



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 :
Maroua DJOUDI & Hind KHELLIL

Le : mercredi 10 juillet 2019

Recherche et identification phénotypique des germes responsable des infections nosocomiales dans un milieu hospitalier « Hôpital Hakim Sâadane – Biskra »

Jury :

Dr.	Nassima BENAMEUR	MCB	Université de Biskra	Examineur
Mme.	Kenza MOHAMMEDI	MAB	Université de Biskra	Président
Mme.	Djamila MOKRANI	MAA	Université de Biskra	Rapporteur

Année universitaire: 2018 - 2019

Remerciement

Nous remercions le bon dieu de nous avoir donné la force, la patience, la santé, la volonté et le courage pour accomplir ces études.

Nous tenons à remercier notre encadreur Mme Djamila MOKRANI pour nous avoir donné l'opportunité de travailler sur ce mémoire, pour son grand soutien scientifique et moral, pour les conseils, l'encouragement, l'aide et le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer.

Permettez-nous de vous exprimer toute notre gratitude et notre profond respect.

Nos sincères remerciements aux membres de jury Dr. BENAMEUR.N et Mme MOHAMMDI .K qui ont accepté de juger notre travail.

Nous remercions tous nos amis, tous nos enseignants tout au long de nos études et tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Nous adressons nos remerciements à toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire. Responsable des services à l'hôpital Hakim Saâdan, qui a bien voulu autoriser ce travail.

Nos respectueux remerciements aux personnels du laboratoire de Département de Sciences de la Nature et de la Vie de l'université de Biskra pour leur disponibilité et leur sympathie.

Dédicace

Ma chère maman Saida :

Qui m'a donnée la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargnée aucun effort pour me rendre heureuse quoi que je fasse, je ne pourrais te rendre ce que tu as fait pour moi. Soyez fière de moi aujourd'hui et voyez à travers ce travail mon amour sincère.

Mon cher Papa MouhamedOuali :

L'homme le plus exceptionnel au monde, mon héros, le meilleur papa qu'on puisse avoir, qui a été au près de moi durant toute ma vie et mes années d'études, et qui à toujours veillé à se que rien ne m'y soit refuser.

A mon cher frère Ahmed Walid ; A tous les moments d'enfance passés avec toi mon frère, en gage de ma profonde estime pour l'aide que tu m'as apporté. Tu m'as soutenu, réconforté et encouragé. Sincèrement un grand merci pour toi

*Mes belles adorables sœurs : **Nouha** et **Malak** ; je ne pourrais exprimer à travers ses lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers vous.*

Puisse l'amour et fraternité nous unissent à jamais. Je vous souhaite la réussite dans votre vie, avec tout le bonheur qu'il faut pour vous combler. Merci pour votre précieuse aide à la réalisation de ce travail

*A ma belle **Meryouma** ; ça ne me suffit pas de dire simplement ma sœur , vous êtes bien plus qu'une sœur , avec votre tendresse , votre amour et votre soutien, vous m'avez soutenu pendant mes moments de faiblesse, de peur et de stress .je ne trouve pas les mots pour décrire mon amour et ma reconnaissance pour vous , je vous souhaite tout le bonheur du monde , que dieu vous bénisse .*

*A ma chère meilleure **Hinda** au monde, tu étais toujours l'amie la sœur pour moi durant toutes ces années, peut être on va plus se voir souvent comme avant mais je resterai toujours à tes côtés, merci de m'avoir soutenir et d'être les épaules sur lesquelles j'appuyais tout le temps durant toute ces années. Que dieu te blesse et te donne tout le bonheur du monde.*

*A notre encadreur **Mme .MOKRANI Djamilia** merci énormément pour votre aide et votre prise en charge, on ne pourra jamais rendre tout ce que vous avez fait pour nous encadrer et pour finir ce travail.*

A tous ceux qui m'ont aidé de loin ou de près afin de réaliser ce travail.

Djoudi Maroua

Dédicace

*À MES CHERS PARENTS **Zahia&Jabrane***

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

*A mon très cher frère **Badrane**, et à mes très chères sœurs **Razane&Mayoucha***

Aucun mot ne saurait décrire à quel point je vous suis reconnaissante pour tout ce que vous avez fait pour moi, vous m'avez soutenue et comblée tout au long de mon parcours. L'affection et l'amour fraternel que je vous porte sont sans limite. Pussions-nous rester unis dans la tendresse et fidèle à l'éducation que nous avons reçue.

*A ma binôme « **Maroua** » ma meilleure amie de mon parcours je vous te remerciée pour tous nos jours ensemble, nos souvenir, nos efforts pour présenter ce travail, tu été toujours la personne de mes coté avec tes encouragement.*

KHELLIL Hinda

Liste des figures**Liste des abréviations****Introduction générale..... 1****Partie bibliographique****Chapitre 01 : Infections Nosocomiales****1. Définition des infections nosocomiales 5****2. Origines des germes 5**

2.1. Flore saprophyte du malade lui-même 5

2.2. Personnel soignant médical et paramédical 5

2.3. L'environnement 5

3. Mode de transmission 5

3.1. Voie endogène 5

3.1.1. Auto-infection 5

3.2. Voie exogène 6

3.2.1. Hétéro-infection 6

3.2.2. Xéno-infection 6

3.2.3. Exo-infection 6

4. facteurs à risques..... 7

4.1. Facteurs liés à l'hôte 7

4.1.1. Âge 7

4.1.2. Sexe 7

4.1.3. Etat immunitaire 7

4.2. Facteurs liés à l'environnement 7

4.3. Services à risque 7

5. Diverses infections nosocomiales et fréquences..... 8

5.1. Infections urinaires 8

5.2. Infections post-opératoires 8

5.3. Infections respiratoires 8

5.4. Infections sur cathéter 8

5.5. Les autres localisations infectieuses 8

Chapitre 02 : Germes responsables des infections nosocomiales

1. Les bactéries	10
2. Les autres agents	11
2.1. Les viroses	11
2.2. Parasites et champignons.....	11

Partie expérimentale**Chapitre 03 : Matériel et méthode**

1. Matériel.....	14
2. Méthodes.....	14
2.1. Réalisation des prélèvements.....	14
2.2. Isolement	15
2.3. Purification	16
2.4. Conservation des souches.....	16
2.5. Test préliminaire.....	16
2.5.1. Examen microscopique après coloration différentielle.....	16
2.5.2. Etude biochimique (galerie classique)	17
2.5.2.1. Test de catalase.....	17
2.5.2.2. Milieu mannitol mobilité.....	18
2.5.2.3. Utilisation du citrate comme unique source de carbone.....	18
2.5.2.4. Gélose T.S.I (Triple Sugar Iron agar).....	19
2.5.2.5. Milieu Urée – Indole.....	19
3. Identification des champignons	20

Chapitre 04 : Résultats et discussion

1. Analyse des prélèvements.....	23
2. Caractérisation des isolats.....	24
2.1. Aspect macroscopique des isolats	26
2.2. Aspect microscopique.....	31
2.3. Etude biochimique (galerie classique).....	32
2.3.1. Test de catalase.....	33
2.3.2. Milieu TSI.....	34

2.3.3. Test du mannitol mobilité	38
2.3.4. Recherche de l'utilisation du citrate.....	40
2.3.5. Test d'urée-indole	41
3. Identification des souches.....	42
4. Répartition des microorganismes au niveau des services	44
Conclusion.....	55
RéférenceBibliographie	57

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
	La répartition des 18 prélèvements provenant de	
01	l'hôpital (Hakim Sâadane-Biskra) et les sites de prélèvement de différents Types de surface.....	15
02	Analyse microbiologique des prélèvements isolés d'hôpital Hakim Sâadane.....	23
03	Aspect de culture des bactéries trouvées sur les cinq milieux de cultures (gélose nutritive (GN), Baird Parker, Hektoene, Mac Conkey, Sabouraud).....	26
04	Codification des colonies trouvées dans des services des différents types de surface.....	28
05	Identification des souches	42
06	Aspect des levures et moisissures isolées.....	43
07	Répartition de 13 germes responsables d'infection nosocomiale.....	45

Liste des figures

N°TitrePage

01 Transmission de l'infection hospitalière **06**

02 Ensemencement des prélèvements sur les cinq milieux de cultures..... **24**

03 Aspects macroscopiques des colonies obtenues dans le milieu Hektoene.....**29**

04 Aspects macroscopiques des colonies obtenues dans le milieu Mac Conkey.....**29**

05 Aspects macroscopiques des colonies obtenues dans le milieu Baird Parker.....**30**

06 Aspects macroscopiques des colonies obtenues dans le milieu Sabouraud.....**30**

07 Aspects macroscopiques des colonies obtenues dans le milieu Gélose nutritive.....**30**

08 Observation Microscopique des bacilles Gram négatif isolées à partir de
service « néonatalogie d'un lit d'un patient ».....**31**

09 Observation microscopique des cocci Gram positif isolées du service
« Cardiologie partir d'un poignet d'une chambre de malade».....**31**

Observation microscopique d'un type des levures isolées du service	
10 « Pédiatrie à partir du téléphone fixe ».....	32
<hr/>	
11 Observation microscopique d'un type des moisissures isolées du service	
« Cardiologie à partir d'un masque a réanima » coloration par bleu de méthylène.....	32
<hr/>	
12 Résultat de test de catalase	34
<hr/>	
13 Résultat de test de TSI pour les quatre souches HC1a ; MC1a ; HC1b ; MC1b.....	34
<hr/>	
14 Résultat de test de TSI pour la souche HC2a.....	35
<hr/>	
15 Résultat de test de TSI pour la souche MC2b.....	35
<hr/>	
16 Résultat de test de TSI pour la souche GC1.....	36
<hr/>	
17 Résultat de test de TSI pour la souche MC2c.....	37
<hr/>	
18 Résultat de test de TSI pour la souche MC2b.....	37
<hr/>	
19 Résultat de test de mannitol pour la souche HC1a.....	38

20	Résultat de test de mannitol pour la souche HC2a.....	39
21	Résultat de test de mannitol pour la souche MC2c.....	39
22	Résultat de test de mannitol pour la souche BC2.....	40
23	Résultat de test de citrate.....	40
24	Résultat de test d'Urease	41
25	Résultat de Test d'Indole.....	42
26	Fréquence des germes	46
27	Répartition d' <i>E coli</i> selon les services.....	50

Liste des abréviations

IAS	Infection Associées aux Soins
OMS	Organisation Mondiale de Santé
MSPRH	Ministère de la Santé de la Population et de Réforme Hospitalière
MRIN	Microorganismes Responsables des Infection Nosocomiales
CIT	Citrate de soduim
GLU	Glucose
GN	Gélose nutritive
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
H₂S	Sulfure d'hydrogène
IN	Infection nosocomiale
IND	Indole
K.E.S	<i>Klebsiella- Enterobacter– Serratia</i>
MAN	D-mannitol
O₂	Oxygène
SNV	Sciences de la Nature et de la Vie
T.S.I	Triple SugarIron agar
TDA	Tryptophane Désaminase

URE	Uréase
IAS	Infections Associées Aux Soins

Introduction générale

Les infections nosocomiales (IN) ou infections associées aux soins (IAS) sont devenues aujourd'hui un sujet d'actualité, d'où elles constituent un sérieux problème de santé publique, générateur de coûts humains (morbidité et mortalité) et socioéconomiques importants. Le surcoût financier engendré par ces infections est un des éléments majeurs de sensibilisation des décideurs à la mise en œuvre d'une politique de prévention.

