sol, sur la peau et les muqueuses (Avril et *al.*, 2000).

Caractère bactériologique

Les espèces du genre *Enterobacter* sont des bacilles Gram négatif anaérobies facultatifs, ils se déplacent grâce à un flagelle péritriche et sont dotés de pilus de classe 1 (Paterson et *al.*,

2005 ; Hart et *al.*, 2006). Elles se développent en aéro-anaérobiose aux températures mésophiles d'incubation (de 30°C 37°C) (Lehner, 2011).

Les espèces de ce genre présentent les mêmes caractères biochimiques généraux des entérobactéries, elles fermentent le glucose avec production d'acide et de gaz, elles sont rouge méthyle négatives, oxydase négatives, catalase positives et Voges-Proskauer positives (Grimont F et Grimont P. A.D, 2002 ; Lehner, 2011).

➤ *Serratia*

Habitat

Les *Serratia* sont des bactéries ubiquitaires qui se trouvent dans le sol, l'eau, et le tube digestif de l'homme et des animaux. Ce sont parmi les Entérobactéries les plus résistantes aux agents physiques et chimiques (Jean et *al.*, 2002).

Caractère bactériologique

Bacille mobile, donne parfois des colonies pigmentées en rouge (prodigiosine) (Didier, 1998 ; Avril et *al.*, 2000).

Les principaux caractères biochimiques : Lactose (-), ONPG (+), H₂S (-) protéolyse intense et rapide (c'est la seule Entérobactérie hydrolysant facilement la gélatine en 24 heures), lipase (+), DNase (+) (Pilet et *al.*, 1987).

Pouvoir pathogène du groupe K. E. S

Les bactéries K.E.S seraient responsables de près de 10 à 30 % des IN. Leur pathogénicité s'exprime habituellement chez des malades affaiblis. Elles peuvent donner lieu à divers types d'infections : infections broncho-pulmonaires, infections urinaires, infections localisées, septicémies (Berche et *al.*, 1988).

2.4.2.2. Bacilles Gram négatifs non fermentaire

a. *Pseudomonas*

Par définition, les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés, généralement mobiles grâce à une ou plusieurs flagelles polaires, aérobies à métabolisme strictement respiratoire et chimio-organotrophes (Palleroni, 2008).

➤ *Pseudomonas aeruginosa*

Habitat

P. aeruginosa est une espèce bactérienne 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, aliments) et particulièrement en milieu humide (Lister *et al.*, 2009).

Caractère bactériologique

Ce sont des bacilles à Gram négatif, non capsulés, mobiles, son extrême mobilité est dû à une ciliature polaire en général monotriche, cytochrome-oxydase positive (C E A E Q, 2016). Ce sont des bactéries chimio-organotrophes, réduisant les nitrates en nitrites, elles possèdent deux pigments caractéristiques : la Pyoverdine et la Pyocyanine et aussi sont caractérisées par leur résistance aux antiseptiques et aux antibiotiques (Avril *et al.*, 1992).

Pouvoir pathogène

Est une bactérie pathogène opportuniste, on la trouve dans le tube digestive (Fauchère, 2002). Produit plusieurs toxines cytotoxiques (Nauciel, 2000). Peut surinfecter des lésions cutanées, des plaies traumatiques ou postopératoire (Cattoir, 2005).

Partie Expérimentale

Chapitre 3

Matériels et méthodes

3.1. Cadre d'étude

Dans notre travail. Les prélèvements ont été réalisées à partir de divers sites d'environnement hospitalier. Dans différent services (médecine interne homme, médecine interne femme, maternité, bloc chirurgicale, service d'urgence, pédiatrie) de l'hôpital de Sidi Okba -Biskra.

3.2. Matériels

L'ensemble des milieux de culture réactif et appareillages seront cites au fur et à mesure de leur utilisation.

3.3. Méthodes

3.3.1. Réalisation des prélèvements

➤ Prélèvement au niveau des surfaces

Les prélèvements des échantillons ont été effectués à partir de différents sites environnementaux ; des surface sèches (poignée de porte, paillasse, interrupteur, appareil d'anesthésie, table mayo, les appareils, lits), des surface humide (lavabo, le robinet) et de l'air.

Les prélèvements ont été effectués en passant un écouvillon stérile sur les instruments selon les étapes les suivantes (Denis, 2011) :

Humidifier l'écouvillon avec l'eau physiologique stérile et éliminer l'excès de liquide en pressant légèrement le coton sur la paroi du tube ; Frotter l'écouvillon sur la surface verticalement, horizontalement et en diagonale, pendant moins de 20 secondes. Une pression aussi forte que possible doit être appliquée et l'écouvillon doit être retourné.

Replacer délicatement l'écouvillon dans son tube

Les échantillons ainsi prélevés ont été rapidement transportés au laboratoire de microbiologie, ou ils sont incubés à 37C° pendant 24 à 48 heures (Debabza, 2014).

➤ Prélèvement à partir de l'air

Pour les prélèvements de l'air nous avons utilisé des boites contenant la G.N, en les laissant ouvertes en contact avec l'air pendant 20min pour permettre la mise en place des germes existants dans le milieu d'isolement (Bouaziz et Ramdane, 2006).

3.3.2. L'enrichissement

L'enrichissement du nombre de microorganismes est réalisé en mettant chaque écouvillon dans un tube contenant le bouillant BHIB (Chibi, 2015) (voir annexe 1)

Ils sont incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures jusqu'à l'apparition de culture Bactérienne qui se manifeste sous forme de trouble (Debabza, 2014).

3.3.3. Isolement et purification

L'isolement sont réalisé à partir des différents types de milieux de culture : la gélose nutritive (GN), la gélose bromocrésol pourpre (BCP), hektoén, et Chapman (voir annexe 1).

➤ Isolement

L'ensemencement sur les milieux (gélose nutritive, BCP, hektoén et Chapman), a été fait comme suit :

La boîte a étéensemencée à l'aide de l'extrémité cotonnée de l'écouvillon imbibé dans le bouillon nutritif par la technique des 3 quadrants.

Les boîtes ont été ensuite incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures jusqu'à l'apparition des colonies.

➤ Purification

La purification se fait en poursuivant le repiquage sur le même type de milieu jusqu'à l'obtention d'un isolat pure présentant les mêmes caractéristiques que celui obtenu en premier isolement. La dernière culture pure doit être faite sur gélose nutritive pour faire l'objet d'autres tests (tests préliminaires, identification biochimique, antibiogramme, etc.) (Debabza, 2014).

3.3.4. Conservation des souches

La conservation de courte durée des isolats purifiés a été réalisée par ensemencement sur gélose nutritive inclinée par l'anse de platine. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les tubes ont été conservés au réfrigérateur à 4°C.

La conservation de longue durée des souches a été réalisée par ensemencement dans le bouillon nutritif. Après incubation pendant 24 heures à 37°C, un volume de la suspension obtenue a été transféré dans des tubes Eppendorf, à l'aide d'une pipette Pasteur, avec 15 à 20 % du glycérol stérile. Chaque souche doit être conservée en plusieurs copies. Les tubes ont été stockés au congélateur à -20°C (Debabza, 2014).

3.3.5. Identification phénotypique

L'identification comporte une série d'étape, se succédant le plus souvent dans un ordre déterminé ; les souches isolées ont été identifiées par des techniques microbiologiques standards (la coloration de Gram, test catalase et d'oxydase) et par le système API 20E et API 20NE.

Les résultats obtenus au cours de chaque étape permettent l'orientation des démarches ultérieures (Chibi, 2015).

3.3.5.1. Caractère macroscopique

L'étude des caractères visibles à l'œil nu : formes, taille, couleur et aspect (Chibi, 2015).

3.3.5.2. Examen microscopique

a. Coloration de Gram

➤ Principe et technique

La coloration de Gram est la coloration de base de la bactériologie. C'est une coloration double qui permet de différencier les bactéries non seulement d'après leur forme et leur disposition, mais surtout d'après leur affinité pour les colorants liée à la structure de la paroi (Lezzar et Abdelmalek, 2016).

Technique américaine dite « Gram Hucker »

C'est la technique de la coloration de Gram, modifiée par Hucker en 1902, Gram Hucker, qui fait l'objet d'une présentation normalisée en microbiologie aliments (norme NF EN ISO 7218, octobre 2007). Le protocole est le suivant :

- Préparer un frottis d'un produit pathologique ou d'une culture bactérienne.
- Recouvrir le frottis de violet cristal oxalate ; laisser agir 1 minute rincée à l'eau distillée.
- Verser du Lugol et le laisser agir pendant 1 minute ; rincer à l'eau distillée.
- Décolorer à l'alcool à 95°, entre 15 et 30 secondes (selon les auteurs).
- Rincé à l'eau distillée.

- Recolorer avec de la safranine pendant 10 à 30 secondes : rincer à l'eau distillée.
- Sécher au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen.

La safranine peut être remplacée par de la fuchsine de Ziehl diluée au 1/10 pendant 1 minute (Delarras, 2014).

➤ **Lecture**

Observer au microscope à l'objectif x 100 à immersion

Avec cette coloration double, les bactéries « Gram + » apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries « Gram - » sont colorées en rose ou en rouge (Delarras, 2014).

b. Teste oxydase

➤ **Principe et technique**

L'oxydase est une enzyme qui catalyse une réaction d'oxydoréduction impliquant une molécule de dioxygène (O₂) comme accepteur d'électrons (Denis et al., 2007).

La mise en évidence de l'oxydase a été faite selon la méthode des disques d'oxydase qui consiste à :

- Déposer sur une lame un disque d'oxydase, et l'imbiber avec une goutte d'eau physiologique stérile.
- Prélever une colonie à l'aide d'une pipette Pasteur et l'étaler sur le disque (Denis et al., 2007).

➤ **Lecture**

La présence d'une cytochrome-oxydase se traduit, en 20 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet très foncé (Denis et al., 2007). Si la colonie reste incolore, le germe ne possède pas d'oxydase, le test est négatif.

c. Recherche de catalase

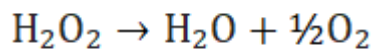
➤ **Principe et technique**

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) avec dégagements d'oxygène. La recherche de la catalase est un test fondamental pour l'identification des bactéries à Gram positif.

Le test est réalisé en mettant une colonie d'une culture jeune sur une lame contenant une goutte d'eau oxygénée (H₂O₂).

➤ **Lecture**

La formation de bulles d'oxygène indique que la bactérie possède une catalase, la réaction se fait selon l'équation suivante :



d. Mannitol-mobilité

➤ **Principe**

Le principe du milieu repose sur l'aptitude de certaines entérobactéries à fermenter le mannitol (Virage au jaune) et à éventuellement réduire les nitrates en nitrites (bio-rad, 2011).

➤ **Technique**

Ce milieu étant faiblement gélosé, si, avant ensemencement, le culot est disloqué, faire fondre le milieu au bain-marie bouillant et le laisser se solidifier en plaçant les tubes dans de l'eau froide, en position verticale. Ensemencer au moyen d'un fil de platine par piqûre centrale jusqu'au fond du milieu. Incubation à 37 + 1C pendant 18 à 24 h (bio-rad, 2011).

➤ **Lecture**

Ce milieu fournit trois réponses

- Le mannitol est fermenté : le milieu vire au jaune. Dans le cas contraire, il garde sa couleur initiale.

- Les bacilles mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement, en créant un trouble du milieu. Les bacilles immobiles cultivent uniquement le long de la strie d'ensemencement.

- En ajoutant, à la surface du milieu, les réactifs de GRIESS (acide sulfanilique et α -naphthylamine), il est possible de mettre en évidence les nitrites, si la bactérie possède une nitrate-réductase (bio-rad, 2011).

3.3.5.3. Identification biochimique par la galerie API 20

a. Galerie API 20 E

➤ **Principe et technique**

Le Système d'Identification API 20E est utilisé pour l'identification des entérobactéries et d'autres bacilles Gram négatif qui poussent facilement. Le système consiste en une galerie

de 20 micro-tubes contenant les substrats déshydratés. Les micro-tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne (koumba, 2007).

- **Préparation de la galerie**

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillée stérile dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Incrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Sortir la galerie de son emballage.
- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation (Bio Mérieux SA) (Debabza, 2014).

- **Préparation de l'inoculum**

Préparer une suspension bactérienne dense dans 10 ml d'eau physiologique stérile à partir d'une culture pure et jeune de 18 à 24 h sur GN (Debabza, 2014).

- **Ensemencement de la galerie API 20 E**

- Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles d'air :

- Pour les caractères soulignés ADH, LDC, ODC, H₂S, URE, ensemercer le tubule par la suspension et la cupule par l'huile de vaseline stérile.

- Pour les caractères encadrés VP, CIT, Gel, ensemercer le tubule et la cupule par la suspension.

- Pour les caractères non encadrés, non soulignés ensemercer uniquement le tubule par la suspension.

- Refermer la boîte d'incubation et la placer à 37°C pendant 18 à 24 heures (BioMérieux SA) (Debabza, 2014).

- **Lecture de la galerie**

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture (voir annexe 4).

Si trois tests ou plus (test GLU + ou -) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

- Test TDA : ajouter une goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
- Test IND : ajouter une goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
- Test VP : ajouter une goutte de réactif VP1 et VP2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.
- Note : le test de la recherche de production d'indole doit être réalisé en dernier, car cette réaction libère des gaz qui risquent d'altérer l'interprétation d'autres tests de la galerie. Ne pas remettre le couvercle d'incubation après l'ajout du réactif.