Selon l'Organisation Mondiale de la santé (OMS), en 2005 plus de 1,4 millions de personnes dans le monde souffrent de complications infectieuses induites par les soins. Dans certains pays en développement, la proportion des malades hospitalisés atteints dépasse 25%, tandis que dans les établissements modernes des pays dits développés, seule 5 à 10% des patients admis dans les services de soins aigus contractent une infection liée aux soins (World Health Organization. 2005).

Des épidémiologistes ont depuis longtemps alerté de la prévalence très élevée des infections nosocomiales en Algérie, tout en assurant que le « risque zéro » n'existe pas et ne peut être atteint même dans les pays les plus développés.

Selon le ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière (MSPRH), le taux de prévalence en 2012 varie entre 12 et 15 %, un taux qui est loin de refléter la réalité du terrain, mais qui est déjà très élevé par rapport à ceux observés dans les pays développés. (Kernane *et al.*, 2013).

Signalons qu'en Algérie et dans la plupart des pays Maghrébins, il n'existe aucun système de mesure qui permet d'objectiver l'importance du risque dans les hôpitaux ; les infections nosocomiales restent ainsi un problème méconnu et non perçu comme une priorité.

Malgré la disponibilité de différents matériels de stérilisations et d'hygiènes dans les établissements de santé, ces infections persistent de plus en plus et ceci à cause de certains facteurs de risque – que nous verrons davantage plus loin - qui a contribué à une augmentation de l'incidence de ces infections. Pour cela, la moindre diminution des taux des infections nosocomiales représente un vrai défi pour chacun de ces établissements (Kernane *et al.*, 2013).

L'environnement hospitalier joue un rôle dans la transmission des germes responsables des infections nosocomiales, cet environnement comprend habituellement l'eau, l'air, et les surfaces.

L'objectif de cette étude est :

- la mise en évidence et l'isolement des germes aux niveaux des divers services d'un environnement hospitalier à partir de différentes surfaces.
- L'identification des souches par examen microscopique et l'utilisation de la galerie biochimiques classique.

Le présent travail s'articule sur deux parties :

Partie bibliographique :

Est consacrée à un aperçu général sur les infections nosocomiales et les microorganismes responsables ces infections.

Partie pratique :

- Comporte la méthodologie de pratique effectuée dans l'hôpital Hakim Saadane Biskra englobant les parties suivantes :
 - Echantillonnages dans 5 environnements hospitaliers.
 - Isolements des germes et purification.
 - Coloration de Gram et examen microscopique.
 - Identifications en utilisant la Galerie Classique.
 - Dernier axe vise à discuter les différents résultats obtenus.

Enfin, une conclusion générale qui achève ce travail.

Partie
bibliographique

Chapitre 01
Infections
Nosocomiales

1. Définition des infections nosocomiales

Une infection nosocomiale est une infection acquise par les malades au cours de l'hospitalisation qui n'était ni en incubation, ni présente à l'admission du malade, et dont les manifestations cliniques apparaissent habituellement après la 48^{ème} heure d'hospitalisation, lorsque la situation précise du malade n'est pas connue, un délai d'au moins 48 heures après l'admission (ou un délai supérieur à la période d'incubation lorsque celle-ci est connue) est communément accepté pour séparer une infection d'acquisition communautaire d'une infection nosocomiale (Beaucaire, 1997).

2. Origines des germes

2.1. Flore saprophyte du malade lui-même

Elle subit des modifications qualitatives au cours de l'hospitalisation. Ces modifications sont dues à l'environnement hospitalier et à certains traitements (antibiotiques, immunosuppresseurs) (Berche et *al.*, 1991).

2.2. Personnel soignant médical et paramédical

La contamination peut se faire par le biais du personnel soignant qui transmet au patient ses germes ou lui transmet les germes d'un autre patient avec ses instruments ou ses mains souillées (Berche et *al.*, 1991).

2.3. L'environnement

Il est moins déterminant que les deux précédentes origines dans le cadre de programmes de prophylaxie. Il peut être contaminé par le personnel ou par le patient. Il comprend les divers appareillages d'assistance respiratoire et de monitoring par voie intra vasculaire, les lavabos, les instruments, les tubulures, la nourriture, l'air ambiant (Berche et *al.*, 1991).

3. Mode de transmission

Les modes de transmissions sont variés (Fig1).

3.1. Voie endogène

3.1.1. Auto-infection

Le malade s'infecte avec ses propres germes à la faveur d'un acte invasif (porte d'entrée) et /ou en raison d'une fragilité particulière (Garner et *al.*, 1988).

3.2.Voie exogène

3.2.1. Hétéro-infection

Les mains ou les instruments de travail du personnel médical ou paramédical. C'est à ce mode de contamination que s'appliquent les mesures prophylactiques traditionnelles (Hygiène des mains, procédures de désinfection et de stérilisation, sécurité de l'environnement) (Garner et al., 1988).

3.2.2. Xéno-infection

Les agents infectieux sont importés à l'hôpital par les malades, le personnel soignant, ou les visiteurs (Berche, et al., 1988).

3.2.3. Exo-infection

Cette infection est liée à des avaries techniques (stérilisation inefficace, filtre à air non stérile, eau polluée). Ils sont susceptibles d'être contaminés et peuvent ainsi provoquer des infections nosocomiales souvent épidémiques (Berche, et al., 1988).

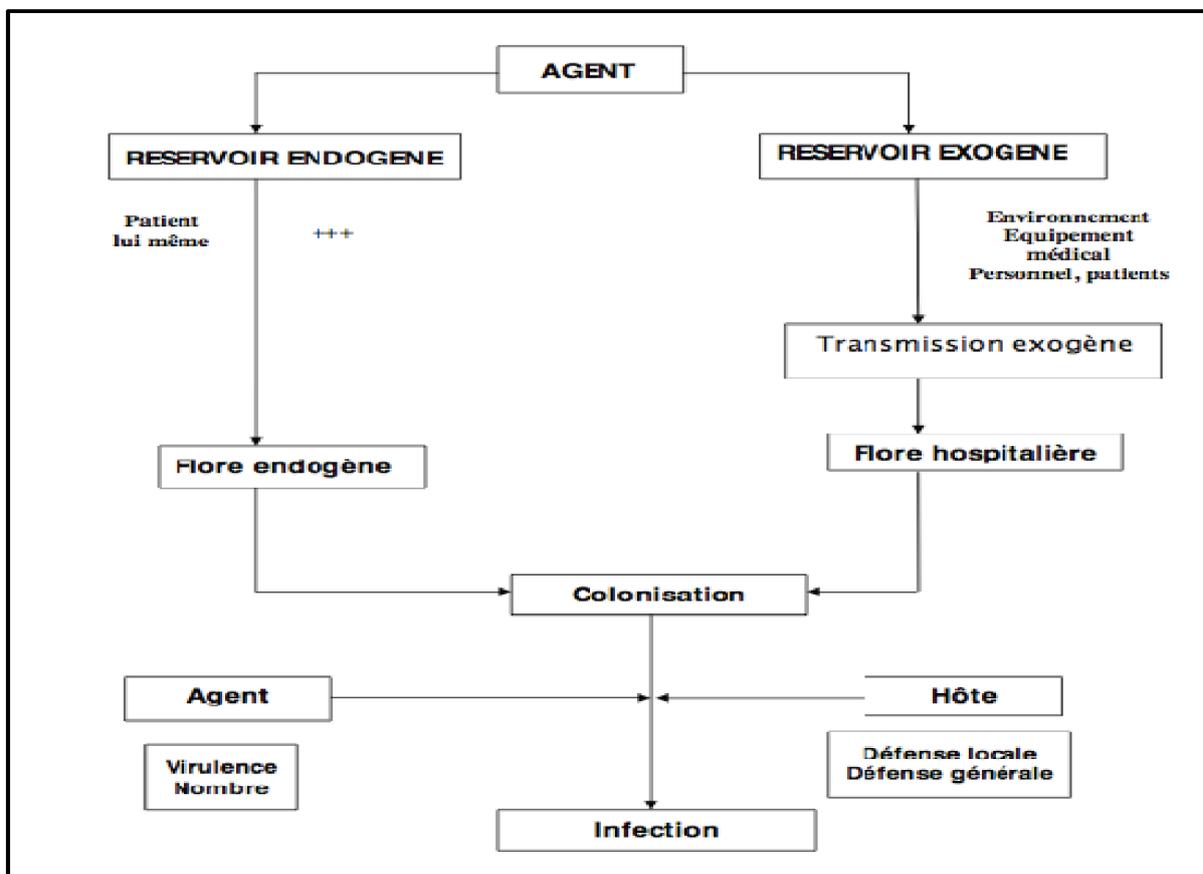


Figure N°1 Mode de transmission de l'infection hospitalière (Lasseau et al., 1989).

4. facteurs à risques

De nombreux facteurs favorisent l'infection chez les patients

4.1.Facteurs liés à l'hôte

4.1.1. Âge

Les taux des infections nosocomiales sont plus élevés chez les personnes âgées (Jarvis et *al.*, 1991).

4.1.2. Sexe

Concernant les infections nosocomiales urinaires, le risque est deux fois plus élevé chez la femme, alors que le risque de bactériémie est plus élevé chez l'homme (Mchich, 2002).

4.1.3. Etat immunitaire

L'incidence des infections nosocomiales croit énormément avec l'immunodépression, c'est le cas des vieillards, des diabétiques, des obèses, des dénutris, des patients ayant une insuffisance rénale ou hépatique, des brûlés, des éthyliques et des cancéreux (Avril et *al.*, 1989).

4.2.Facteurs liés à l'environnement

L'environnement comprend les divers appareillages d'assistance respiratoire (l'humidificateur, respirateur...), les lavabos, les instruments à visée diagnostique ou de soins (stéthoscopes ; tensiomètre...), les liquides perfusés et les tubulures, la nourriture et l'air ambiant (Zeroual, 2012).

4.3.Services à risque

L'incidence des infections nosocomiales est différentes selon les secteurs d'hospitalisation, ainsi les unités de réanimation ou les services de soins aux personnes âgées ont une incidence plus élevée (Carlet et *al.*, 1989); au niveau des unités de soins intensifs polyvalents ; elle est estimée à environ 20%. Dans les unités de réanimation néonatale, elle varie entre 5,2 et 24,6% (Mchich, 2002). De même, selon les différentes spécialités une disparité est observée : pour la réanimation 30%, la médecine 7%, la chirurgie 7%, la pédiatrie 3,8%, la psychiatrie 2,7% (Mchich, 2002).

5. Diverses infections nosocomiales et fréquences

On peut distinguer les infections nosocomiales d'origine bactérienne en fonction de leur localisation primitive.

5.1. Infections urinaires

Les infections urinaires sont associées à une plus faible morbidité que les autres infections nosocomiales, mais peuvent dans certains cas provoquer une bactériémie potentiellement mortelle.

Les bactéries responsables proviennent de la flore intestinale du patient, normale (*Escherichia coli*) ou acquise à l'hôpital (*Klebsiellamultirésistantes*) (Ahmed, 2013).

5.2. Infections post-opératoires

Les infections bactériennes provoquées par l'acte opératoire représentent près de 23% des infections nosocomiales et l'on admet qu'environ 7% de plaies postopératoires s'infectent dans Les jours qui suivent l'intervention. Le germe le plus souvent rencontré est le staphylocoquedoré. (Toure, 2004)

5.3. Infections respiratoires

Les infections respiratoires sont surtout observées dans les unités de réanimation ou de soin intensif représentant près de 15% des infections. (Ahmed, 2013).

5.4. Infections sur cathéter

La technique de la pose et la localisation du cathéter jouent un rôle important sur la fréquence des infections. Les germes en cause sont très souvent des bactéries de la flore cutanée tels que *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* (50 à 70%) et les bacilles à Gram négatif (Mallaret et Olive, 1996).

5.5. Les autres localisations infectieuses

Il existe de nombreux autres sites potentiels d'infection, par exemple

Infections de la peau et des tissus mous : les plaies ouvertes (ulcères, brûlures, escarres) favorisent la colonisation bactérienne et peuvent conduire à une infection généralisée.

La gastro-entérite est l'infection nosocomiale la plus fréquente chez l'enfant, avec un rota virus comme principal agent pathogène.

Autres infections de la sphère ORL, infections de l'œil et de la conjonctive (Ahmed, 2013).

Chapitre 02

Germes responsables des infections nosocomiales

Germes responsables des infections nosocomiales

En ce qui concerne les infections nosocomiales la plupart des agents pathogènes en cause appartiennent à la flore hospitalière(Ahmed,2013).

1. Les bactéries

Ce sont les plus courants des agents pathogènes responsables d'infections associées aux soins On peut distinguer :

- Les bactéries commensales : présentes dans la flore normale des sujets en bonne santé.

Elles jouent un rôle protecteur significatif en empêchant la colonisation par des microorganismes pathogènes.

Certaines bactéries commensales peuvent provoquer une infection si les défenses immunitaires de l'hôte sont affaiblies (Coella et al, 1993).

Les staphylocoques cutanés à coagulase-négative provoquent des infections sur cathéter vasculaire et les *Escherichia coli* présentes dans l'intestin sont la cause la plus courante d'infections urinaires (Coella et al, 1993).

- Les bactéries pathogènes : ont une virulence plus élevée et provoquent des infections (Sporadiques ou épidémiques) quel que soit l'état immunitaire de l'hôte :

– Bactéries a Gram positif : *Staphylococcus aureus* (bactérie cutanée qui colonise la peau et le nez du personnel hospitalier et des patients) provoque une grande variété d'infections pulmonaires, osseuses, cardiaques et sanguines et résiste fréquemment aux antibiotiques.

Les streptocoques bêta-hémolytiques sont également des agents pathogènes importants.

– Bactéries a Gram négatif : les entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Serratiamarcescens*) peuvent coloniser certains sites lorsque les défenses immunitaires de l'hôte sont affaiblies (site d'insertion d'un cathéter, d'une canule, sonde urinaire) et provoquer des infections graves (infection du site opératoire, infection pulmonaire, bactériémie, infection du péritoine).

– Autres micro-organismes a Gram négatif : *Pseudomonas spp.* sont souvent isolés dans l'eau et les milieux humides. Ils peuvent coloniser les voies digestives des patients hospitalisés.

– Plusieurs autres bactéries représentent un risque spécifiquement hospitalier (les diverses espèces de *Legionella* peuvent provoquer des pneumopathies (sporadiques ou endémiques) par inhalation d'aérosols impliquant de l'eau contaminée (climatisation, douches, aérosols à visée thérapeutique).

– Les anaérobies a Gram positif : (*Clostridium*) provoquent la gangrène (Coella et al.,1993).

2. Les autres agents

2.1. Les viroses

De toutes les infections nosocomiales documentées, seulement 5% sont causées par des virus dont l'unique réservoir en milieu hospitalier est l'homme-. Les services de pédiatrie sont de loin les plus affectés. L'implication des virus (hépatite B, CMV, VIH), dans un contexte nosocomial est avérée autant chez l'adulte que chez l'enfant (El Bouderkouï, 1988).

2.2. Parasites et champignons

Certains parasites (par exemple *Giardia lamblia*) se transmettent facilement chez l'adulte et l'enfant. De nombreux champignons sont des agents opportunistes et provoquent des infections en cas de traitement antibiotique prolongé et d'immunodépression sévère (*Candida albicans*, *Aspergillus spp*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptosporidium*). Ils sont une cause majeure d'infection généralisée chez les patients immunodéprimés. La contamination de l'environnement par des germes aéroportés comme *Aspergillus spp*. Présent dans les poussières et le sol (Ducel et al., 2002).

Partie expérimentale

Chapitre 03

Matériel et méthodes

Cadre d'étude

Dans notre travail, les prélèvements ont été réalisés à partir de divers sites d'environnement hospitalier (pédiatrie, pédiatrie nourissants, médecine interne femme, médecine interne homme, cardiologie) de l'hôpital Hakim Sâadane wilaya de Biskra.

Les différentes manipulations microbiologiques sont réalisées dans le laboratoire de microbiologie département de SNV à l'université de Biskra.

1. Matériel

L'ensemble des milieux de culture, réactifs et appareillages seront cités au fur et à mesure de leurs utilisations.

2. Méthodes

2.1.Réalisation des prélèvements

Les prélèvements ont été réalisés à partir de différents sites environnementaux : des surfaces sèches (coin de la pièce, lit, poignée de porte, appareils, sol, paillasses), des surfaces humides (sanitaire) (Tab N°1).

Nous avons utilisé la méthode d'écouvillonnage qui consiste à frotter sur la surface sèche à analyser, l'extrémité cotonnée de l'écouvillon préalablement humidifiée à l'aide d'eau physiologique stérile, puis tromper et agiter dans un tube contenant 9 ml du bouillon nutritif. Si la surface à analyser est humide, il suffit de frotter directement sans l'utilisation de l'eau physiologique (Debabza, 2014).

Les échantillons ainsi prélevés ont été rapidement transportés, dans un sac isotherme avec des glaçants à l'intérieur en contact des prélèvements écouvillonnées, au laboratoire de microbiologie, où 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.

Tableau 1. Répartition des 18 prélèvements provenant des hôpitaux (Hakim Sâadane-Biskra) et les sites de prélèvement.

Service	Nombre des prélèvements	Type de surface
Pédiatrie	04	Paillasse
		Téléphone
		Sanitaire
		Masque a réanima
Néonatalogie	04	Masque a réanima
		Poignet
		Sol
		Lit
Médecine interne homme	03	Lit
		Poignet
		Moniteur de surveillance
Médecine interne femme	03	Seringue électrique
		Mur
		Sol
Cardiologie	04	Masque a réanima
		Défibrillateur
		Sol
		Poignet

2.2. Isolement

Après incubation, l'isolement a été fait à partir des tubes de bouillon nutritif présentant un trouble.

Cinq types de milieux de culture ont été utilisés : la gélose nutritive (GN) et la gélose MacConkey, Hektoen, Baired Parker (BP), et la gélose Sabouraud.

L'ensemencement se fait par l'anse de platine ou une pipette Pasteur à la surface de la gélose.

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

2.3.Purification

Après une lecture morphologique (examen macroscopique des bactéries pour déterminer les caractères culturels de ces bactéries par exemple : forme de la colonie, nombre types de colonies) (Delarras, 2007).

Les différentes colonies obtenues sont ré-isolées sur le même milieu afin d'obtenir de souches pures.

2.4.Conservation des souches

La conservation courte durée des isolats purifiés a été réalisée par ensemencement sur les quatre milieux de cultures inclinée (GN, Mac Cokey, Hektoen, Baird parker). Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les tubes ont été conservés au réfrigérateur à 4°C.

2.5.Test préliminaire

2.5.1. Examen microscopique après coloration différentielle

Principe

La coloration de Gram est basée sur la différence de perméabilité des bactéries à l'alcool (Beraud, 2001). Donc sur la composition chimique de la paroi, elle permet de distinguer la morphologie des bactéries et de les classer en deux grands groupes, celui des Gram positive et celui des Gram négative, basés sur la composition pariétale en lipides qui est élevée (20%) chez les Gram négatives et faible chez les Gram positives (Carbonelle et *al.* 1990).

Technique

La coloration différentielle distingue les bactéries en fonction de la structure de leur paroi .Deux colorations de référence sont employées, la coloration de Gram distinguant bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif. Elle est réalisée comme suit :

- Sur frottis fixé à la chaleur.
- Recouvrir la lame de violet de gentiane : 1 minute.
- Rejeter le violet de gentiane.
- Recouvrir le lugol : 1 minute.

- Rejeter le lugol.
- Décolorer à l'alcool, la lame était tenue inclinée. En pratique la durée de décoloration est suffisante lorsque ce qui s'écoule en bas de la lame inclinée est devenu clair.
- Stopper la décoloration par un nouveau lavage à l'eau.
- Recouvrir la lame de fuschine diluée, 30 secondes à 1 minute.
- Laver à l'eau.
- Sécher entre deux feuilles de papier filtre, puis à la chaleur.
- Examiner à l'immersion (Denis et *al.* 2007).

Lecture

Les bactéries à Gram positif doivent apparaître colorées en violet et les bactéries à Gram négatif en rose (Denis et *al.* 2007).