Si le nombre de tests positifs avant ajout des réactifs (y compris le test GLU) est inférieur à trois :

- Réincuber la galerie 24 heures (plus ou moins 2 heures) de plus sans rajouter les réactifs.

- Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs (BioMérieux SA) (Debabza,2014).

➤ **Interprétation**

L'identification a été réalisée à l'aide d'un logiciel d'identification (feuille Excel pour l'identification microbienne) (Debabza, 2014).

b. Galerie API 20 NE

➤ **Principe et technique**

L'API 20 N E est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (ex : Pseudomonas, Acinetobacter, Flavobacterium...), combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation et une base de données.

La galerie API 20 NE comporte 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification (BioMérieux SA).

La préparation de la galerie et de l'inoculum a été effectués comme précédemment décrits pour l'API20E (Debabza, 2014).

➤ **Inoculation de la galerie**

Remplir les tubules (et non les cupules) des tests NO₃ à PNPG avec la suspension bactérienne en utilisant une pipette Pasteur. Pour éviter la formation des bulles des fonds des tubules, poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.

Ouvrir une ampoule d'API AUX Medium et y transférer environ 200µl de la suspension précédente.

- Homogénéiser avec la pipette en évitant la formation de bulles.
- Remplir les tubules et les cupules des tests GLU à PAC en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave. Des cupules incomplètement remplies ou trop remplies peuvent entraîner des résultats incorrects.
- Remplir avec l'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) pour former un ménisque convexe.
- Refermer la boîte d'incubation et incubé à 37°C pendant 24 heures (BioMérieux SA) (Debabza, 2014).

➤ **Lecture de la galerie**

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture (voir annexe 5).

- Noter sur la fiche des résultats toutes les réactions spontanées (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG).
- La révélation des deux tests NO₃ et TRP doit se faire en mettant les tests d'assimilation à l'abri d'une contamination par l'air ; pour cela placer le couvercle de la boîte d'incubation au-dessus de ces tests, pendant la période de révélation des tests NO₃ et TRP (Debabza, 2014).

➤ **Test NO₃**

- Ajouter une goutte de réactifs NIT 1 et NIT 2 dans la cupule NO₃.
- Après 5 minutes, une couleur rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
- Une réaction négative peut être due à la production d'azote ; ajouter 2-3 mg de poudre de zinc dans la cupule NO₃.
- Après 5 minutes, une cupule restée incolore indique une réaction positive à noter sur la fiche des résultats. Si la cupule devient rose-rouge, la réaction est négative, car les nitrates encore présents dans le tube ont été réduits en nitrites par le zinc (Debabza, 2014).

➤ **Test TRP**

Ajouter 1 goutte de réactif de James. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive (Debabza, 2014).

➤ **Tests d'assimilation**

Observer la pousse bactérienne. Une cupule trouble indique une réaction positive. Des pousses d'intensité intermédiaire peuvent être observées et notées +/- (BioMérieux SA). (Debabza, 2014).

➤ **Interprétation**

L'identification a été réalisée à l'aide du logiciel d'identification. (Debabza, 2014).

3.3.5.4. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

a. Définition et principe

➤ **Définition**

C'est l'étude de la concentration minimale inhibitrice en milieu gélosé (Roland, 2006).

➤ **Principe**

La méthode de diffusion ou antibiogramme standard.

Des disques de papier buvard imprégnés d'antibiotiques à tester sont disposés à la surface d'une gélose Mueller Hinton préalablement ensemencée avec une culture pure de la souche à étudier. Dans l'application des disques, les antibiotiques diffusent de manière uniforme si bien que leurs concentrations sont inversement proportionnelles à la distance du disque (Roland, 2006).

b. Réalisation pratique de l'antibiogramme

➤ **Préparation de l'inoculum**

Préparer une suspension bactérienne (à partir d'une culture jeune de 18 heures), prélever au moins 03 colonies et émulsionner dans 05 ml d'eau physiologique stérile.

Bien homogénéiser la suspension bactérienne. Son opacité doit être équivalente à une DO de 0,08 à 0,1 lue à 625 nm soit 0,5 la valeur de Mac Farland. Cela correspond à une culture pure à peine confluyente de 10⁶ à 10⁸ UFC/ml (CA-SFM, 1998).

➤ **Milieu de culture**

Le milieu utilisé est le Mouller-Hinton coulé dans une boîte de pétri de façon uniforme

Et jusqu'à une épaisseur de 4mm (Roland, 2006).

➤ **Ensemencement**

L'ensemencement par écouvillonnage (méthode de Kirby-Bauer) :

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne et laisser s'imbiber.
- Le sortir du tube en l'essorant doucement sur la paroi.
- Ensemencer la boîte de Mueller-Hinton dont l'épaisseur de la gélose est de 4mm, en frottant l'écouvillon sur sa surface et en tournant la boîte 3 fois de 60°C afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum.
- Laisser sécher les boîtes pendant 15 à 20 minutes (CA-SFM, 1998).

➤ **Application des disques et incubation**

Appliquer les disques à l'aide d'une pince préalablement flambée, en appuyant légèrement. Les disques doivent être parfaitement appliqués à plat sans glissement. Une distance minimale de 15 mm doit séparer un disque périphérique du bord de la boîte, et chaque disque doit être éloigné au minimum de 30 mm des autres. Incuber les boîtes à 37°C pendant 24 heures, couvercle en bas (CA-SFM, 1998).

➤ **Les antibiotiques utilisés**

Tableau 1. Les antibiotiques testés

| Les antibiotiques | Charge du disque (µg) |
|--------------------------|------------------------------|
| Gentamycine (CN) | (CN-10µg) |
| Amoxicilline (AML) | (AML-2µg) |

| | |
|--|------------------|
| Chloramphénicol (C) | (C-30 μ g) |
| Amoxicilline acide clavulanique (AUG) | (AUG-30 μ g) |
| Streptomycine (S) | (S-10 μ g) |
| Acide nalidixique (NA) | (NA-30 μ g) |

c. Lecture

Les diamètres d'inhibition autour des disques sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse ; puis ils sont comparés aux diamètres critiques rassemblés dans les abaques de lecture conformément aux normes CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société française de Microbiologie. Il convient de noter toutefois, qu'une souche dont la sensibilité aux Antibiotiques est ainsi évaluée peut être déclarée " sensible, intermédiaire ou résistante" après consultation des abaques de lecture (Roland, 2006)(voir annexe 3).

Chapitre 4

Résultats et Discussion

Dans ce chapitre, nous présenter les résultats de la recherche et l'identification phénotypique des bactéries à Gram positive et négative isolés des surfaces humides et sèches en milieu hospitalier (hôpital de SIDI OKBA).

4.1. Prélèvement

37 prélèvements ont été prélevés de l'hôpital (Sidi Okba) à partir des surfaces sèches et humides (voir annexe 2).

4.2. Analyse des prélèvements au laboratoire

Après une période d'incubation à 37°C pendant 24h à 48h en bouillon BHIB pour les prélèvements de surface et en gélose nutritif pour les prélèvements d'air, nous avons obtenus les résultats dans le tableau (2).

Tableau 2. Les résultats des prélèvements bactériologiques.

| Service | | Nombre des prélèvements | Résultat positive | Résultat négative |
|------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|
| S. pédiatrie | | 8 (17%) | 6 | 2 |
| Médecine interne homme | | 7 (15%) | 4 | 3 |
| Médecine interne femme | | 7 (15%) | 5 | 2 |
| Laboratoire | | 6 (12,5%) | 4 | 2 |
| Maternité | | 7 (13%) | 5 | 2 |
| S. urgence | Bloc chirurgicale | 6 (12,5%) | 3 | 3 |
| | Salle de soins | 7 (15%) | 3 | 4 |
| Total | | 48 (100%) | 30 | 18 |

Quarante-huit prélèvements de surface et air a été collecté à partir de six services à l'hôpital de SIDI OKBA.

Le résultat que nous avons obtenu (tab 2) montre que à partir de nombre total des prélèvements obtenu, 30 des prélèvements sont noté comme résultats positives et 18 sont noté comme résultats négatives. Les échantillons des résultats positives ont étéensemencés sur les milieux gélose nutritive, gélose bromocrésol pourpre (BCP), Hektoen et Chapman.

Dans cette étude, les résultats des analyses de contamination par les bactéries sont relativement faibles dans le service Médecine interne homme et service laboratoire, par rapport les autres services.

Les résultats les plus positifs après la période d'incubation ont été observés au niveau des services pédiatriques, urgence, Maternité et Médecine interne femme.

Les sites les plus contaminés étaient chariot, robinet, paillasse, interrupteur, et la poignée de porte Cela est dû à l'utilisation fréquente par les patients et les visiteurs.

4.2.1. Aspect macroscopique des isolats

Les isolats bactériens ont montré divers aspects cultureux, en fonction du milieu de culture, permettant de suspecter leur appartenance à un groupe bactérien ou à un autre (*entérobactéries, Pseudomonas, Staphylococcus* et autre groupe bactérien).

L'aspect des colonies sur le milieu solide permet de déterminer la forme, le relief, la taille, la consistance et la couleur (fermentation) sur boîte de Pétri.

Sur la gélose nutritive : nous avons obtenu des colonies blanchâtres, rondes, bombées, de différentes tailles.

Tableau 3. Aspect de culture des bactéries trouvées sur gélose bromocrésol pourpre (BCP), Hiktoen et Chapman (B : milieu BCP, H : Hiktoen, C : Chapman, A : air, h : Humide, S : sèche, IF : médecine interne femme, IH : médecine interne homme, M : maternité, P : pédiatre, L : laboratoire, U : urgence).

| Souche | Milieu de culture | Aspect macroscopique des colonies |
|---|-------------------|--|
| (B.h.6), (B.h.20), (B.h.19), | BCP | Colonies jaunes, rondes, lisses, bombées et de centre noir ou non à contour régulier avec virage de milieu du violet au jaune (lactose +). |
| (B.S.35), (B.h.15), (B.S.13), (B.S.10) | BCP | Colonies pourpres, lisses, à contour irrégulier, de grande taille, ayant une tendance à la confluence, sans virage de couleur de milieu (lactose -). |

| | | |
|---|---------|---|
| (B.S.24), (B.H.37) | BCP | Colonies pourpre ou bleu, à contour irrégulier, de grande taille, muqueuses ayant tendance à la confluence, sans virage de couleur de milieu (lactose -). |
| (B.S.22), (B.S.1), (B.S.25)), (B.S.9) | BCP | Colonies bleues, à contour régulier, de petite taille, sans virage de couleur de milieu (lactose -). |
| (H.S.25), (H.S.9), (H.h.6), | HK | Colonies jaune saumon, grosses, muqueuses, bombées, ayant une tendance à la confluence, avec virage de milieu du vert au jaune-oronge. |
| (H.S.31a), (H.S.22) | HK | Colonie vertes ou bleuâtres, de déférente taille (petite, grosse), plat, sans virage de couleur de milieu. |
| (H.S.13), (H.S.32), (H.h.19) | HK | Colonie bleue, de petite taille, bombé, sans virage de couleur de milieu |
| (C.S.26), (C.h.20), (C.S.30), (C.S.34), (C.S.10), (C.S.33), (C.S.9), (C.S.1), (C.S.13), (C.h.15), (C.S.8), (C.S.16), (C.S.28), (C.S.21), (C.S.25), (C.h.37), (C.A.L), (C.A.M) | Chapman | Colonies jaune, arrondies à bords régulier, avec virage au jaune du milieu (mannitol +). |
| (C.S.27), (C.S.14), (C.S.22), (C.S.24), (C.S.30), (C.S.35), (C.h.37), (C.A. P), (C.A.IF), (C.A.IH) | Chapman | Colonie blanchâtre, arrondies à bords régulier, sans virage de couleur de milieu (Mannitol -). |

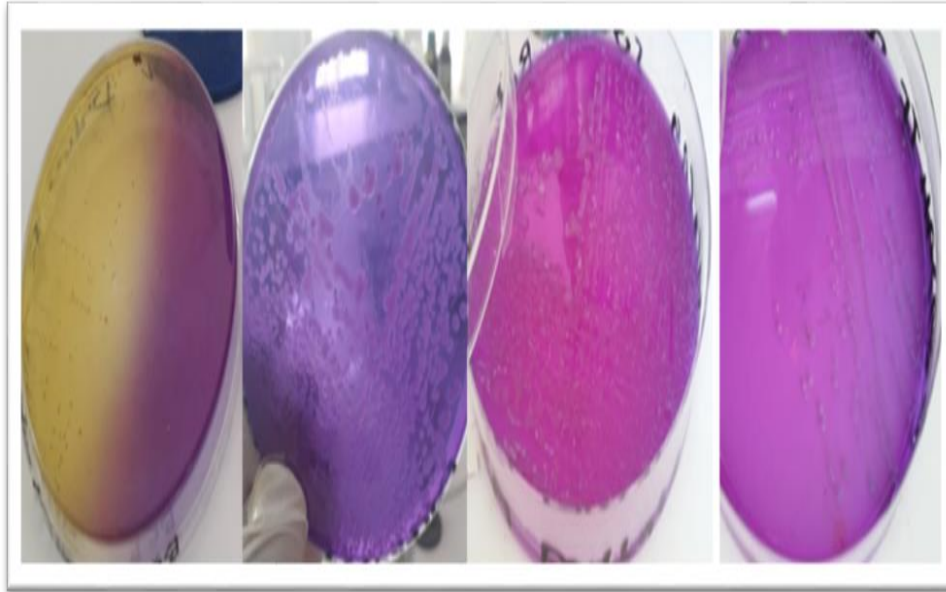


Figure 1. Aspect macroscopique des cultures bactérienne sur le milieu bromocrésol.