2.5.2. Etude biochimique (galerie classique)

2.5.2.1. Test de catalase

Principe

La catalase est une enzyme anti-oxydante présente chez les bactéries aérobies et dans les cellules des plantes et des animaux. Le peroxyde d'hydrogène engendré comme sous-produit du métabolisme est un agent oxydant puissant et nocif qui doit être éliminé. La catalase assure cette fonction d'élimination en convertissant le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Perry et *al.*, 2004), (Anna Rita, 2006) ; selon l'équation :



Technique

Pour cela, une goutte d'eau oxygénée à 3 %, prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur est déposée sur une lame de microscope optique. Une partie de la colonie pure à tester est alors déposée sur la goutte d' H_2O_2 , à l'aide d'une anse en plastique stérile (Anna Rita, 2006).

Lecture

La formation de bulles engendrée par la production d'oxygène (O₂), due à l'activité de la catalase, indique une réaction positive (Anna Rita, 2006).

2.5.2.2.Milieu mannitol mobilité**Principe**

Il s'agit d'un milieu semi-solide contenant entre autres du mannitol, et du rouge de phénol comme indicateur de pH (Denis et *al.* 2007).

Technique

- Le milieu est ensemencé par piqûre centrale jusqu'au fond des tubes à l'aide d'une anse de platine.
- Incuber à 37°C pendant 24 h à 48 h.

Lecture

Lorsque l'indicateur coloré passe du rouge au jaune, ce qui correspond à l'acidification du milieu, le mannitol a été utilisé.

Le caractère mobile est défini dans ce milieu par un trouble envahissant toute la largeur de la gélose de part et d'autre de la piqûre centrale, alors qu'une bactérie immobile ne se développe que le long de la piqûre centrale (Denis et *al.* 2007).

2.5.2.3.Utilisation du citrate comme unique source de carbone**Principe**

Le milieu au citrate de Simmons contient du citrate de sodium et du sel d'ammonium ainsi que du bleu de bromothymol. Où il détermine si la bactérie peut utiliser le citrate comme seule source de carbone (Denis et *al.*, 2007).

Technique

- À partir d'une colonie obtenue sur gélose, à l'aide d'une anse de platine, nous avons fait un prélèvement peu abondant, puis ensemencé en stries serrées la surface de la pente du milieu gélosé.
- Incubé à 37°C pendant 24 à 48 heures (Guiraud, 2003).

Lecture

Une utilisation du citrate se traduit par une culture sur la gélose et, le plus souvent, cette croissance s'accompagne d'une libération d'ammoniaque à partir des sels d'ammonium, ce qui se traduit par un virage du bleu de bromothymol au bleu (Denis *et al.* 2007).

2.5.2.4. Gélose T.S.I (Triple Sugar Iron agar)

Principe

Cette gélose permet l'identification des Entérobactéries par la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose (avec ou sans production de gaz), du saccharose et de la production de sulfure d'hydrogène (H₂S) (Leulmi, 2015).

Technique

- Elle consiste à ensemencer en stries de la pente de la gélose puis par piqûre centrale du culot.
- La lecture se fait après 18h d'incubation à 37°C (Guiraud, 2003).

Lecture

Lecture de glucose et du gaz au niveau du culot

- La fermentation du glucose se traduit par le virage au jaune du culot.
- La production de gaz se traduit par la formation ou non de bulles de gaz dans la masse du culot.

Lecture de la pente

- La fermentation du glucose et /ou du lactose se traduit par le virage au jaune de la masse du culot.

Production de l'H₂S se traduit par noircissement du milieu (Guiraud, 2003).

2.5.2.5. Milieu Urée – Indole

Principe

Ce milieu permet de mettre en évidence les caractères suivants

- Présence d'une uréase.
- Présence d'une tryptophanase.
- Présence d'un tryptophane désaminase (TDA) Ce milieu est utilisé pour l'identification des entérobactéries (bacille Gram -, oxydase -).

Technique

- Ensemencer avec quelques gouttes de suspension bactérienne ou avec une colonie prélevée à l'anse sur un milieu solide.
- Incubation 24 heures à 37°C.

Lecture

Lecture d'Uréase

- **Milieu rouge**

Alcalinisation du milieu due à la dégradation de l'urée, la bactérie possède l'uréase elle est dite uréase +.

- **Milieu orangé (inchangé)**

Pas d'alcalinisation du milieu La bactérie ne possède pas l'uréase elle est dite uréase -

Lecture d'Indole

Recherche de la production d'indole

Ajouter 3 gouttes du réactif de Kovacs et effectuer la lecture sans agiter le milieu.

- Apparition d'un anneau rouge Présence d'indole.
- Le tryptophane a donc été hydrolysé, la bactérie a produit de l'indole et elle est dite indole+.
- L'anneau reste orangé.
- Absence d'indole, la bactérie n'a pas produit d'indole et elle est dite indole -.

3. Identification des champignons

Après quelques jours d'incubation des champignons sur le milieu Sabouraud, on tombe sur de nombreuses espèces qui sont difficiles à identifier à l'œil nu, donc on doit faire une étude macroscopique puis une étude microscopique.

3.1. Étude macroscopique

L'identification macroscopique est un acte essentiel.

On doit noter

- La vitesse de croissance : nombre de jours pour obtenir une culture (1, 2, une semaine, deux à trois semaines).
- L'aspect de la colonie en surface et la forme de la colonie : type bactérienne ou filamenteuse duvet, acumination centrale, poudreuse
- La couleur de la colonie : blanc, jaune, rouille, chamois ± clair, gris verdâtre, beige, violet, cireuse, ocre, jaune, rosée...

3.2. Étude microscopique

Tests microscopiques après isolement

Examen direct

Comme à l'examen direct du produit pathologique, l'état frais permettra une orientation de l'identification ou une identification en lien avec la macroscopie.

Pour les filamenteux, cet examen doit absolument prélever le mycélium sans le casser pour voir les fructifications. Les hyphes : couleur, présence ou non de cloisons, diamètre approximatif, structures particulières. Structure et disposition des spores : couleur, forme, nombre, cloisons, taille

Les études microscopiques sont faites à partir d'un échantillon monté entre lame et lamelle dans une goutte d'eau ou de colorant. (Barnett *et al.*, 1972).

❖ Pour les colonies de types bactérie

- Ajouter une goutte d'eau distillée sur une lame.
- Prélever une colonie des levures à l'aide d'une anse de platine.
- Déposer la colonie sur la goutte d'eau distillée et les mélanger.
- Poser la lamelle, en partant d'une position inclinée.
- Faire l'observation microscopique à un grossissement (X40).

❖ Pour les colonies filamenteuses

- Prélever les extrémités des colonies parce que sont les colonies les plus jeunes
- Prélever des colonies au niveau de centre qui sont des colonies âgées.
- Puis déposer tous les deux types des colonies sur une lame bien séparés.
- L'ajout de goutte de colorant (bleu de méthylène) pour bien visualiser.
- Déposer la lamelle.
- Observation microscopique X40.

Chapitre 04

Résultats et discussions

Dans ce chapitre, nous présente tous les résultats de cette recherche et l'identification phénotypique des germes isolés dans un milieu hospitalier (Hakim Sâadane- Biskra).

1. Analyse des prélèvements

Après une période d'incubation à 37°C pendant 24h à 48h en bouillon nutritif, nous avons obtenu les résultats résumés dans le tableau (2)

Tableau 2. Analyse microbiologique des prélèvements isolés d'hôpital Hakim Sâadane.

Service	Nombre des prélèvements	Type de surface	Résultats après 24h à 48h à 37°C
Pédiatrie	04	Paillasse	+
		Téléphone	+
		Sanitaire	+
		Masque a réanima	+
Néonatalogie	04	Masque a réanima	+
		Poignet	+
		Sol	+
		Lit	+
Médecine interne homme	03	Lit	+
		Poignet	+
		Moniteur de surveillance	+
Médecine interne femme	03	Seringue électrique	+
		Mur	+
		Sol	+
Cardiologie	04	Masque a réanima	+
		Défibrillateur	+
		Sol	+
		Poignet	+

Dix-huit prélèvements de surface ont été collectés à partir de cinq services à l'hôpital Hakim Sâadane. Les échantillons de surface ont été déposés dans un milieu d'enrichissement (bouillon nutritif). Après l'incubation de 24 à 84h à 37°C, on observe que le bouillon obtient trouble qui indiquant la multiplication des bactéries, puis les échantillons sont ensemencés sur les cinq milieux de culture : Gélose nutritive (GN) ; la Gélose MacConkey, Hektoene, Baird Parker (BP), et la gélose Sabouraud. (Fig 2)



Figure N°2 Ensemencement des prélèvements sur les cinq milieux de cultures

2. Caractérisation des isolats

Nous avons utilisé dans notre étude, pour isoler les différents types des microorganismes responsables des infections nosocomiales (MRIN), cinq milieux considérés qui sont :

Une gélose nutritive

Ce milieu est dit non sélectif car il ne permet pas de sélectionner une souche bactérienne précise. Ce milieu permet donc à toutes souches bactériennes de pouvoir pousser, à condition qu'elles soient non exigeantes (Fleury, 1988).

Le milieu Baird Parker

La gélose Baird Parker est le milieu sélectif des *S. aureus*. Milieu semi-synthétique Ce milieu est caractérisé par Une base nutritive riche.

Les colonies de *S. aureus* présentent un aspect caractéristique après 24 heures d'incubation à 37 °C : Colonies noires, brillantes, entouré d'un halo transparent et d'un liseré opaque de 2 à 5 mm de diamètre.

D'autres germes : *Micrococcus*, *Bacillus*, voire levures peuvent cultiver sur ce milieu sans être inhibés mais leurs aspects macroscopiques sont différents de celui de *S. aureus* après 24 heures (Fleury, 1988)

Gélose Hektoen

La gélose Hektoen est un milieu d'isolement des *Salmonelles* et des *Shigelles*, bien que de nombreuses bactéries à Gram négatif puissent se développer sur ce milieu. L'identification d'entérobactéries pathogènes repose sur le non utilisation des glucides présents dans le milieu (Fleury, 1988).

Le résultat de la culture dans ce milieu

- Colonies saumon : *Escherichia*, *Levinea*, *Citrobacterdiversus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Yersinia*.
- Colonies saumon à centre noir *Citrobacterfreundii*, *Proteusvulgaris*,
- Colonies bleu-vert à centre noir Suspicion de *Salmonella*, à différencier de *Proteus mirabilis*
- Colonies bleu-vert ou vertes Suspicion de *Shigella* ou de *Salmonella* (Fleury, 1988).

Milieu Mac Conkey

Milieu sélectif pour l'isolement des bacilles Gram- *Salmonella* et *Shigella* ainsi que des bactéries coliformes dans les eaux, les produits alimentaires, les produits pharmaceutiques et biologiques.

Ce milieu contient deux inhibiteurs de la flore Gram+, les sels biliaries et le cristal violet.

Le milieu contient un critère de différenciation, le lactose dont l'utilisation est révélée par l'indicateur coloré du milieu, le rouge neutre, il vire au rouge en milieu acide.

Si la bactérieensemencée fermente le lactose, le milieu devient rouge, par virage du rouge neutre, du fait de l'acidification du milieu (Fleury, 1988).

La lecture après l'incubation de 18 à 24 h à 37 °C.

- Colonies rouges entourées d'un halo opaque de la même couleur du à la précipitation des sels biliaries: lactose+
- Colonies jaunes ou incolores : lactose- (Fleury, 1988).

La gélose de Sabouraud

La gélose de Sabouraud constitue un milieu classique pour la culture, l'isolement et l'identification des levures et des moisissures saprophytes ou pathogènes.

Elle est recommandée essentiellement pour l'isolement des moisissures dans les prélèvements peu chargés en bactéries, les contrôles de stérilité des produits pharmaceutiques, cosmétiques ou alimentaires, la culture des moisissures en vue de réaliser leur identification (Fleury, 1988).

Parmi les 18 échantillons prélevés dans une période de 2 mois, 43 souches sont isolées à partir des milieux de cultures utilisés ayant été sélectionnés sur la base des caractères culturels. Ce taux de détection relativement fort pourrait être dû aux conditions de croissance et facteur de temps.

2.1. Aspect macroscopique des isolats

L'examen macroscopique des colonies sur les cinq milieux de culture après l'ensemencement et incubation ont montré la présence de plusieurs types de colonies ce qui nécessite une étape de caractérisation et d'identification des isolats. (Nos résultats sont similaires ou différents aux résultats).

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau N°3.

Tableau 3. Aspect de culture des bactéries trouvées sur les cinq milieux de cultures (gélose nutritive (GN), Baird Parker, Hektoene, MacConkey, Sabouraud).

Milieu de culture	Numéro de colonie	Les caractères macroscopiques des colonies	Le code de la colonie
Hektoen	Colonie 01	Petites colonies jaune saumon ; rondes à bord régulier, de relief bombé et d'aspect lisse.	HC1a
	Colonie 02	Grandes colonies jaune saumon rondes à bord irrégulier, bombées et d'un aspect lisse	HC1b

	Colonie 03	Colonies rondes vertes claires a bleuâtres sans centre noir, a bord régulier et d'un aspect lisse.	HC2a
	Colonie 04	Petites colonies rondes vertes à bord régulier et bombées avec un aspect lisse.	HC2b
Mac conkey	Colonie 01	Grandes colonies rouges entourées d'un halo opaque de la même couleur rondes à bord régulier et d'un aspect lisse.	MC1a
	Colonie 02	Petites colonies rouges rondes à bord régulier et d'un aspect lisse.	MC1b
	Colonie 03	Colonies moyennes incolore jaunâtres, rondes à bord régulier d'un aspect lisse.	MC2a
	Colonie 04	Des colonies moyennes incolores rondes à bord irrégulièresd'un aspect lisse	MC2b
	Colonie 05	Petites colonies incolore jaunâtres, rondes à bord régulier d'un aspect lisse	MC2c
Baird parker	Colonie 01	Colonies rondes noires, brillantes, entouré d'un halo transparent et d'un liseré opaque	BC1

	Colonie 02	Colonies brunes rondes, à bord régulier, de relief bombé et d'aspect lisse et brillant.	BC2
Sabouraud	Colonie 01	Colonies lisses blanches crémées rondes et bombées	SC1
	Colonie 02	Moisissures filamenteuses d'un aspect cotonneux blancs puis verts puis vert foncé à grise	SC2
	Colonie 03	Moisissure d'un aspect cotonneux blanc gris clair puis gris foncé à noir	SC3
Gélose nutritive	Colonie 01	Colonies blanchâtres, de taille grande muqueuse ronde à contour régulier	GC1
	Colonie 02	Colonies jaunâtre rondes à contour régulières	GC2

Tableau 04 Codification des colonies trouvées dans des services des différents types de surfaces.

Service	Nombre des prélèvements	Type de surface	Les colonies
Pédiatrie	04	Paillasse	HC1b ; MC2c
		Téléphone	HC1b ; HC2a ; SC1
		Sanitaire	HC1a ; MC1a ; MC2b
		Masque a réanima	HC1a ; MC1a ; MC1b
Néonatalogie	04	Masque a réanima	MC1b ; MC2b ; SC2
		Poignet	HC1a ; MC1a ; SC2
		Sol	MC2b ; MC1b ; SC2
		Lit	HC1a ; MC1a ; SC1

Médecine homme	interne	03	Lit	HC2b ; MC2a
			Poignet	SC1 ; MC2b
			Moniteur de surveillance	HC1b ; BC2
Médecine femme	interne	03	Seringue électrique	HC2a
			Mur	BC1 ; GC2
			Sol	HC2a ; SC3
Cardiologie		04	Masque a réanima	HC2a ; SC2
			Défibrillateur	HC1a ; MC1a
			Sol	SC3 ; GC1
			Poignet	GC1 ; GC2 ; BC1

Observation macroscopique des colonies obtenues :

Les différents aspects macroscopiques des colonies illustrés dans les figures 3, 4, 5, 6 et 7.

Concernant l'aspect macroscopique de différentes colonies regroupées dans le (Tab 03)

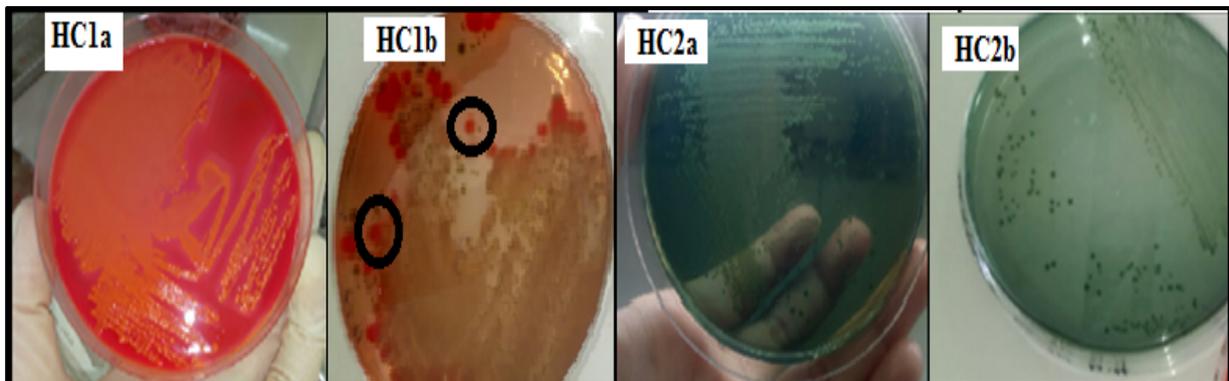


Figure N°3 Les aspects macroscopiques des colonies obtenues dans le milieu Hektoen.

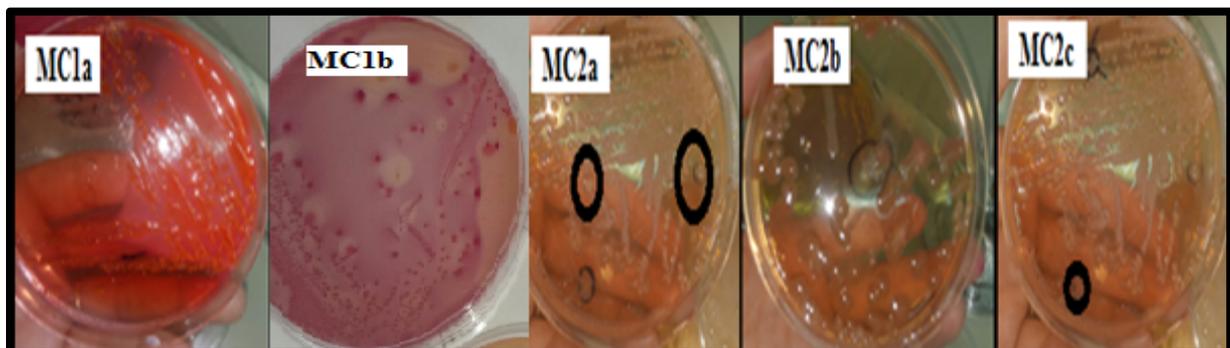


Figure N°4 Les aspects macroscopiques des colonies obtenues dans le milieu Mac Conkey

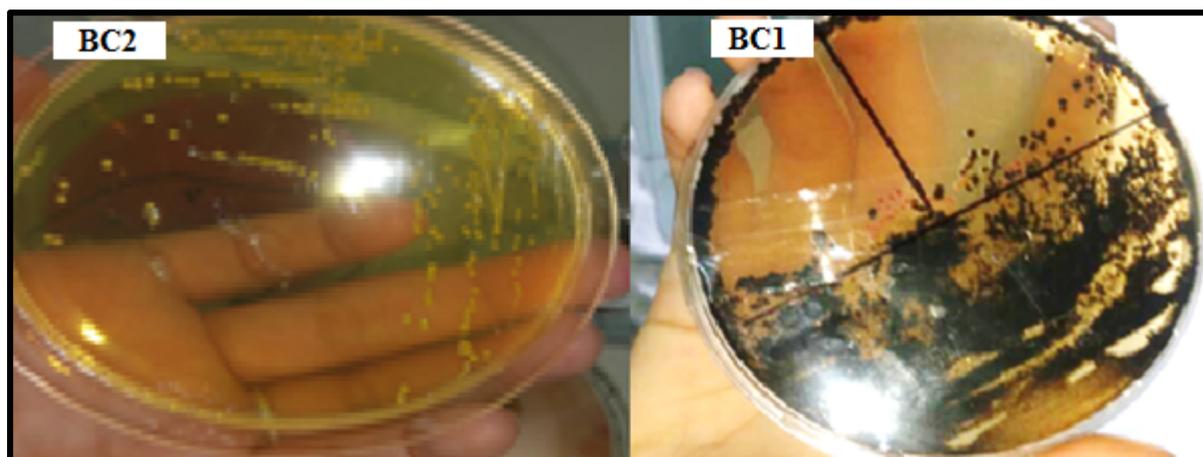


Figure N°5 Les aspects macroscopiques des colonies obtenues dans le milieu Baird Parker