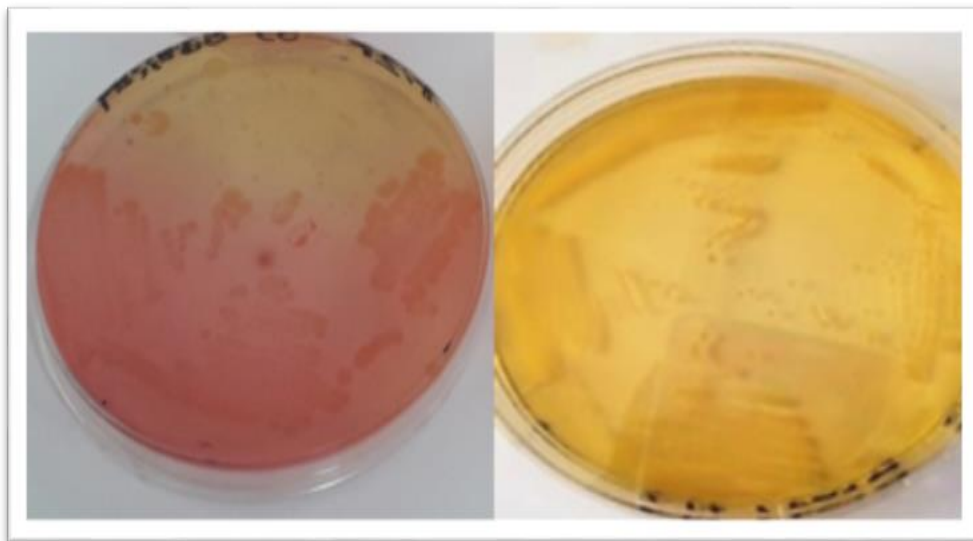


Figure 2. Aspect macroscopique des cultures bactérienne sur le milieu Chapman.

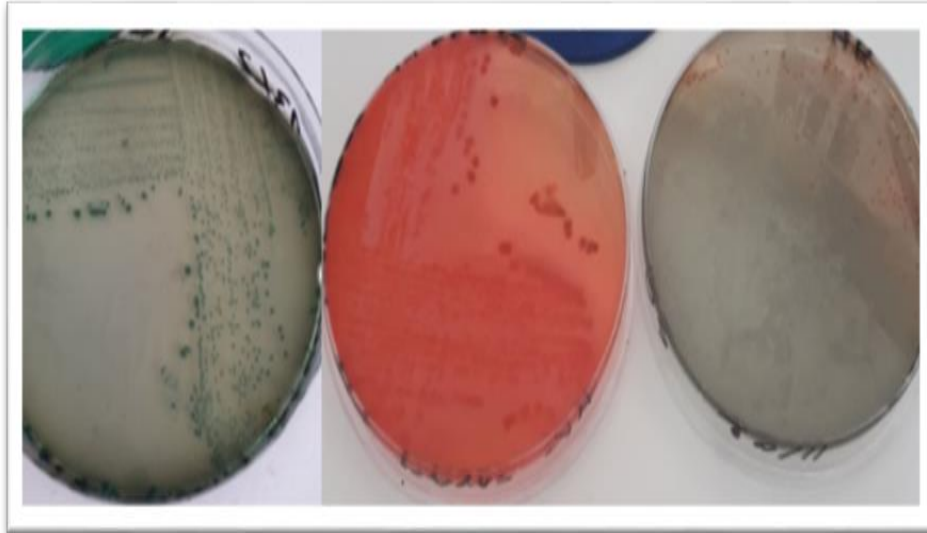


Figure 3. Aspect macroscopique des cultures bactérienne sur le milieu Hektoen.

4.2.2. Examen microscopique

4.2.2.1. Coloration de Gram

Les résultats obtenus par observation microscopique après coloration de Gram, montré que les souches se présentent sous forme :

- Cocci coloré en violet, isolés ou regroupés en paires et la plupart en amas (grappe de raisin) sur le milieu Chapman.

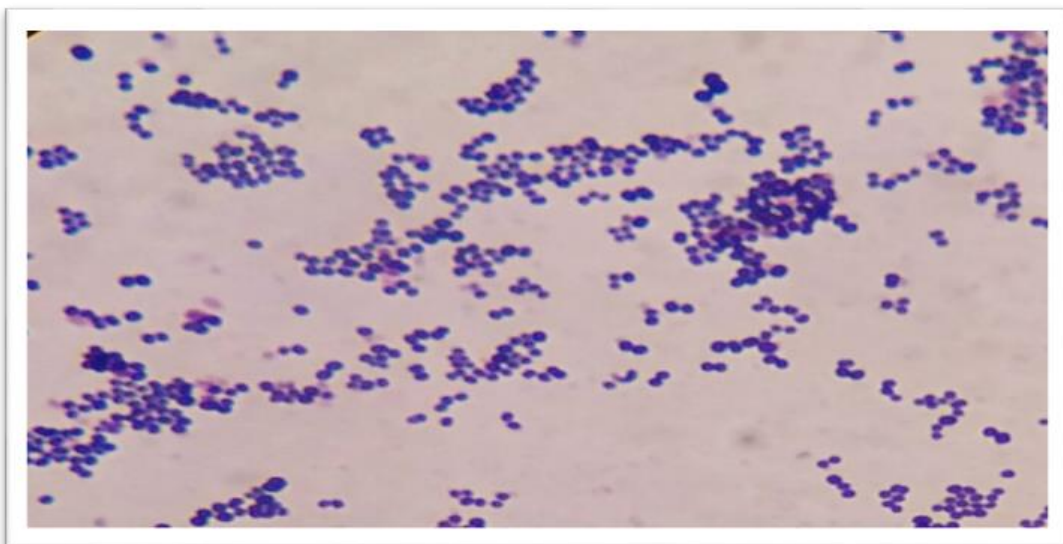


Figure 4. Observation microscopique des Cocci à Gram positive Isolé à partir service médecine interne femme (B.S.13).

- Bacilles coloré en rose, isolés, diplobacilles ou regroupés en amas, de longueur variable.

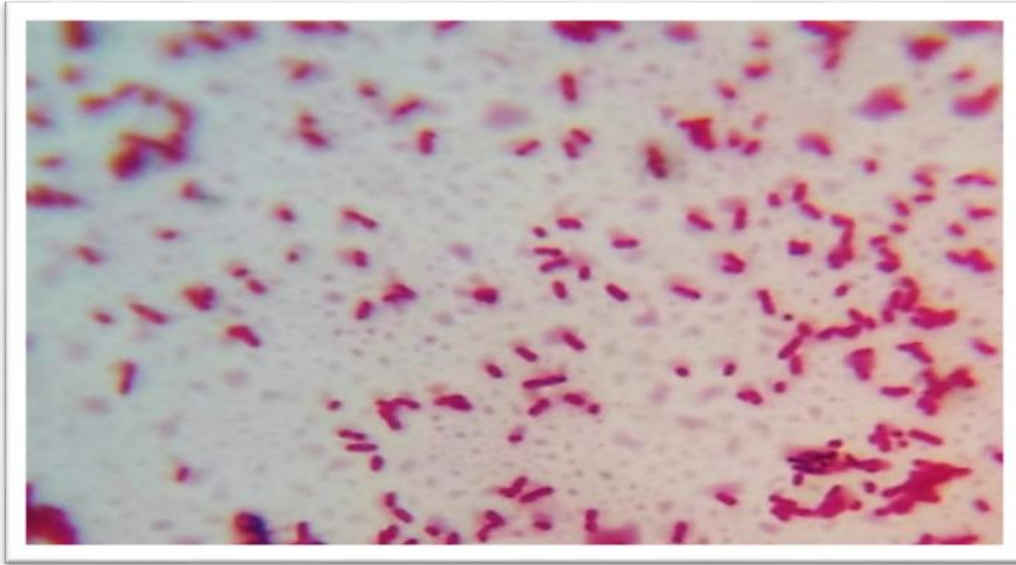


Figure 5. Observation microscopique des bacilles à Gram négative isolé à partir service maternité (B.S.25).

- Bacilles coloré en rose, fins, isolés, diplobacilles, de longueur variable.

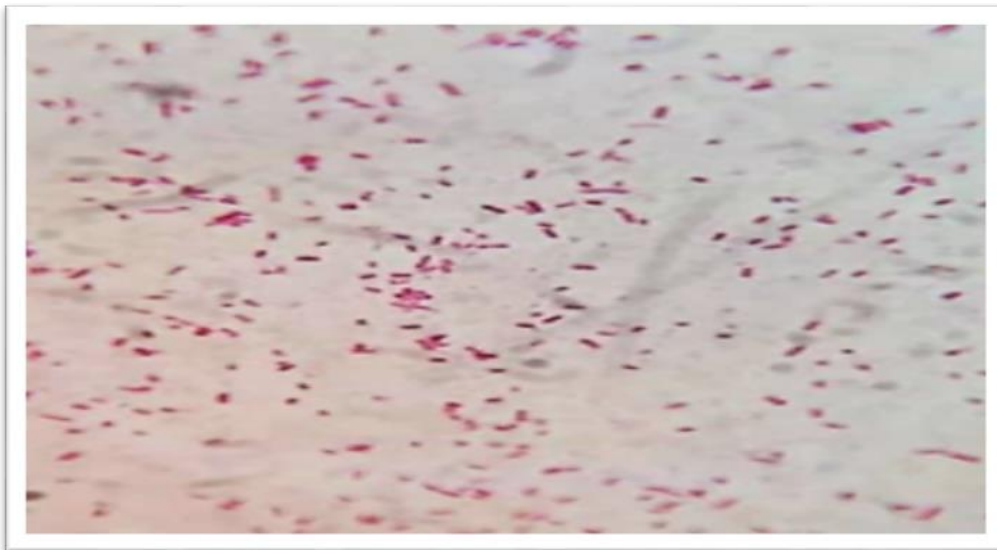


Figure 6. Observation microscopique des bacilles à Gram négative isolé à partir de service d'urgence de bloc chirurgicale (H.S.30).

4.2.2.2. Pourcentage des souches isolées

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure (7).

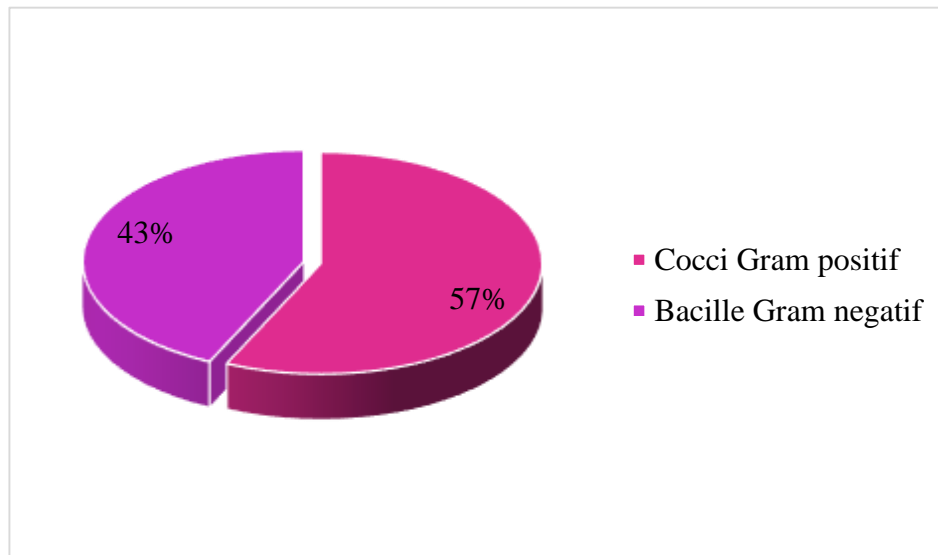


Figure 7. Pourcentage des souches CGP et BGN isolées.

Le résultat de La figure 7 montre que à partir de 49 souches isolées La plupart des souches sont des Cocci gram positif qui représente 28(57%) alors que 21(43%) représente des bacille Gram négatif (BGN).

Contrairement à nos résultats, Le résultat de Bouguenoun. (2017) indique que 87% (33/38) de BGN et 13% (5/38) des CGP, ont été trouvés dans les surfaces hospitalières.

4.2.3. Identification biochimique

4.2.3.1. Recherche de catalase

Toutes les bactéries isolées, testées pour la production d'une catalase, ont décomposé l'eau oxygénée en eau et en oxygène qui se dégage. Ce qui se traduit par le dégagement des bulles de gaz.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure (8)



Figure 8. La formation de bulles de gaz de test catalase de la souche (B.S.13).