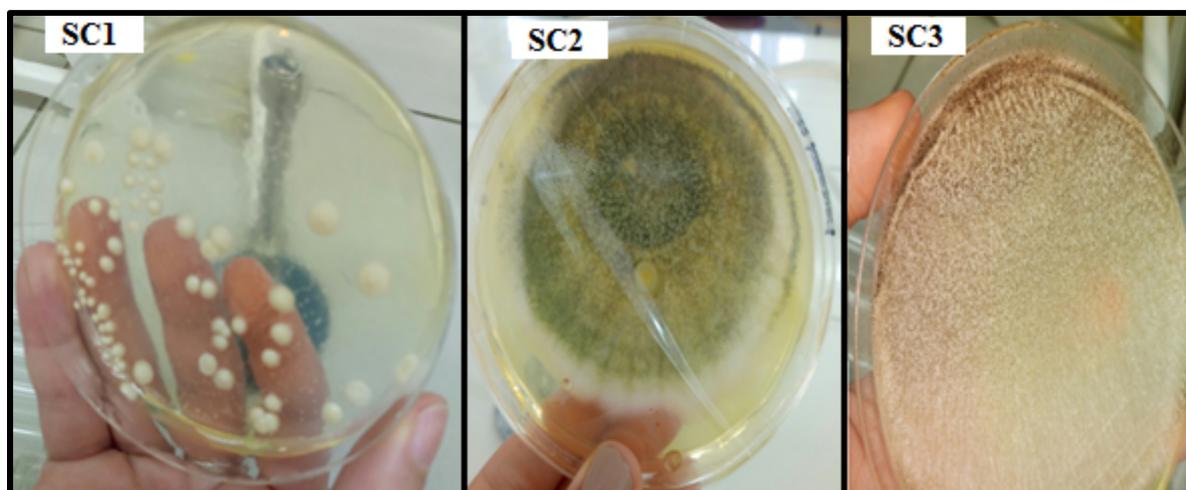


Figure N° 6 les aspects macroscopiques des colonies obtenues dans le milieu Sabouraud

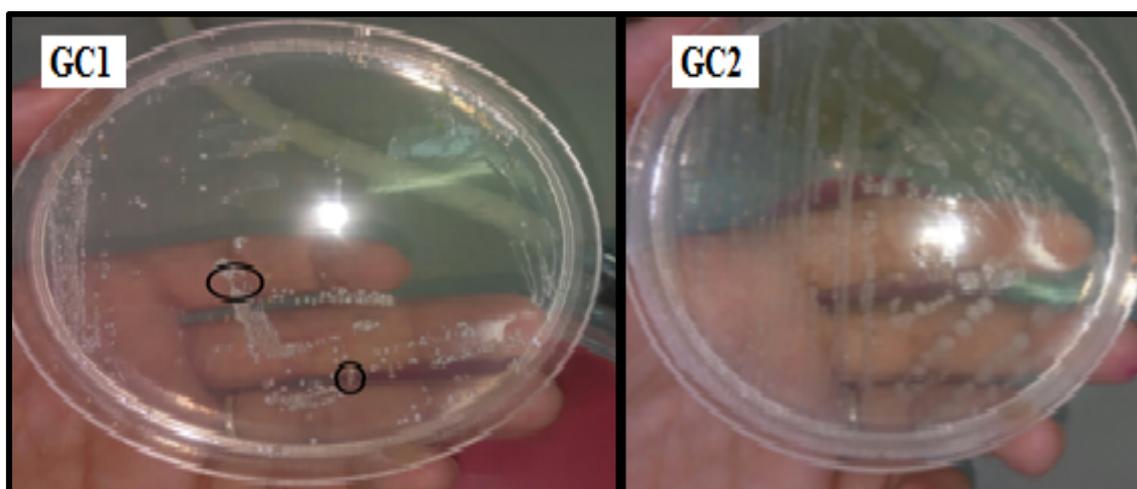


Figure N°7 Les aspects macroscopiques des colonies obtenues dans le milieu Gélose Nutritive

2.2. Aspect microscopique

Les résultats de l'examen microscopique des différents types de colonies ayant poussé sur les 5 différents milieux de cultures (GN ; Baird Parker ; Hektoene ; Mac Conkey et Sabouraud) sont :

La coloration de Gram des neuf souches parmi les souches isolées (MC1a ; HC1a ; MC1b ; HC1b ; HC2a ; HC2b ; MC2a ; MC2b ; MC2c) ont une forme bâtonnet (des bacilles) a un Gram négatif (-) (Fig 8). Et quatre souches isolées (GC1 ; GC2 ; BC1 ; BC2) ont une forme de cocci a Gram positif (Fig 9).

Les autres souches d'après leur observation macroscopique et microscopique sont : 2souches des moisissures (SC2 ; SC3) (Fig 11), et une souche de levure (SC1) (Fig 10).

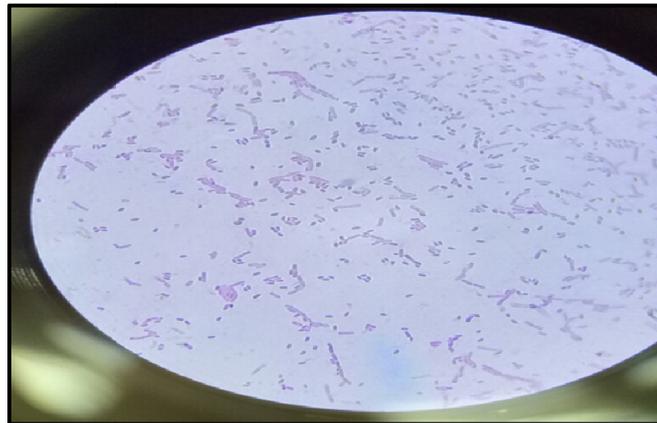


Figure N°8 Observation Microscopique des bacilles Gram négatif isolées à partir de service « néonatalogie d'un lit d'un patient ».

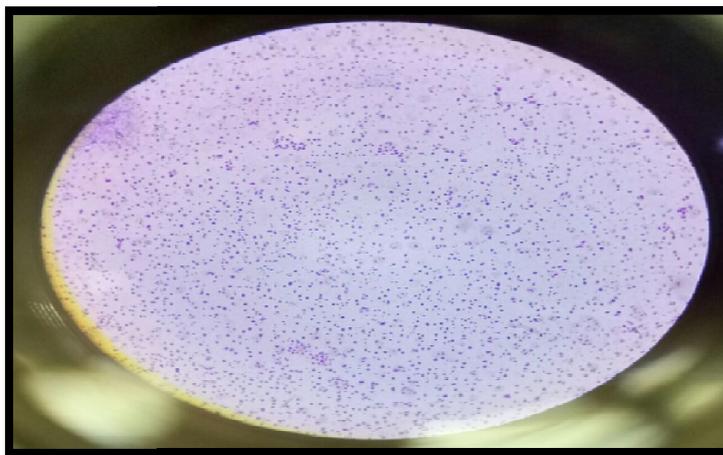


Figure N°9 Observation microscopique des cocci Gram positif isolées du service « cardiologie à partir d'un poignet d'une chambre de malade ».



Figure N°10 Observation microscopique d'un type des levures « SC1 » isolées du service « Pédiatrie à partir du téléphone fixe ».

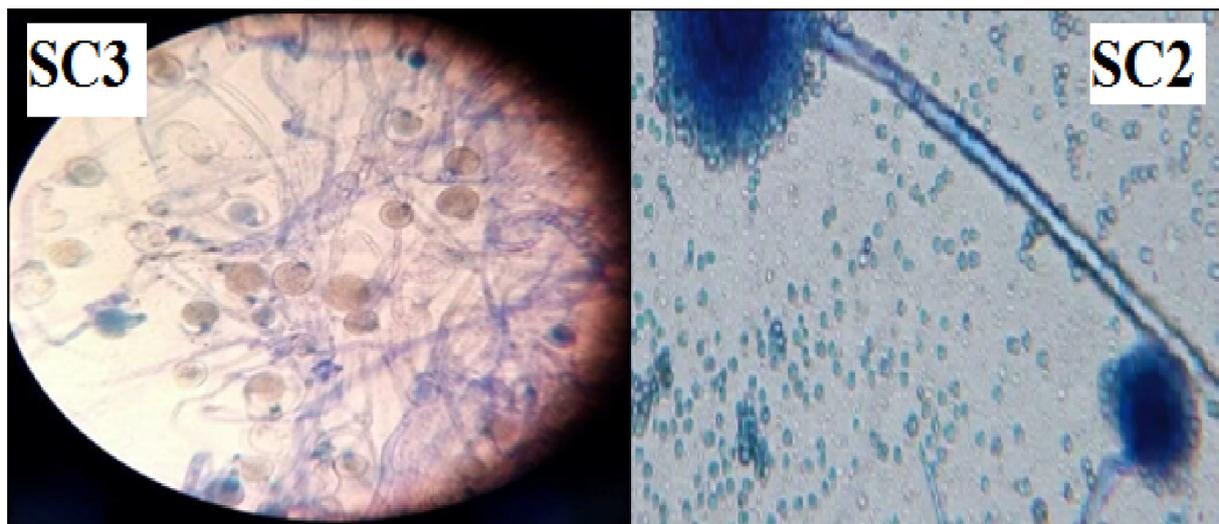


Figure N°11 Observation microscopique d'un type des moisissures isolées du service « cardiologie à partir d'un masque a réanima » coloration par bleu de méthylène.

Les résultats obtenus montrent la domination des bacilles à Gram négatif par rapport aux cocci à Gram positif dans l'environnement étudié.

2.3. Etude biochimique (galerie classique) : Un manque des galeries commerciales, on a opté de suivre le travail d'essai d'identification par l'utilisation de protocole classique, les différentes résultats sont mentionnées dans le (Tab 5).

Tableau 5. Résultats de la galerie classique

La souche	Forme	Gram	CAT	TSI		CIT	URE	IND	H ₂ S	MAN		Production De gaz
				La ponte (Lac)	Le culot (Glu)					+/-	Mobilité	
HC1a	Bacille	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
MC1a	Bacille	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
MC1b	Bacille	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
HC1b	Bacille	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
HC2a	Bacille	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+
HC2b	Bacille	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
MC2a	Bacille	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
MC2b	Bacille	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
MC2c	Bacille	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
BC1	Cocci	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
GC2	Cocci	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
BC2	Cocci	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
GC1	Cocci	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-

2.3.1. Test de catalase

Les isolats ont montré HC1a ; MC1a ; MC1b ; HC1b ; HC2a. HC2a ; MC2a ; MC2b ; MC2c ; BC1 ; GC2 ; BC2 une réaction positive avec le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), donc ils possèdent l'enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Fig 12), alors que les souches GC1 ne la possèdent pas.