Le résultat de la figure 8 montre que Les tests de catalase étaient positifs pour l'ensemble des bactéries (49 souches (100%)).

4.2.3.2. Test oxydase

Si les bactéries oxydent le disque, le disque deviendra violet à l'endroit où la colonie a été déposée soit immédiatement, soit quelques secondes après, indiquant un test positif. Aucun changement de couleur, indique un test négatif.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure (9).



Figure 9. Observation du résultat positif de test oxydase de la souche (H.S.30).

Les résultats présentés dans la figure 9 montrent que 40 souches ont une oxydase positive avec pourcentage de 81,63% et 9 souches dépourvues d'oxydase avec taux de 18,36%.

4.2.3.3. Test mannitol-mobilité

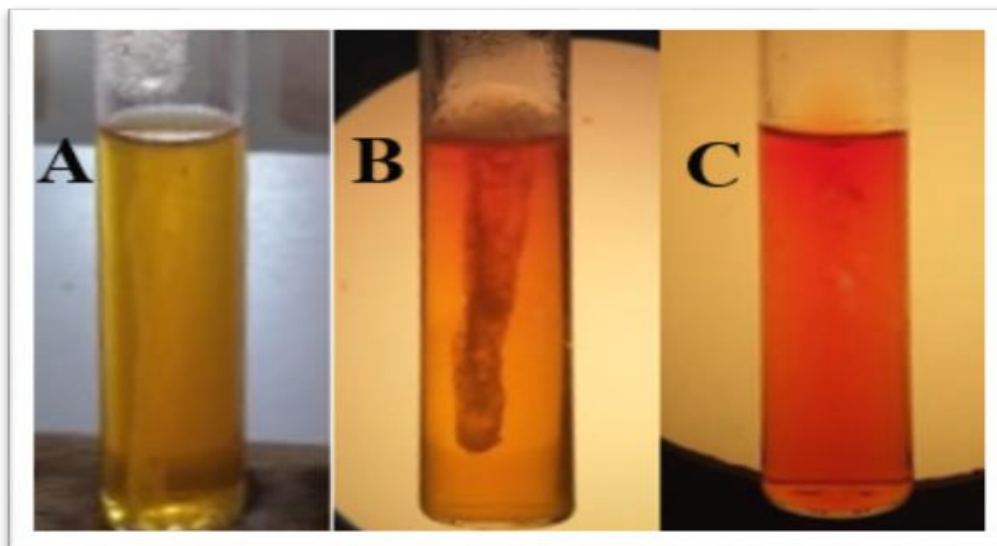


Figure 10. Résultats de test mannitol-mobilité.

A partir de résultat de la figure 10 le tube (A) a un mannitol positif, qui indique que les bactéries ont acidifié le milieu qui vire alors au jaune (grâce au rouge de phénol).

En ce qui concerne la mobilité. Les bacilles mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement (tube B), en créant un trouble du milieu.

Par contre le tube (C) indique un résultat négatif, les bactéries immobiles persistent le long de la piqûre centrale et le milieu garde sa couleur initiale.

On note à partir de ce test 30 (61,22%) souche sont mannitol positif et 19 (38,77%) souches sont mannitol négatif, par contre on trouve que 21 (42,85%) souches sont des souches mobiles et 28 (57,14%) sont des souches immobiles.

Tableau 4. Les résultats des tests biochimique (catalase, oxydase et mannitol-mobilité) des isolats.

| Les Souches | tests biochimiques | Catalase | Mannitol-mobilité | | Oxydase |
|----------------------------|--------------------|----------|-------------------|----------|---------|
| | | | Mannitol | Mobilité | |
| (H.S.25), (H.S.9), (H.h.6) | | + | + | + | - |

| | | | | |
|--|---|---|---|---|
| (B.h.6), (B.h.20), (B.h.19) | + | + | + | - |
| (H.S.30a), (H.S.22) | + | + | - | - |
| (B.S.22), (B.S.1), (B.S.25)), (B.S.9) | + | + | + | - |
| (H.S.13), (H.S.32), (H.h.19) | + | - | + | + |
| (B.S.24), (B.H.36) | + | - | + | + |
| (B.S.33), (B.h.15), (B.S.13), (B.S.10) | + | - | + | + |
| (C.S.MAT), (C.h.20), (C.S.29), (C.S.33), (C.S.10), (C.S.32), (C.S.9), (C.S.1), (C.S.13), (C.h.15), (C.S.8), (C.S.16), (C.S.27a), (C.S.21), (C.S.25), (C.h.36), (C.A.L), (C.A.M) | + | + | - | - |
| (C.S.27b), (C.S.14), (C.S.22), (C.S.24), (C.S.28), (C.S.35), (C.h.36), (C.A. P), (C.A. IF), (C.A. IH) | + | - | - | - |

A partir de (tab.4) les résultats obtenir Après vérification de certains tests d'identification (catalase, oxydase, mannitol mobilité) 49 souches ont été isolée des différentes surfaces de l'environnement hospitalier (passe, contacte, robinet, lavabo...).

Tableau 5. Répartition des CGP et BGN

| Les souches | | Répartition des souches |
|-----------------------|----------------------|-------------------------|
| Cocci Gram + | <i>Staphylocoque</i> | 28 |
| Baciles Gram - | BGN | 12 |
| | BGNnf | 9 |
| Total | | 49 |

Le résultat de (tab.5) montre que la majorité des Cocci Gram positifs sont les staphylocoques (28) avec pourcentage de 57,14%).

Ces résultats sont identiques avec Amara et Khaldi (2015) indique que l'identification de 82 souches bactériennes isolées montre la prédominance des Staphylocoques.

Concernant les BGN isolés de l'environnement sont divisé en deux groupes, 12 (24,48%) appartiennent à la famille d'*Enterobacteriaceae* et 9 (18,36%) au groupe des non fermentant. Bouguenoun (2017) rapporte que les BGN ont été majoritairement des entérobactéries, suivies par les BGN-NF.

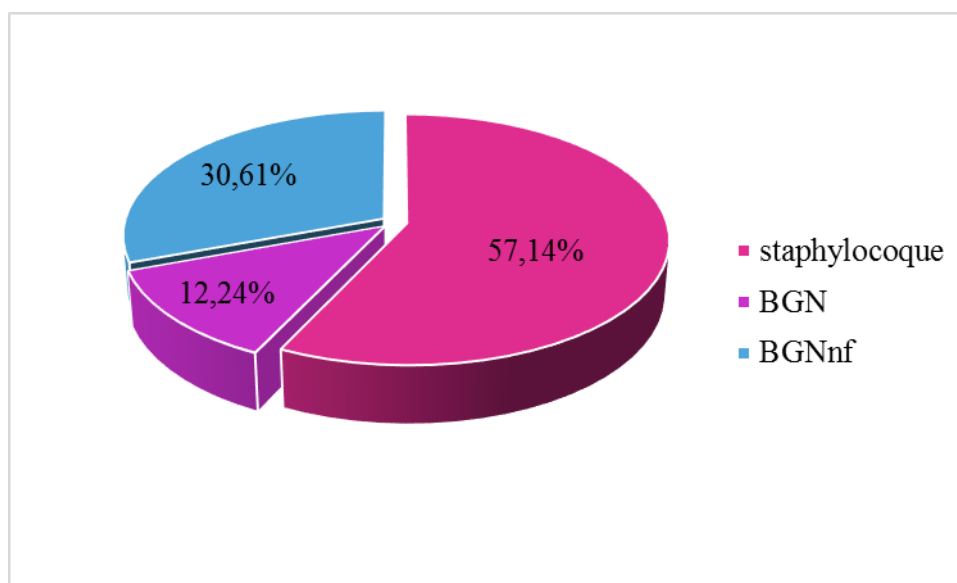


Figure 11. La répartition des souches dans l'environnement hospitalier.

➤ La répartition des souches selon les services

Tableau 6. Le pourcentage et la répartition des souche selon les services.

| Les service | S P | S MIF | S MIH | S M | S L | S U |
|--------------------|-----|-------|-------|-----|-----|-----|
| Les staphylocoques | 1 | 4 | 4 | 6 | 3 | 9 |
| BGN | 3 | 0 | 2 | 4 | 2 | 1 |
| BGNnf | 0 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 |
| Total | 4 | 7 | 7 | 11 | 6 | 3 |

Le résultat que nous avons obtenu (tab 6) montre que la majorité des souches ont été isolées à partir des services maternité avec pourcentage de 22,44%, suivis par les services médecine interne femme et médecine interne homme avec pourcentage de 14,28%, ensuite le service laboratoire (12,24%), pédiatre (8,16%) et urgence (6,12%).

Contrairement de nos résultats les résultats de Mette et *al.* (2010) indique que concernant les Unités de soins visités, 38,5% des prélèvements ont été effectués dans les services pédiatriques et les services de médecine suivis des unités de soins intensifs 33%.

Concernant les staphylocoques on trouve que les staphylocoques sont prédominants dans le service urgence avec pourcentage de 18,36%, suivi le service maternité avec taux de 12,24%, et avec le même pourcentage (8,16%) dans les services médecine interne homme et médecine interne femme, contrairement le services laboratoire qui a un faible taux (6,12%), puis le service pédiatre avec pourcentage inférieur a 3%.

Par contre les entérobactéries sont élevées dans le service maternité avec pourcentage de 8,16%, suivi le service pédiatre avec taux de 6,12%, puis faible pourcentage (4,08%) dans les services médecine interne homme et service laboratoire, ensuite le service urgence avec taux inférieur de 3%, contrairement le service médecine interne femme on observe l'absence de ces bactéries.

On note que les BGNnf sont élevé dans les services médecine interne femme et urgence avec taux de 6,12%. Suivis les services médecine interne homme et maternité et laboratoire avec pourcentage inférieur à 3%, enfin on observe l'absence des BGNnf dans le service pédiatre.

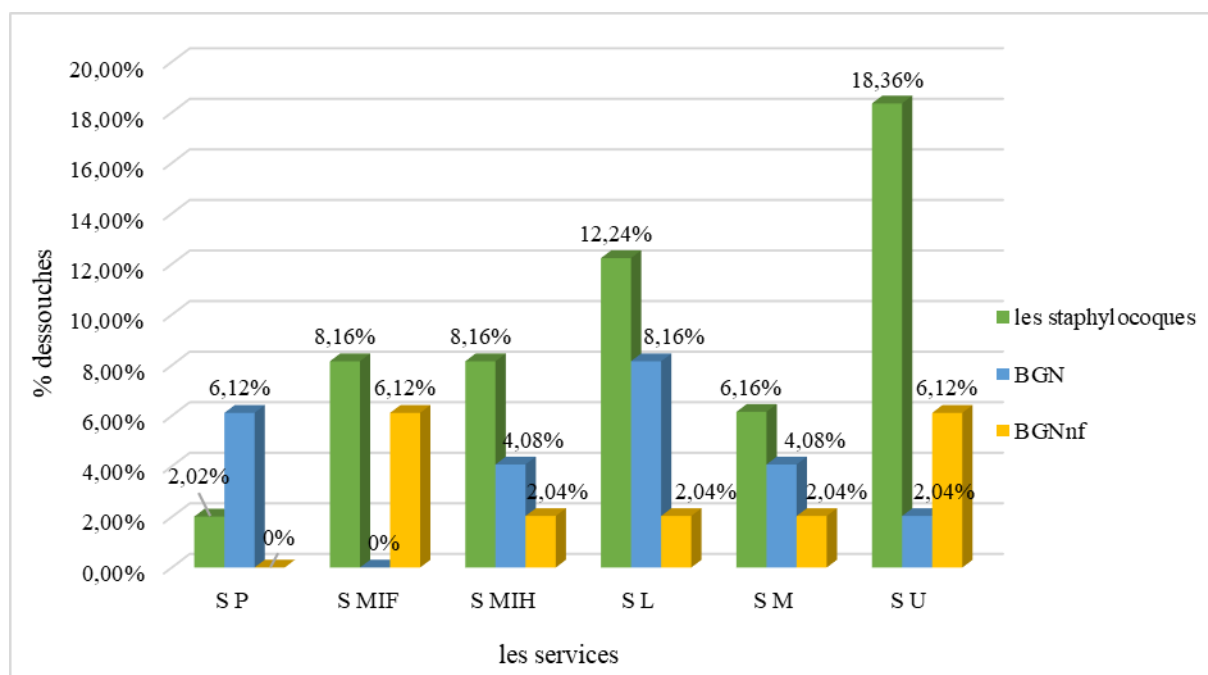


Figure 12. Graphique représente le pourcentage et la répartition des souches selon les services.

➤ **La répartition des souches selon les principaux sites des prélèvements**

Tableau 7. La répartition des souches selon les sites des prélèvements.

| Les sites | Lit | Lavabo | Robinet | Interrupteur | Sol | Poignée de porte | Paillasse |
|--------------------|-----|--------|---------|--------------|-----|------------------|-----------|
| Nombre des souches | 4 | 2 | 8 | 9 | 3 | 5 | 5 |

Le résultat de (tab.7) permis de noter que la majorité des isolats sont colonisées dans les sites interrupteur et robinet (18,36% et 16,32% respectivement), suivis par les sites Poignée de porte et paillasse (10,20%), et avec pourcentage de 8,16% dans le site lit, et avec pourcentage de 6,12% dans le sol, enfin inférieure à 5 % dans le site lavabo. Contraire à nos résultats Mette et *al.* (2010) rapport qu'au plan bactériologique, 46,4% (200/431) des cultures ont été positives dont 12,8% (55/431) de prélèvement de surfaces de lits, 10,2% (44/431) de poignées de porte, 8,6% (37/431) de lavabos, 5,8% (25/431) de prélèvements robinets, 1,4% (6/431) de respirateurs et autres sites 6,3% (27/431).

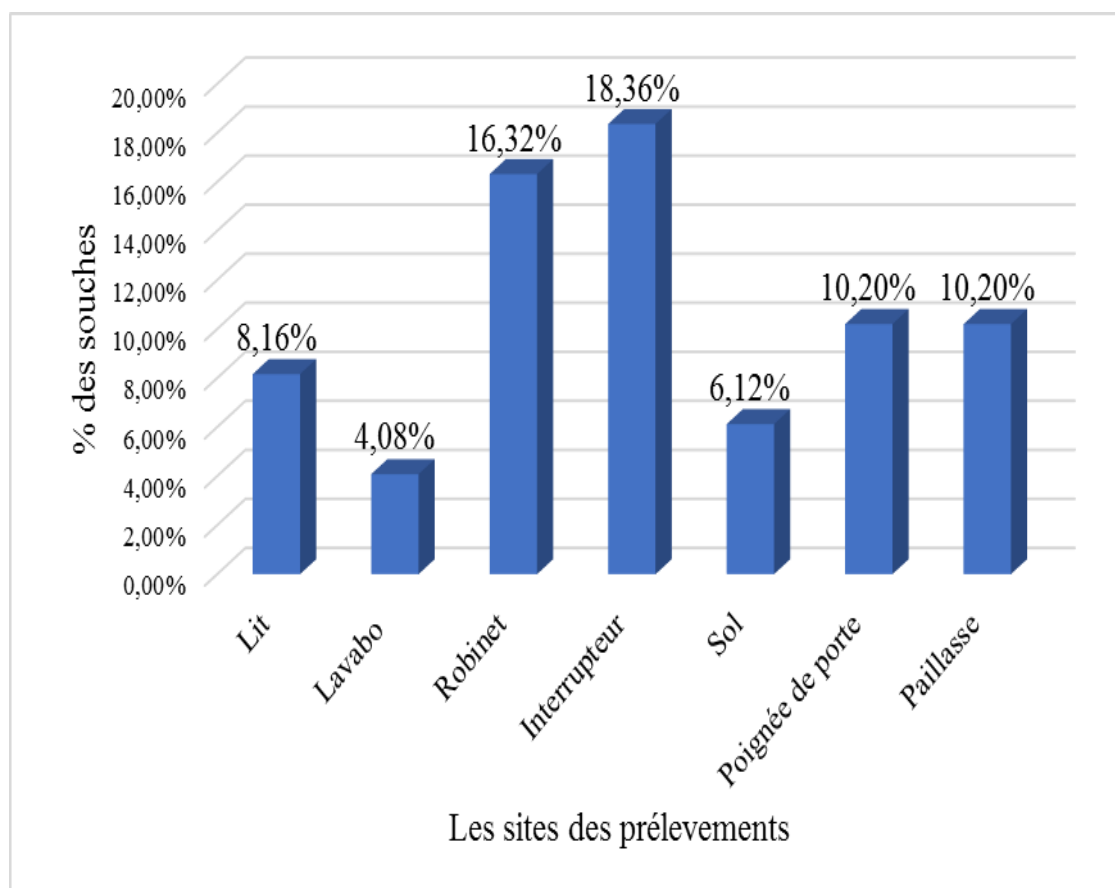


Figure 13. Graphique représente le pourcentage et la répartition des souches selon les sites des prélèvements.

4.2.3.4. Identification par galerie API 20

a. Galerie API 20 E

L'identification bactérienne réalisée par galerie API 20 E nous a permis de mettre en Évidence les principaux caractères biochimiques des quatre souches.

Les résultats obtenus après incubation sont les suivants :

➤ **Souche (H.S.22)**

Tableau 8. Résultat de la galerie API 20E de la souche (H.S.22).

| | | | | | | | | | | | |
|----------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|
| Tests | ONPG | ADH | LDC | ODC | CIT | H2S | URE | TDA | IND | VP | GEL |
| Résultat | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | - |
| Tests | GLU | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA | OX | NO2 |
| Résultat | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |

À partir du catalogue analytique il s'avère que la souche correspond à l'espèce *Klebsiella pneumoniae*.



Figure 14. Résultat de la galerie API 20 E de la souche (H.S.22).

➤ **Souche (B.S.25)**

Tableau 9. Résultat de la galerie API 20E de la souche (B.S.25).

| | | | | | | | | | | | |
|----------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|
| Tests | ONPG | ADH | LDC | ODC | CIT | H2S | URE | TDA | IND | VP | GEL |
| Résultat | + | + | - | + | + | - | - | - | - | - | + |
| Tests | GLU | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA | OX | NO2 |
| Résultat | + | + | - | - | - | - | - | + | - | - | + |

À partir du catalogue analytique il s'avère que la souche correspond à l'espèce *Serratia liquefaciens*.



Figure 15. Résultat de la galerie API 20 E de la souche (B.S.25).

➤ **Souche (B.h.19)**

Tableau 10. Résultat de la galerie API 20E de la souche (B.h.19).

| | | | | | | | | | | | |
|----------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|
| Tests | ONPG | ADH | LDC | ODC | CIT | H2S | URE | TDA | IND | VP | GEL |
| Résultat | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| Tests | GLU | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA | OX | NO2 |
| Résultat | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

À partir du catalogue analytique il s'avère que la souche correspond à l'espèce *Escherichia coli*.



Figure 16. Résultat de la galerie API 20 E de la souche (B.h.19).

➤ **Souche (H.S.9)**

Tableau 11. Résultat de la galerie API 20E de la souche (H.S.22).

| | | | | | | | | | | | |
|----------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|
| Tests | ONPG | ADH | LDC | ODC | CIT | H2S | URE | TDA | IND | VP | GEL |
| Résultat | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| Tests | GLU | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA | OX | NO2 |
| Résultat | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |

À partir du catalogue analytique il s'avère que la souche correspond à l'espèce *Pantoea spp.*



Figure 17. Résultat de la galerie API 20 E de la souche (H.S.9).

b. galerie API 20 NE

L'identification bactérienne réalisée par galerie API 20 NE nous a permis de mettre en évidence les principaux caractères biochimiques des quatre souches

Les résultats obtenus après l'incubation sont les suivants :

➤ **Souche (H.S.13)**

Tableau 12. Résultat de la galerie API 20NE de la souche (H.S.13).

| | | | | | | | | | | |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|
| Tests | No3 | TRP | GLU | ADH | URE | ESC | GEL | PNPG | GLU | ARA |
| Résultats | + | + | - | - | - | + | + | + | + | - |
| Tests | MNE | MAN | NAG | MAL | GNT | CAP | ADI | MLT | CIT | PAC |
| Résultats | + | + | - | + | + | - | - | + | - | - |

A partir du catalogue analytique, il s'avère que la souche correspond à l'espèce *Vibrio alginolyticus*.



Figure 18. Résultats de la galerie API 20 NE de la souche (H.S.13).

➤ **Souche (B.S.24)**

Tableau 13. Résultat de la galerie API 20NE de la souche (B.S.24).

| | | | | | | | | | | |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|
| Tests | No3 | TRP | GLU | ADH | URE | ESC | GEL | PNPG | GLU | ARA |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|

| | | | | | | | | | | |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Résultats | + | - | + | + | - | + | + | - | + | - |
| Tests | MNE | MAN | NAG | MAL | GNT | CAP | ADI | MLT | CIT | PAC |
| Résultats | + | + | - | - | + | - | + | - | + | - |

À partir du catalogue analytique, il s'avère que la souche correspond à l'espèce *Pseudomonas luteola*.

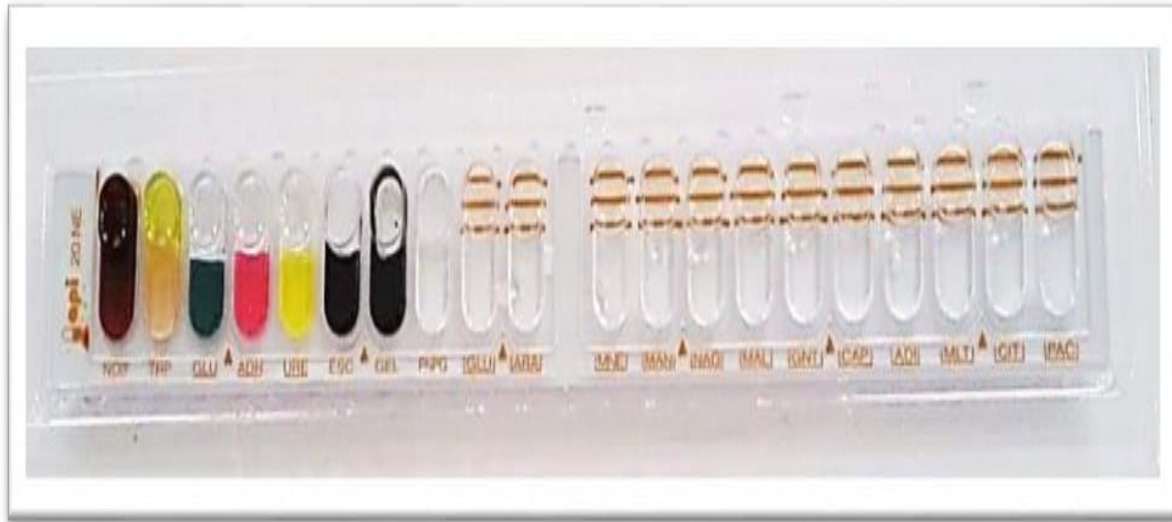


Figure 19. Résultats de la galerie API 20 NE de la souche (B.S.24).

➤ **Souche (B.S.10)**

Tableau 14. Résultat de la galerie API 20NE de la souche (B.S.10).

| | | | | | | | | | | |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|
| Tests | No3 | TRP | GLU | ADH | URE | ESC | GEL | PNPG | GLU | ARA |
| Résultats | + | - | - | - | - | + | + | + | + | - |
| Tests | MNE | MAN | NAG | MAL | GNT | CAP | ADI | MLT | CIT | PAC |
| Résultats | - | + | - | - | + | - | + | + | + | - |

À partir du catalogue analytique, il s'avère que la souche est correspondue à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*.



Figure 20. Résultats de la galerie API 20 NE de la souche (B.S.10).

➤ **Souches (C.S.10)**

Tableau 15. Résultat des tests biochimique classique de la souche (C.S.10).

| Test | NO3 | URE | GLU | ADH | GEL | Mannitol-mobilité | | Oxydase | Catalase |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-------------------|----------|---------|----------|
| | | | | | | Mannitol | Mobilité | | |
| Résultats | + | + | + | + | - | + | - | - | + |

A partir des tests biochimiques classiques, il s'avère que la souche est correspondue à l'espèce *Staphylococcus aureus*.

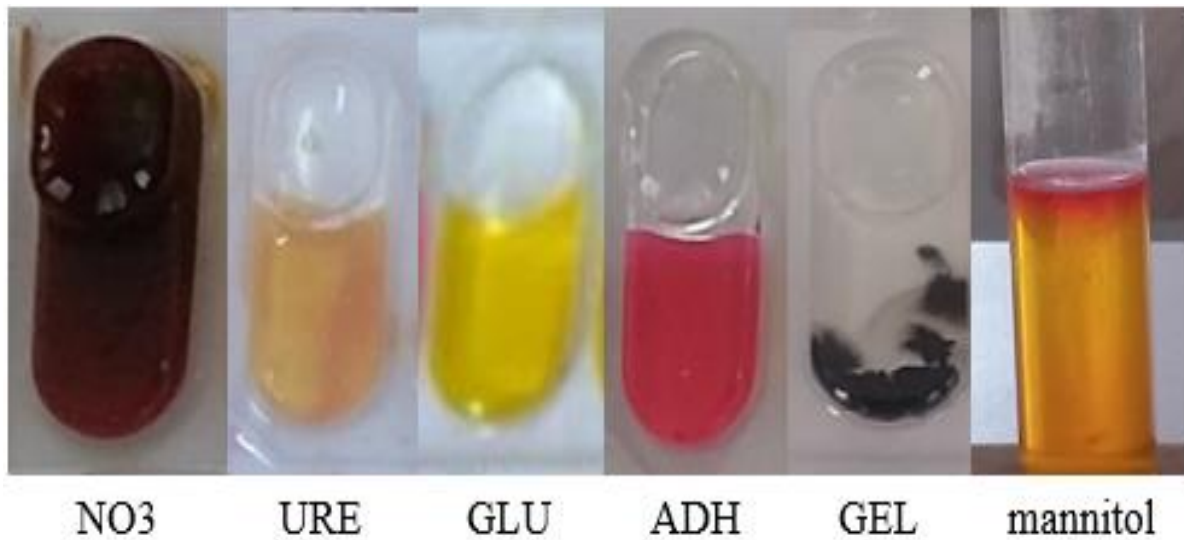


Figure 21. Résultat des tests biochimique classique de la souche (C.S.10).