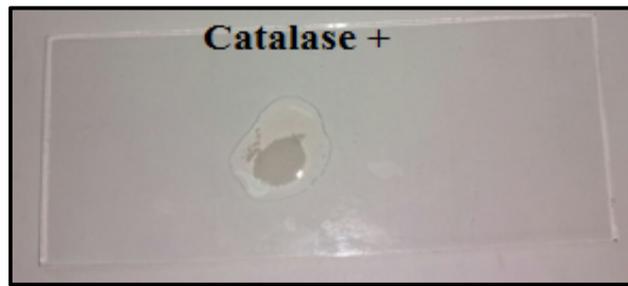


Figure N°12 Résultat de test de catalase

2.3.2. Milieu TSI

Après l'incubation, on a remarqué que pour les souches suivantes : HC1a ; MC1a ; HC1b ; MC1b, il y a eu croissance sur milieu Triple SugarIron agar (TSI) et une acidification dans la pente et le culot, d'où le virage du rouge de phénol au jaune, avec la présence des bulles d'air et l'absence de noircissement (Fig13), donc les six souches sont capables de fermenter le lactose et saccharose et le glucose, avec la production de gaz et sans production d' H_2S . Donc ces bactéries sont : lactose et Saccharose (+), glucose (+), gaz (+), H_2S (-).

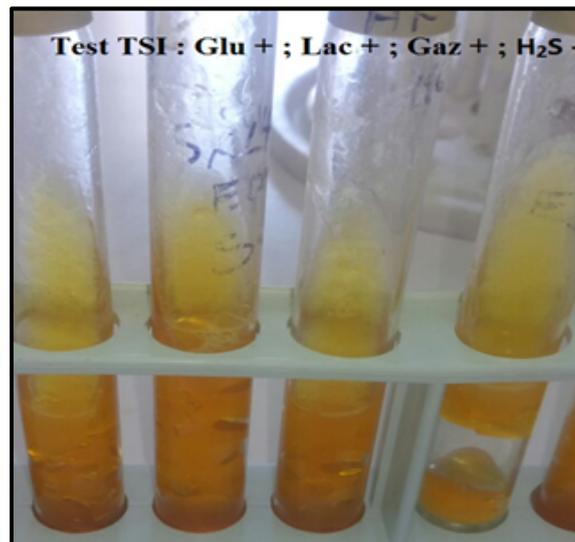


Figure N°13 Résultat de test de TSI pour les quatre souches HC1a ; MC1a ; HC1b ; MC1b.

Mais pour la souche HC2a il y a une croissance dans le milieu mais avec acidification dans le culot et sans acidification dans la pente, d'où le virage de couleur de milieu de rouge de phénol au jaune au niveau de culot mais reste rouge dans la pente, avec la présence des bulles d'air et l'absence de noircissement, donc la souche est capable de fermenter le Glucose avec la production de gaz et incapable de fermenter le lactose sans production de H_2S . Donc les bactéries sont Glu (+), Lac (-), gaz(+), H_2S (-)(Fig 14).

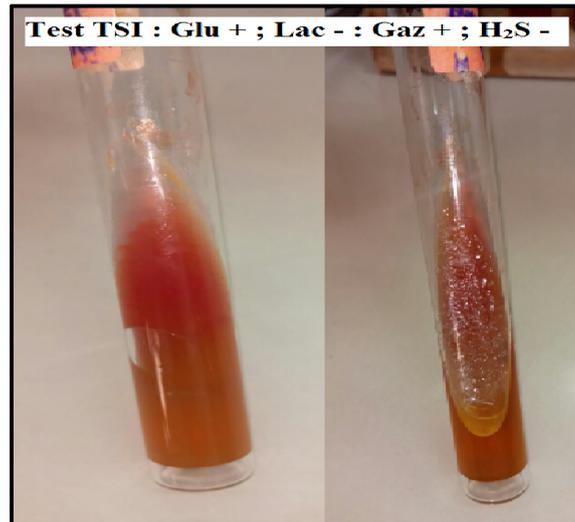


Figure N°14Résultat de test de TSI pour la souche HC2a

Pour les souches HC2b ; MC2b et BC2 il y a une croissance dans le milieu TSI avec acidification dans le culot et sans acidification dans la pente, elle est observée par le virage de couleur de milieu de rouge phénol au jaune au niveau de culot mais elle reste rouge au niveau de la pente sans la présence des bulles d'air et l'absence de noircissement (Fig 15) , donc les trois souches sont capables de fermenter le Glucose et incapable de fermenter le Lactose sans production de gaz et sans production d'H₂S. Donc les bactéries sont : Glu(+), Lac(-), gaz(-), H₂S(-).



Figure N°15Résultat de test de TSI pour la souche MC2b

Pour les souches BC1 ; GC2 ; GC1, il y a une croissance dans le milieu TSI avec acidification dans le culot et dans la pente est remarquée par le virage de couleur de milieu de rouge phénol au jaune au niveau de culot et au niveau de la pente, sans la présence des bulles d'air et l'absence de noircissement (Fig 16). Donc ces souches sont capable de fermenter le Lactose et de Glucose sans la production de gaz et d' H_2S , Donc les trois souches sont Glu (+), Lac(+), Gaz(-), H_2S (-).



Figure N°16Résultat de test de TSI pour la souche GC1.

Pour la souche MC2c il y a une croissance dans le milieu TSI avec acidification dans le culot et sans acidification dans la pente, elle est remarquée par le virage de couleur de milieu de rouge phénol au jaune au niveau de culot mais elle reste rouge au niveau de la pente, avec la présence des bulles d'air et de noircissement (Fig 17), donc la souche est capable de fermenter le Glucose et incapable de fermenter le Lactose avec la production de Gaz et de l' H_2S .alors la souche MC2c est : Glu+, Lac-, Gaz+, H_2S + .

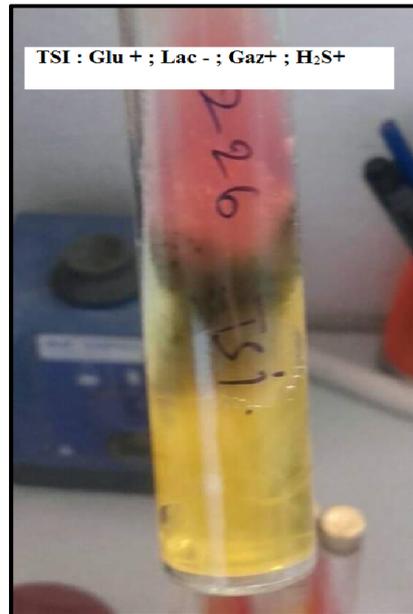


Figure N°17Résultat de testTSI pour la souche MC2c

Alors pour la souche MC2b il n y a une croissance dans milieu, mais pas d'acidification dans la pente et le culot, avec la présence des bulles d'air et l'absence de noircissement (Fig 18), donc la souche est incapable de fermenter le lactose et saccharose et le glucose, et elle ne produise pas l'H₂S et capable de produire le gaz. Donc cette bactérie est : lactose et Saccharose (-), glucose (-), H₂S (-), gaz (+).

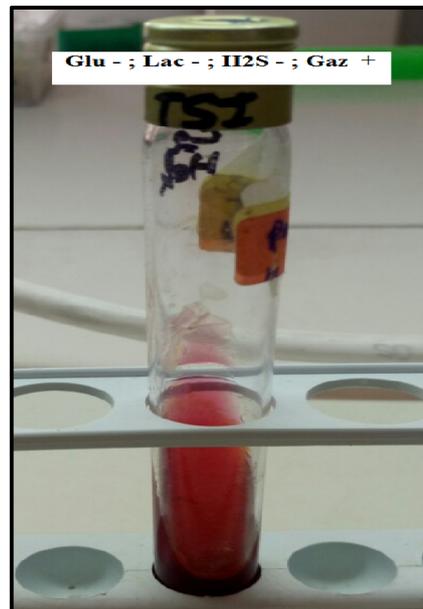


Figure N°18Résultat de test de TSI pour la souche MC2b.

2.3.3. Test du mannitol mobilité

Les résultats obtenus montrent que pour les dix souches HC1a ; MC1a ; MC1b ; HC1b ; HC2a ; HC2b ; MC2a ; MC2b ; BC1 ; GC2, il y a une acidification du milieu, d'où le virage du rouge de phénol au jaune, donc les dix souches utilisent le mannitol. Par contre les trois souches MC2c ; BC2 ; GC1, sont mannitol négatif.

En ce qui concerne la mobilité, les bactéries mobiles sont diffusées à partir de la ligne verticale d'ensemencement en créant un trouble, ce qui a été observé pour les sept souches suivantes : HC1a ; MC1a ; MC1b ; HC2b ; MC2a ; MC2b ; MC2c. Alors que les six souches HC1b ; HC2a ; BC1 ; GC2 ; BC2 ; GC1 : ont uniquement poussé le long de la strie d'ensemencement donc elles sont immobiles.

Alors les souches HC1a ; MC1a ; MC1b ; HC2b ; MC2a ; MC2b utilisent le mannitol (mannitol +) et mobiles (Fig 19).



Figure N°19 Résultat de test de mannitol pour la souche HC1a

Les souches HC2a ; HC1a ; BC1 ; GC2 sont des souches utilisent le mannitol (mannitol+) mais immobiles (Fig 20).



Figure N°20 Résultat de test de mannitol pour la souche HC2a

Pour la souche MC2c, elle n'utilise pas le mannitol (mannitol -) mais elle est mobile (Fig 21).

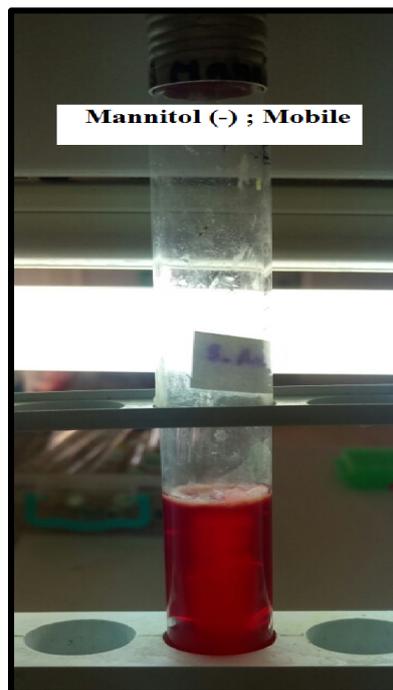


Figure N°21 Résultat de test de mannitol pour la souche MC2c.

Et pour les souches BC2 et GC1 sont mannitol (-) et immobiles (Fig 22).