➤ **Souche (C.S.24)**

Tableau 16. Résultat des tests biochimique classique de la souche (C.S.24).

| Test | NO3 | URE | GLU | ADH | GEL | Mannitol-mobilité | | Oxydase | Catalase |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-------------------|----------|---------|----------|
| | | | | | | Mannitol | Mobilité | | |
| Résultats | + | + | + | - | - | - | - | - | + |

A partir des tests biochimiques classique, il s'avère que la souche est correspondue à l'espèce *Staphylococcus epidermidis*.

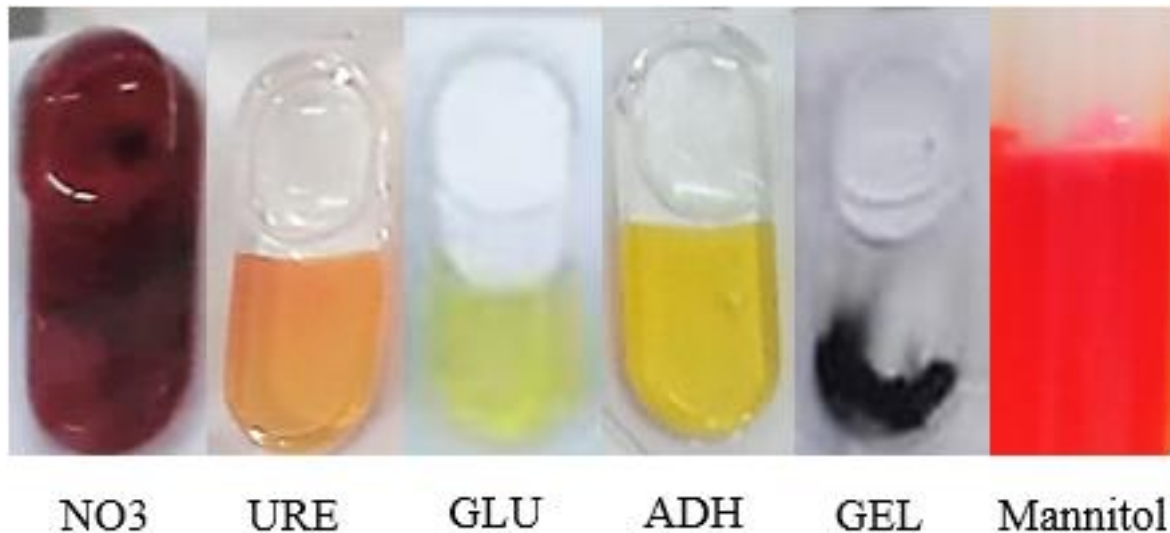


Figure 22. Résultat des tests biochimique classique de la souche (C.S.24).

➤ **La répartition bactérienne**

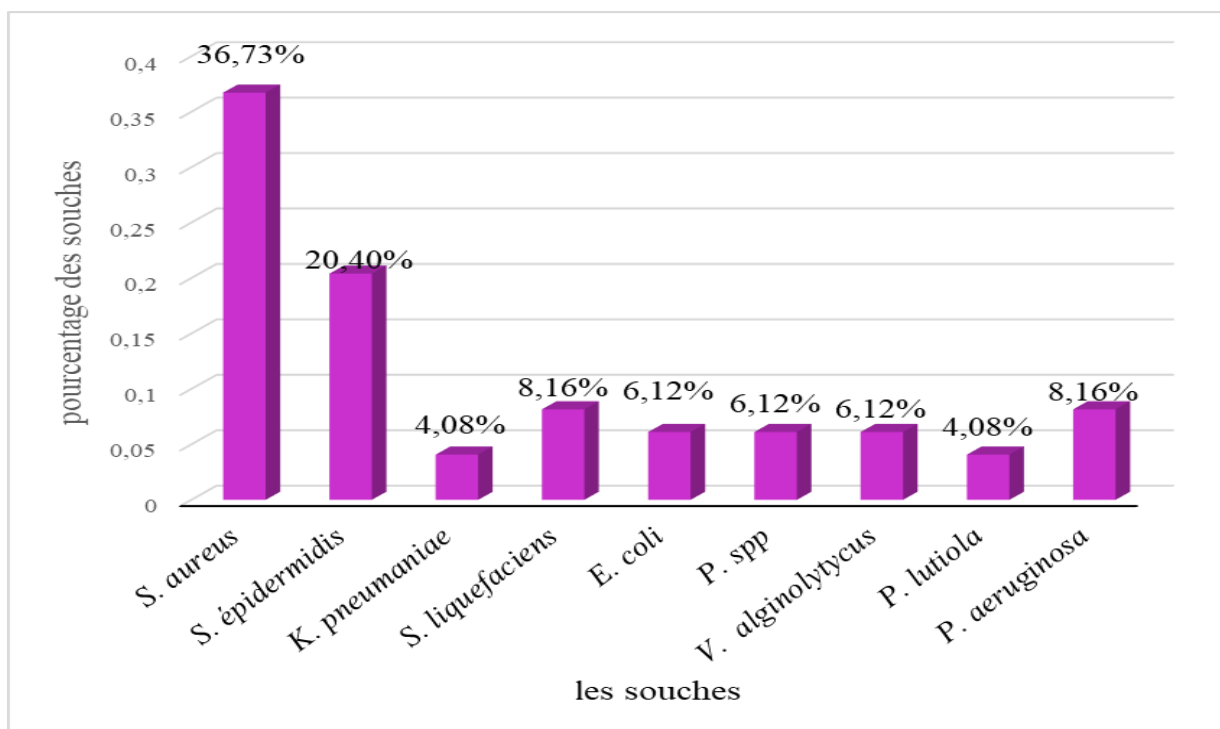


Figure 23. Graphique représente le pourcentage et la répartition des souches.

Le résultat de la figure 23 montre que les *Staphylococcus aureus* représente le germe le plus fréquemment isolées avec pourcentage de 36,73%, suivi par de *Staphylococcus épidermidis* qui représente 20,40%, puis *Serratia Liquefaciens* et *Pseudomonas aeruginosa* avec un taux de 8,16% ensuite *Escherichia coli*, *Pantoea spp* et *Vibrio Alginolyticus* avec un

pourcentage de 6,12%, En revanche, de rares espèces ont, été isolées *pseudomonas luteola*, *Klebsiella pneumoniae* avec des taux inférieurs à 5%.

Contraire à notre travail Chibi (2015) indiquent que les *Pseudomonas* représentent encore les germes les plus fréquemment isolés dans les colonisations et infections des surfaces hospitalière suivit des *Staphylococcus aureus*

D'après Bouaziz et Ramadan. (2006) *S. aureus* occupe la grande portion des germes isolés dans le service, le germe le pré dominant dans les deux études est *S. epidermidis*.

4.3.3. Etude de la sensibilité et la résistance des souches aux antibiotiques

(L'antibiogramme)

L'antibiogramme permet de déterminer la sensibilité ou la résistance des souches à Étudiée à certains antibiotiques en utilisant la méthode de diffusion en milieu solide.

Les diamètres d'inhibition autour des disques sont mesurés, puis ils sont comparés aux diamètre critique rassemblés (voir annexe 3).

Parmi les quarante-neuf souches isolées nous avons choisir 10 isolats. Les résultats de l'antibiogramme des isolats sont reportés sur Le tableau (18).

Tableau 17. Résultat de l'antibiogramme des souches isolées.

| Les Souches \ Les ATB | AML | NA | S | CN | C | AUG |
|-----------------------|-----|----|---|----|---|-----|
| Souche 1 (H.S.25) | R | R | S | S | S | R |
| Souche 2 (B.S.22) | R | S | S | S | S | R |
| Souche 3 (H.h.6) | R | S | S | I | S | R |
| Souche 4 (B.S.10) | R | R | R | R | S | I |
| Souche 5 (C.S.34) | I | S | S | R | I | R |
| Souche 6 (B.S.25) | R | S | S | S | S | S |

| | | | | | | |
|--------------------|---|---|---|---|---|---|
| Souche 7 (B.h.6) | I | S | S | S | S | S |
| Souche 8 (C.S.13) | I | S | S | R | S | R |
| Souche 9 (H.S.22) | I | S | S | S | S | S |
| Souche 10 (H.h.19) | R | S | S | S | S | S |

Les résultats obtenus sont présents dans la figure (24)

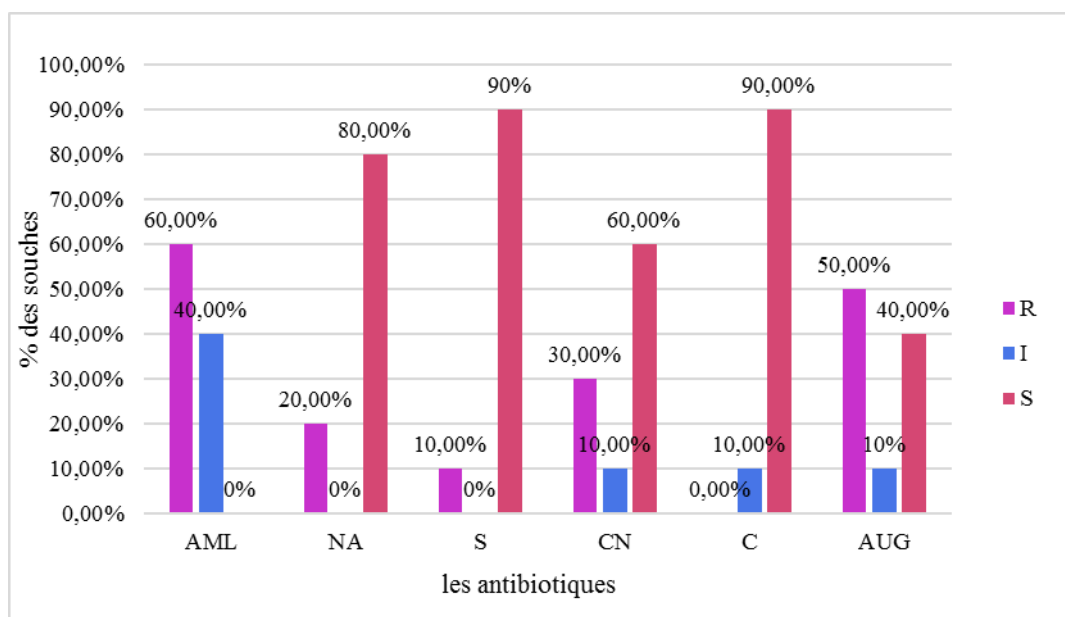


Figure 24. Représentation graphique des profils des souches isolées vis-à-vis des antibiotiques testés.

Le résultat présente dans la figure 24 indique que 60% des souches sont résistantes à l'Amoxicilline et 50% pour Amoxicilline acide clavulanique et 30 % sont résistantes à l'acide nalidixique et Gentamycine par contre 10% sont résistantes à streptomycine et 0% pour Chloramphénicol.

Encore 40% des souches présentent un profil intermédiaire pour l'Amoxicilline et 0% pour acide nalidixique et Streptomycine aussi 10 % sont intermédiaires pour Gentamycine et Chloramphénicol et Amoxicilline acide clavulanique.

Par ailleurs 0% des souches sont sensibles à l'Amoxicilline et 80% sont sensibles pour acide nalidixique et 90% pour Streptomycine et Chloramphénicol, 60% sensible pour Gentamycine, par contre 40 % sensible pour Amoxicilline acide clavulanique.

La majorité des souches présentent des sensibilités à plusieurs antibiotiques (Acide nalidixique, Streptomycine, Gentamycine, Chloramphénicol, Amoxicilline acide clavulanique) Cependant aucune souche sensible à Amoxicilline.

D'après les résultats obtenus, nous notons :

- ✓ Une résistance importante à La famille de β -lactamines avec un taux de 60%, suivi par la famille de Quinolones et de pénicilline.
- ✓ La souche appartenant aux espèces : *Pantoea spp*, *pseudomonas aeruginosa* ont montré une multirésistance aux antibiotiques testés.
- ✓ Les souches de *Staphylococcus* présentent une résistance aux familles des antibiotique suivante : l'amoxicilline et gentamicine et amoxicilline acide clavulanique.
- ✓ Les especes (*Escherichia coli*, *Serratia liquefaciens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio alginolyticus*, *Pseudomonas luteola*,) représente taux de sensibilité les plus élevés.

Bouaziz et Ramadan (2006) montre que la majorité des bactéries isolées du milieu hospitalier représente une résistance à la majorité des antibiotiques et que cette résistance est assez similaire d'une bactérie a une autre et elle est indépendante de pourcentage des germes isolé.

Conclusion

Les surfaces de l'hôpital est un lieu favorable à l'émergence et au développement des Différents types des bactéries, la propagation de ces bactéries dépend d'une part des « réservoirs » et d'autre part de la transmission des germes. Les différents réservoirs Potentiels de ces bactéries sont les patients eux-mêmes, le personnel soignant, le matériel Médical et l'environnement.

Dans notre étude nous avons évalué la qualité d'hygiène et la contamination des surfaces dans l'environnement hospitalier. Notre travail a permis d'isoler 49 souches prélevées sur différents sites dans six services (pédiatrie, médecin interne homme, médecin interne femme, laboratoire, urgences, maternité) à l'hôpital de sidi okba.

Les résultats de cette étude des analyses microbiologique ont permis d'identifier les souches à partir de sept isolats en distingue quatre souches sont appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Pantoea spp*, *Serratia liquefaciens*, *Klebsiella pneumoniae*) et trois souches non *Enterobacteriaceae* de la famille *Pseudomonaceae* (de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas luteola*) et la famille de *Vibrionaceae* (de l'espace *Vibrio alginolyticus*). L'identification macroscopique et microscopique et les tests classiques utilisés permirent d'identifier deux souches appartenant à la famille des *Staphylococcaceae*.

La plupart des souches isolées sont des Cocci Gram positif que représente 57% alors que 43% représente des bacilles Gram négatif (BGN) et la majorité des souches ont été isolées à partir des services maternité et des services des urgences.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a montré que la majorité des souches isolées expriment une sensibilité à des différentes familles des antibiotiques. Les taux de résistance les plus élevés ont été marqués au niveau de la famille β -lactamines.

Notre étude montre que l'environnement hospitalier de l'hôpital de Sidi Okba est fréquemment contaminé par les bacilles Gram négatif et les Cocci Gram positif ces résultats nous incitent à proposer des recommandations au sein des structures sanitaires. Il s'agit particulièrement du renforcement de l'application des mesures générales d'hygiène, et plus précisément l'hygiène des malades et de l'environnement hospitalier, de la sensibilisation du personnel hospitalier concernant ce risque sous-estimé dans l'environnement des hôpitaux algériens.

Ces résultats nous incitent à proposer l'étude et l'identification des autres type des microorganismes précisément les champignons présents dans l'environnement hospitalier.

Références bibliographiques

A

1- Abdelmalek A., lezzar A. 2016. Les bactéries du groupe Klebsiella, entérobacter8-, Serratia responsables des bactériémies au CHU de Constantine et leurs profils de résistances aux antibiotiques. Mémoire de master, université des frères mentouri, ALgérie, p32.

2- Allegranzi B., Bagheri N. S., Combescure C, et *al.* 2011. burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *lancet*, 377: 228-241.

3- Avril J.L., Denis F., Dabernat H., Monteil H. 2000. Bactériologie clinique. 2ème édition Marketing, paris, pp. 148-280.

4- Avril J. L., Dabernat H., Denis F., Monteil H. 1992. Bactériologie clinique. 2ème édition, Ellipses, Paris, 511p.

5- Avril J. L., Dabernat H., Denis F., Monteil H. 2000. Bactériologie clinique. 3ème édition, Ellipses, Paris, 602 p.

6- Avril J. L., Monteil H., Dobernat H., Denis F. 2006. Bactériologie clinique. Edition ELLIPSE.

B

7- Barbut R., Getty S., Neyme D., Magne S., Bernardon Y., Ribadeau Dumas R., Petit J.C. 2003. Clostridium difficile : hygiène des mains et environnement. *Hygiènes* 6, 449-455.

8- Berche P., Gaillard J. L., Simonet M. 1988. Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. 1ère édition, Médecine-sciences Flammarion, 660p.

9- Bio-red. 2011. Mannitol-Mobilité-Nitrate/Gélose. V4. 355-5514/356-4874.

10- Bouaziz S., Ramande A. 2006. Contrôle de l'état général d'hygiène Au niveau de service des urgences de l'hôpital de Mohamed Boudiaf. Thèse de magistère Université kasdi Merbah -Ouargla, pp 39-58-60-62.

11- Bouguenoun W. 2003. Étude de la résistance aux antibiotiques des bactéries incriminées dans les infections nosocomiales et leur dissémination dans l'environnement hospitalier de la région de guelma. Thèse de doctorat d'état, universite badji mokhtar-annaba, 176 p.

C

12- Cartier F., Beaucaire G., Perrone C., Vilde J. L. 1996. APPIT (Association des professeurs de pathologie infectieux et tropicale destinée au formateur de santé sur le thème nosocomiale et leur prévention. NOSOCO-ROM-Base Multiméd DocPédagogique.

13- CA-SFM. 1998. Antibiogramme en diffusion. Recommandations techniques et Guide d'interprétation. Communiqué 1998 du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Sanofi Diagnostics Pasteur, 12p.

14- Cavallo J. D., Antoniotti G., Baffoy N., Guignement C. S., Hajjar J., Horn C., Le Gouhir C., Le Guyader A., Lejeune B., Mounier M., Salomon V. 2002. Surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé Air, eaux et surfaces. Ministère chargé de la santé, DGS/DHOS, CTIN.

15- Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec. 2016. Recherche et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* : méthode par filtration sur membrane. MA. 700 – PSE 1.0, Rév. 4, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, 18 p.

16- Chibi A. 2015. Evaluation de formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* isolées de CHU Tlemcen. Thèse de master, université aboubekr belkaid tlemcen, 60 p.

17- CTIN : Comité Technique national des Infections Nosocomiales. 2002. Surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé : air, eaux et surfaces. Ministère chargé de la santé, 78p.

D

18- Debabza M. 2015. Emergence en milieu hospitalier des bacilles Gram négatifs multirésistants aux antibiotiques : étude bactériologique et moléculaire. Thèse de doctorat d'état, Université Badji Mokhtar-Annaba, pp. 5-60-61-62-63-64-65.

19- Denis F., Ploy M. C., Martine C., Bingen E., Quentin R. 2007. Bactériologie médicale : techniques usuelles. Paris, Elsevier Masson SAS, 640p.

20- Denis F. 2011. Bactériologie médicale : technique usuelles Elsevier Masson, pp. 430-524.

216 Didier R. 1998. Dictionnaire de maladies infectieuses diagnostic-épidémiologie-répartition géographique-taxonomie-symptomatologie. Editions scientifiques et médicales, Elsevier Masson, Paris, 1162p.

22- Delarras C. 2014. Pratique en microbiologie de laboratoire. Lavoisier, France, pp.66-67.

E

23- Eisenstein B., Zaleznif D. 2000. Enterobacteriaceae. In: Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Vol. 2. 5ème édition, Churchill Livingstone. 2294-2310

F

24- Fauchere J. L., Avril J. L. 2002. Bactériologie générale et médicale. Ellipses, Paris. 213217.

25- Flaudrois J. P. 2004. BactérioGéné/croissance bactérienne. Cours de Bactériologie Médical DCEMI, UFR Médecine Lyon Sud-laboratoire de Biométrie, p. 1-3-10.

Frenay J. R. F., Hansen W., Bollet T. C. 2000. Précis de bactériologie clinique.

G

26- Ghernaout S. 2013. Prévalence du portage nasal de *staphylococcus aureus* : son rôle dans l'infection du site opératoire. Thèse de doctorat, Université aboubeker belkaid-tlemcen, Algérie, 175p.

27- Grimont F., Grimont P. A. D. 2002. Enterobacter In : Bergy's Manual of Systematic Bacteriology. 2ème édition, Vol 2, The Proteobacteria, Partie B : The Gammaproteobacteria, USA, Springer, pp 661-671.

H

29- Hajjar H., Hartemann P., Luu-Duc D., Nicolle M. C., Perraud M., Bertrou A., Centre J. C., Chapuis C., Guignement S., Fabry J. 2000. Vigilance environnementale : Contrôles microbiologiques de l'environnement hospitalier. Hygienes, VIII (3) : 139-179.

30- Hart C. A. 2006. Klebsiella, Citrobacter, Enterobacter and Serratia spp. In S. H. Gillespie, & P. M. Hawkey (Eds.), Principles and practice of Clinical Bacteriology. 2ème édition, pp. 377- 386. England, UK: John Wiley and Sons Ltd.

I

32- Iabadene H., Messai Y., Alouache S., Arlet G., Bakour R. 2010. Mécanismes de résistance aux β -lactamines et aux quinolones d'Enterobacter dans les hôpitaux d'Alger. Revue Tunisienne d'Infectiologie, 4 (1).

34- Isenberg H. 1992. Enterobacteriaceae, In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR: Infectious Diseases. Saunders, pp 1463-1478.

J

36- Janda J. M., Abbott S. L. 2006. The Genera Klebsiella and Raoultella. The Enterobacteria, 2nd edition. Washington, USA: ASM Press, pp. 115-129.

37- Jarlier V., Nordmann P. 2000. Entérobactéries et bêta-lactamines. In Freney J, Renaud F, Hansen W, Botler C. Précis de bactériologie clinique. Paris, ESKA, pp 649-665.

39- Jean Louis F., Jaen L., Avril. 2002. Bactériologie générale et médicale, pp :199,214-239,244-249-252-260-298-306-307.

K

41- Koumba k. 2010. Fréquence d'isolement des Klebsiella au laboratoire de bactériologie CVD du CHU Gabriel tour de 2002 à 2007. these de pharmacie université de Bamako, Mali, p53.

L

42- Le Minor L., Véron M. 1989. Bactériologie médicale, 2ème édition, Flammarion MédecineSciences, Paris 2 :428-432.

43- Lehner A., Roger S., Fanning.S., Iversen C. 2011. Enterobacter In : Molecular detection of human bacterial pathogens. USA, CRC, pp 853-863.

44- Lionel H. 2003. Hygiène et soins infirmiers. 2ème édition, pp 6-10-11-16- 18,21-32-37-40-41-46-49.

45- Lister P. D., Wolter D. J., Hanson N. D. 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 22 : 582-610.

46- Lowy F. D. 1998. *Staphylococcus aureus* Infections. *N Engl J Med* 339, 520–532.
Madjmaa, O. & Boulmaize, H. (2015). Isolement et caractérisation des souches d'entérocoques multirésistantes en clinique en niveau de CHU Khelil Amrane.

M

47- Margot P., Chantal G. 2009. Les infections nosocomiales - Agir ensemble pour des milieux cliniques sains et sécuritaires, La gestion des risques 1re partie, pp 1-19.

48- Méité S., Boni C. C., Monemo P., Mlan Tanoa A. P., Faye K. H., Dosso H. 2010. Surveillance microbiologique des surfaces au niveau d'un établissement hospitalier de niveau tertiaire : exemple du chu de Yopougon, Abidjan, côte d'ivoire. *J. SCI*, 11(1) :73-81.

49- Menzinger S., Schneider A., Tschopp C. 2008. Immersion en communauté Infections nosocomiales.

N

50- Nauciel C. 2000. Bactériologie médicale, Masson, Paris, pp 47, 128, 152,148.

51- Nauciel C. 2000. Bctériologie médicale. Masson, Paris, pp 55-64.

P

52- Palleroni N. J. 2008. The road to the taxonomy of *Pseudomonas*. In: Cornelis, P. (Ed.), *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press, Belgium, pp 1–18.

53- Paterson D. L., Rossi F., Baquero F., Hsueh P. R., Woods G. L., Satishchandran V., Snyder T. A., Harvey C. M., Tepler H., DiNubile M. J. 2005. In vitro susceptibilities of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: the 2003 Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55 (6), 965.

54- Pilet C. H., Bourdon J. L., Toma B., Marchal N., Balbastre C., Person, J. 1987. Bactériologie médicale et vétérinaire. Systématique bactérienne, pp: 38-53-55-152-166-167-190-170-171-230-248.

55- Prescott M. A., Pastey M. K. 2010. Identification of Unique Blood and Urine Biomarkers in Influenza Virus and Staphylococcus aureus Co-infection: A Preliminary Study. Biomark Insights, 5 :145-151.

Q

56- Qassimi L. 2010. Épidémiologie des infections nosocomiales en milieu de réanimation (A propos de 147 cas). Thèse, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Maroc, 148p.

R

57- Richard C. I., Grimont F. 1992. Klebsiella, Enterobacter, Hafnia, Serratia. In : LE MINOR (L). Bactériologie médicale, Paris : Flammarion, 427-31p. LECLERC H., Microbiologie générale, 2e édition, 1983, 95p.

58- Roland Y. 2006. Profile antibiotique des bactéries responsables d'infection urinaire communautaire. Diplôme d'état de doctorat université Bamako-Mali, pp73-75.

S

60- SFAR : Société française d'anesthésie et de réanimation. 2002. Recommandations des experts de la SRLF : Prévention de la transmission croisée en réanimation. J. Réanim. 11 : 250–256.

61- SFAR-SRLF : Société française d'anesthésie et de réanimation et Société de réanimation de langue française. 2009. 5ème Conférence de consensus. Prévention des infections nosocomiales en réanimation -transmission croisée et nouveau-né exclus. J. Ann. Fr. Anesth., 28 : 912–920.

T

62- Tanner F., Chappuis C. 2005. Pseudomonas et infection hospitalières. Médecine et Maladies infectieuses, 13 : 390-392.

V

63- Vanden B. M., Yzerman E., Belkum A. 1999. Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. *J Clin Microbiol* 37, 31333–3140.

64- Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H., Whitman W. (Eds.). 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 3, The Firmicutes, Springer Science & Business Media

W

65- Weber DJ, Rutala W. A. 1997. Environmental issues and nosocomial infections. In: Wenzel RP. *Prevention and control of nosocomial infections* (3rd ed). Williams & Wilkins, Baltimore, pp 491-514.

66- Site web

<https://slideplayer.fr/slide/507472/>

Annexes

Annexe 1 : les milieux de culture (composition en g/l d'eau distillée)**Les milieux gélosés****Gélose nutritive**

| | |
|--------------------------|-----|
| Extrait de levure..... | 2g |
| Extrait de viande..... | 1g |
| Peptone..... | 5g |
| chlorure de sodium | 5g |
| Agar..... | 15g |
| pH = 7,4 | |

Gélose bromocrésol pourpre (BCP)

| | |
|---------------------------------|--------|
| Extrait de viande de bœuf | 03g |
| Bio-polytone..... | 05g |
| Lactose | 10g |
| Agar..... | 10g |
| Bromocrésol pourpre | 0.025g |
| Eau distillée | 1 L |
| pH = 7 | |

Hektoen

| | |
|--------------------------------|--------|
| Peptone..... | 12g |
| Extrait de levure..... | 03g |
| chlorure de sodium..... | 05g |
| Sels biliaires..... | 09g |
| Thiosulfate de sodium..... | 05g |
| Citrate de fer ammoniacal..... | 1,5g |
| Lactose..... | 12g |
| Salicine..... | 02g |
| Saccharose..... | 12g |
| BBT..... | 0,002g |

| | |
|---------------------|------|
| Fuchsine acide..... | 0,1g |
| Agar..... | 14g |
| Eau distillée | 1L |

pH = 7,5

Chapman

| | |
|--------------------------|------|
| Peptone..... | 11g |
| Extrait de viande..... | 1g |
| chlorure de sodium | 75 g |

| | |
|----------------------|--------|
| Mannitol..... | 10g |
| Rouge de phénol..... | 0,025g |
| Agar..... | 15g |
| Eau distillée..... | 1L |

pH = 7,5

Mannitol -mobilité-nitrate

| | |
|----------------------------------|-------|
| Peptone tryptique de viande..... | 20g |
| Mannitol..... | 02g |
| Rouge de phénol..... | 0.04g |
| Nitrate de potassium..... | 01g |
| Agar..... | 04g |

pH = 7,6-7,8

Gélose Muller Hinton

| | |
|---------------------------------|--------|
| Infusion de viande de bœuf..... | 300 ml |
| Peptone de caséine..... | 17,5g |
| amidon de maïs | 1,5g |
| Agar..... | 17g |

pH = 7,4±0.2

Les milieux liquide

Bouillon nutritif

| | |
|--------------------------|--------|
| Peptone | 10,0g |
| Extrait de levure | 5,0g |
| Chlorure de sodium | 5,0g |
| Eau distillée | 1000ml |

pH = 7,2

Annexe 2. Les 37 prélèvements provenant à partir de l'hôpital (Sidi Okba) et les sites des prélèvements de deux types de surface (surface sèche et surface humide).

| Services | Sites des Prélèvements | Numéro de prélèvement | Surface | Technique de prélèvement |
|-----------------|-------------------------------|------------------------------|----------------|---|
| Pédiatrie | Poignée de porte | 1 | Sèche | Frotter légèrement et rapidement avec l'écouvillon stérile mouillé préalablement avec l'eau physiologie stérile |
| | Paillasse | 2 | | |
| | Interrupteur | 3 | | |
| | Chariot | 4 | | |
| | Lit | 5 | | |
| | Robinet | 6 | Humide | |
| | Lavabo | 7 | | |

| | | | | |
|---------------------------|-----------------------------|---------|--------|--|
| Médecine interne homme | Poignée de porte | 8 | Sèche | |
| | Paillasse | 9 | | |
| | Interrupteur | 10 | | |
| | Robinet, | 11 | Humide | |
| | Lavabo | 12 | | |
| Médecine interne femme | Interrupteur | 13 | Sèche | |
| | Poignée de porte | 14 | | |
| | | Robinet | 15 | |
| Laboratoire | Interrupteur | 16 | Sèche | |
| | Poignée de porte | 17 | | |
| | Paillasse | 18 | | |
| | Robinet | 19 | Humide | |
| | Lavabo | 20 | | |
| Maternité | Échographie Obstétricale | 21 | Sèche | |
| | Sol | 22 | | |
| | Poignée de porte | 23 | | |
| | Interrupteur | 24 | | |
| | Table d'accouchem | 25 | | |

| | | | | | |
|---|--------------------------|--|----|--------|--|
| | | nt | | | |
| | | Chariot | 26 | | |
| Urgence | Bloc chirurgic ale | Chariot | 27 | Sèche | |
| | | Lit | 28 | | |
| | | Sol | 29 | | |
| | | Draguer | 30 | | |
| | | Respirateur d'anesthésie | 31 | | |
| | Salle de soins | Poignée de porte | 32 | Sèche | |
| | | Paillasse | 33 | | |
| | | Interrupteur | 34 | | |
| | | Lit | 35 | | |
| | | Lavabo | 36 | | |
| | | Robinet | 37 | Humide | |
| Le prélèvement a l'air se fait pour tous les services | | Ouvrir une boîte pétrie contenue gélose nutritive pendant 20 min | | | |

Annexe 3 : liste des antibiotique testés

| Famille | Nom de l'antibiotique | Code | Charge de disque | Diamètre critiques (mm) | | |
|----------------|---------------------------------------|------|------------------|-------------------------|---|-----|
| | | | | S | I | R |
| β-lactamines | Amoxicilline | AML | 2 µg | ≥23 | | <16 |
| Quinolones | Acide nalidixique | NA | 30 µg | ≥20 | | <15 |
| Aminosides | Gentamicine | CN | 10 µg | ≥17 | | <11 |
| Aminoglycoside | Streptomycine | S | 10µg | ≥14 | | <12 |
| Pénicillines | Amoxicilline acide clavulanique | AUG | 30 µg | ≥23 | | <16 |
| Phénicolés | Chloramphénicol | C | 30 µg | ≥23 | | <19 |

Annexe 4 : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api 20E (BioMérieux SA)

| Test | Substrat | Caractère recherché | Résultat | |
|------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------|---------------------------|
| | | | Négatifs | Positifs |
| ONPG | Ortho-nitro-phényle-Galactoside | Béta- galactosidase | Incolore | Jaune |
| ADH | L-arginine | Arginine dihydrolase | Jaune | Rouge/orangé |
| LDC | L-lysine | Lysine décarboxylase | Jaune | Orangé |
| ODC | L-ornithine | Ornithine décarboxylase | Jaune | Rouge/orangé |
| CIT | Citrate de sodium | Utilisation du citrate Vert | Vert pâle/jaune | Bleu-vert/vert |
| H2S | Thiosulfate de sodium | Production d'H2S | Incolore/grisâtre | Dépôt noir/fin Liseré |
| URE | Urée | Uréase | Jaune | Rouge/orangé |
| TDA | L-tryptophane | Tryptophane désaminase | TDA / immédiat | |
| | | | Jaune | Marron foncé |
| IND | L-tryptophane | Production d'indole | James/ 2 mn | |
| | | | Jaune | Anneau rouge |
| VP | Pyruvate de sodium | Production d'acétoïne | VP 1 + VP 2/ 10mn | |
| | | | Incolore | Rosé-rouge |
| GEL | Gélatine de kohn | Gélatinase | Non diffusion | Diffusion du pigment noir |
| GLU | D-glucose | Fermentation/oxydation | Bleu/bleu-vert | Jaune |
| MAN | D-mannitol | Fermentation/oxydation | Bleu/bleu-vert | Jaune |
| INO | Inositol | Fermentation/oxydation | Bleu/bleu-vert | Jaune |

| | | | | |
|-----|--------------|------------------------|----------------|-------|
| SOR | D-sorbitol | Fermentation/oxydation | Bleu/bleu-vert | Jaune |
| RHA | L-rhamnose | Fermentation/oxydation | Bleu/bleu-vert | Jaune |
| SAC | D-saccharose | Fermentation/oxydation | Bleu/bleu-vert | Jaune |
| MEL | D-melibiose | Fermentation/oxydation | Bleu/bleu-vert | Jaune |
| AMY | Amygdaline | Fermentation/oxydation | Bleu/bleu-vert | Jaune |
| ARA | L-arabinose | Fermentation/oxydation | Bleu/bleu-vert | Jaune |

Annexe 5 : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api 20NE (BioMérieux SA)

| Test | Composant actif | Réaction/enzyme | Résultats | |
|------|---|---|-------------------------|---------------------------|
| | | | Positive | Négative |
| NO3 | Potassium nitrate | Réduction des nitrates en Nitrites | NIT 1 +NIT 2/ 5 min | |
| | | | Incolore | Rose-rouge |
| | | Réduction des nitrates en Azote | Zn/ 5min | |
| | | | Rose | Incolore |
| TRP | L-tryptophane | Formation d'indole | Kovacs/ immédiat | |
| | | | Colore Vert pâle/ jaune | Rose |
| GLU | D-glucose | Fermentation | Bleu à vert | Jaune |
| ADH | L-arginine a | Arginine Dihydrolase | Jaune | Orange/ rose/ rouge |
| URE | Urée | Uréase | Jaune | Orange/ rose/ rouge |
| ESC | Esculine Citrate de fer | Hydrolyse (β -glucosidase | Jaune | Gris/ marron/ noir |
| GEL | Gélatine (origine Bovine) | Hydrolyse de la gélatine (protéase) | Non diffusion | Diffusion du Pigment noir |
| PNPG | 4-nitrophényl- β Dgalactopyranoside | β -galactosidase (Para-NitroPhényl- β DGalactopyranosidase) | Incolore | Jaune |
| GLU | D-glucose | Assimilation | Transparente | Trouble |
| ARA | L-arabinose | Assimilation | Transparente | Trouble |
| MNE | D-mannose | Assimilation | Transparente | Trouble |
| MAN | D-mannitol | Assimilation | Transparente | Trouble |
| NAG | N-acétyl-glucosamine | Assimilation | Transparente | Trouble |
| MAL | D-maltose | Assimilation | Transparente | Trouble |

| | | | | |
|-----|----------------------|--------------|--------------|---------|
| GNT | Potassium gluconate | Assimilation | Transparente | Trouble |
| CAP | Acide caprique | Assimilation | Transparente | Trouble |
| ADI | Acide adipique | Assimilation | Transparente | Trouble |
| MLT | Acide malique | Assimilation | Transparente | Trouble |
| CIT | Trisodium citrate | Assimilation | Transparente | Trouble |
| PAC | Acide phénylacétique | Assimilation | Transparente | Trouble |

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو البحث وتحديد النمط الظاهري للبكتيريا المسؤولة عن تلوث بيئة المستشفى الموجودة على الأسطح الجافة والرطبة. يتم عزل تسعة وأربعين سلالة من مختلف أقسام مستشفى سيدي عقبة من أجل تحديد البكتيريا الوفيرة في هذه البيئة التي يمكن أن تسبب التهابات المستشفيات. أتاحت نتائج التحليلات العيانية والمجهرية واختبارات تحديد الهوية التي أجريت على العزلات التي تم الحصول عليها تحديد 9 سلالات من بينها أربعة من بكتيريا *Enterobacteriaceae* التي تنتمي إلى النوع (الإشريكية القولونية ، *Pantoea spp.* ، *Serratia liquefaciens* ، *Klebsiella pneumoniae*) غير وڈ لائفة بكتيريا الأمعاء من النوع (*Vibrio alginolyticus* و *Pseudomonas* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus*) و *Staphylococcus epidermidis* أظهرت دراسة الحساسية للمضادات الحيوية للسلالات المعزولة

حساسية متغيرة

الكلمات المفتاحية: بيئة المستشفى، العدوى المستشفى، الحساسية للمضادات الحيوية.

Résumés

L'objectif de cette étude est la recherche et l'identification phénotypique des bactéries responsables de la contamination de l'environnement hospitalier présente sur surfaces sèches et humides. Quarante-neuf souches sont isolées de divers services de l'hôpital de Sidi Okba afin de préciser les bactéries abondantes dans cet environnement et qui peuvent causer des infections nosocomiales. Les résultats des analyses macroscopiques et microscopiques et les tests d'identification effectués pour les isolats obtenus ont permis d'identifier 9 souches y compris quatre d'Enterobacteriaceae appartenant aux espèces (*Escherichia coli*, *Pantoea spp.*, *Serratia liquefaciens*, *Klebsiella pneumoniae*) et trois non Enterobacteriaceae de l'espèce *Vibrio alginolyticus*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas aeruginosa* et deux *Staphylococcaceae* de l'espèce (*Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*). L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées a montré une sensibilité variable aux antibiotiques à tester.

Mots clés : environnement hospitalier, infection nosocomiale, la sensibilité aux antibiotiques.

Abstract

The objective of this study is the research and phenotypic identification of the bacteria responsible for the contamination of the hospital environment present on dry and wet surfaces. Forty-nine strains are isolated from various departments of the hospital of Sidi Okba in order to specify the abundant bacteria in this environment that can cause nosocomial infections. The results of the macroscopic and microscopic analyses and the identification tests carried out for the isolates obtained made it possible to identify 9 strains including four of Enterobacteriaceae belonging to the species (*Escherichia coli*, *Pantoea spp.*, *Serratia liquefaciens*, *Klebsiella pneumoniae*) and three non-Enterobacteriaceae of the species *Vibrio alginolyticus*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas aeruginosa* and two *Staphylococcaceae* species (*Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*). The study of the antibiotic susceptibility of isolated strains showed a variable sensitivity to the antibiotics tested.

Key words: Hospital environment, nosocomial infection, susceptibility to antibiotics