Figure N°22 Résultat de test de mannitol pour la souche BC2

2.3.4. Recherche de l'utilisation du citrate

Les bactéries sont capables d'utiliser le citrate comme seule source de carbone (Fig 23) s'il est utilisé aussi il y a une croissance et le milieu s'alcalinise, cela se traduit par le virage de couleur du vert en bleu. Ceci a été constaté que pour les six souches suivantes : MC1b ; HC1b ; HC2a ; MC2b ; MC2c ; BC1 ; GC2, mais pas pour les souches : HC1a ; MC1a ; HC2b ; MC2a ; BC2 ; GC1, donc elles sont dépourvus de citrate perméase, et par conséquent elles sont incapables d'utiliser le citrate comme seule source de carbone.

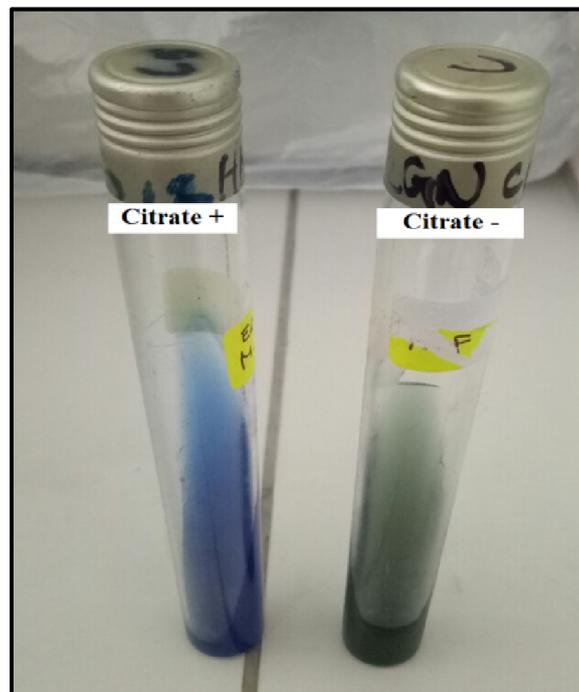


Figure N° 23 Résultat de test de citrate

2.3.5. Test d'urée-indole

Les résultats qu'on a obtenu montrent que pour les cinq souches HC1b ; MC2c ; BC1 ; GC2 ; BC2, il y a une alcalinisation de milieu, accompagnée par le virage de couleur du jaune en rouge, dû à la dégradation de l'urée donc les bactéries possèdent l'uréase et elles sont : uréase +.

Contrairement pour les huit autres souches HC1a ; MC1a ; MC1b ; HC2a ; HC2b ; MC2a ; MC2b ; GC1 (Fig 24), où la couleur de milieu reste jaune à jaune orangée signifiant l'absence de l'alcalinisation de milieu, parce que les bactéries ne possèdent pas l'uréase pour dégrader l'urée, donc ces bactéries sont (uréase -).

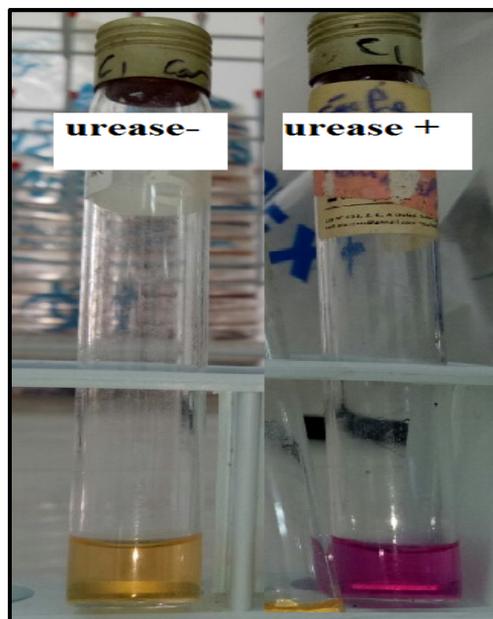


Figure N°24 Résultat du test d'Uréase

Recherche de la production d'indole

Après l'addition de 3 gouttes du réactif de Kovacs et la lecture sans agiter le milieu, on constate qu'il y a une apparition d'un anneau rouge pour les souches HC1a ; MC1a ; HC2a, (Fig 25) ; ça signifie que les bactéries sont capables de produire l'indole et hydrolyser le tryptophane, donc ces bactéries sont (Indole +).

Alors pour les autres souches HC1b ; MC1b ; HC2b ; MC2a ; MC2b ; MC2c ; BC1 ; BC2 ; GC1 ; GC2, l'anneau reste orangé ça signifie l'absence d'indole et les bactéries incapables de produire l'indole, donc elles sont (Indole -).



Figure N°25Résultat de test d'Indole

Remarque : après la réalisation des tests biochimique pour toute les souches on observe qu'il y a certaines souches ayant les mêmes caractères biochimique qui sont : [(HC1a) identique à la souche (MC1a) et (HC2b =MC2a), (BC1=GC2)].

3. Identification des souches

En englobant les résultats des différents tests, on peut conclure l'identification des isolats regroupée dans le tableau 6.

Tableau6.Identification des souches

Souche	Espèce
HC1a=MC1a	<i>Ecoli</i>
MC1b	<i>Enterobactercloacae</i>
HC1b	<i>Klebsiellapneumoniae</i>
HC2a	<i>Shigellaflexneri</i>
HC2b = MC2a	<i>Salmonellaparatyphi A</i>

MC2b	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
MC2c	<i>Proteus mirabilis</i>
BC1=GC2	<i>Staphylococcus aureus</i>
BC2	<i>Micrococcuspp</i>
GC1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>

Parmi les espèces trouvées à partir des milieux de prélèvement : 5 espèces appartiennent à la famille des Entérobactéries qui sont (*E.coli*, *Enterobactercloacae*, *Klebsiellapneumoniae*, *Shigellaflexneri*, *Salmonellaparatyphi A.*)

Les Entérobactéries constituent une famille hétérogène de bactéries à Gram négatif, qui est fréquemment impliquée dans les infections humaines. Elle se compose d'environ 30 genres de bactéries et de plus de 100 espèces (Avril et al. 2000).

Ce sont des bactéries mobiles par ciliature péritriche ou immobiles. Une de leurs caractéristiques est de réduire les nitrates en nitrites, et d'acidifier le glucose par voie fermentative avec souvent la production de gaz (Avril et al. 2000).

Tableau 7.Aspect des levures et moisissures isolées

	<i>Candida</i>	<i>Aspergillusfumigatus</i>	<i>Mucor</i>
Délai de la culture	18-24 heures à 37°C	24 à 48 h à 37°C	24 à 48 h à 37°C
Aspect macroscopique	Colonies leviformes blanches et crémeuses	Aspect poudreux blanc, puis bleu-vert, puis vert foncé à gris	Cotonneux : blancs gris claires puis foncés
Aspect microscopique	Levures bourgeonnantes, ovalaires (3 x 6 µm), non capsulées, à bourgeonnement multipolaire	La tête aspergillaireUnisériée, en colonne compacte, assez grande. Phialides directement portées par la	Les hyphes non septès ; les spongiophores : naissants sur les hyphes, non ramifieurs, sans

	Filaments :pseudomycélium, eumycélium avec blastospores	vésicule, dressée. Conidies : Globuleuses, vertes, échaulées, petites. Conidiophore : Court, lisse et incolore, évasement progressif au sommet.	aprophyse, les sporocystes et les spores : des grandes tailles, globuleux. Les spores (sporangiospores) ovales, lisses et rugueuses
--	--	--	--

En ce qui concerne les germes isolés au niveau de milieu sabouraud, et d'après l'analyse des résultats et les observations macroscopique et microscopique (Tab 7), on peut conclure que ce germe est *Candidasp.* (SC1) l'espèce de levure la plus connue du genre *Candida*. Un autre genre de « champignons imparfaits » est détecté l'*Aspergillusfumigatus*(SC2), les *Mucor*(SC3).

Les Infection fongique signée par une fréquence croissante enregistrée ces dernières années, l'émergence des champignons microscopiques comme agents pathogènes majeurs est notable.

Les infections fongiques les plus récurrentes sont l'Aspergillose dont l'origine est exogène et les candidoses dont les sources peuvent être digestives où provenant de solutions contaminées: collyres, liquide d'alimentation (Anna et al, 1994).

4. Répartition des microorganismes au niveau des services

Service de Pédiatrie

E. coli occupe la première place par sa présence dans les deux surfaces (sanitaire et masque a réanima) avec la présence d'un *Enterobacteriecloacae* au niveau masque a réanimasuiivi par *Klebsiellapneumoniae* au niveau de la pailleasse et téléphone, avec la présence de *Proteus mirabilis* et *Shigella flexneri* au niveau de pailleasse, téléphone respectivement. Ainsi la présence des *Candida* au niveau de téléphone, et *Pseudomonas aeruginosa* obtenu au niveau du sanitaire.

Service de néonatalogie

Les bactéries isolées sont des *Escherichia coli* au niveau de poignet et le lit d'un patient, avec la présence des *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter cloacae* au niveau de masque a réanima et le sol, a l'addition des *Aspergillus* au niveau de masque a réanima, poignet et sol et une souche de *Candidasp* au niveau de lit d'un patient.

Service Médecine Interne Homme

D'après les 3 prélèvements pris, une souche de *Salmonella paratyphi A* est isolée au niveau de lit de patient, et à partir de poignet les germes isolés sont *Candidasp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus spp* qui ont été isolés au niveau du moniteur de surveillance.

Service Médecine Interne Femme

Shigella flexneri est la bactérie isolée à partir de la seringue électrique, autre bactérie de genre *Staphylococcus aureus* a été trouvée au niveau de mur. Par ailleurs au niveau de sol on obtient le *Mucor* et *Shigella flexneri*.

Service Cardiologie

Shigella flexneri, *Aspergillus fumigatus*, ces deux souche ont été trouvés au niveau de masque a réanima, et au niveau de défibrillateur, les germes isolés sont des *Escherichia coli*, et au niveau de poignet on a des *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*

Et au niveau de sol les souches isolées sont *Mucor* et *Streptococcus pneumoniae*, (Tab 8).

Tableau 8. Répartition de 13 germes responsables d'infection nosocomiale

Germes	Effectif	Fréquence
<i>Escherichia coli</i>	10	23%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	7%
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	5%
<i>Shigella flexneri</i>	4	9%

<i>Salmonella paratyphi A</i>	2	5%
<i>Pseudomonas aeruginosa.</i>	4	9%
<i>Proteus mirabilis</i>	1	2%
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	9%
<i>Micrococcusspp</i>	1	2%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2	5%
<i>Candidasp</i>	3	7%
<i>Aspergillus fumigatus</i>	5	12%
<i>Mucor</i>	2	5%

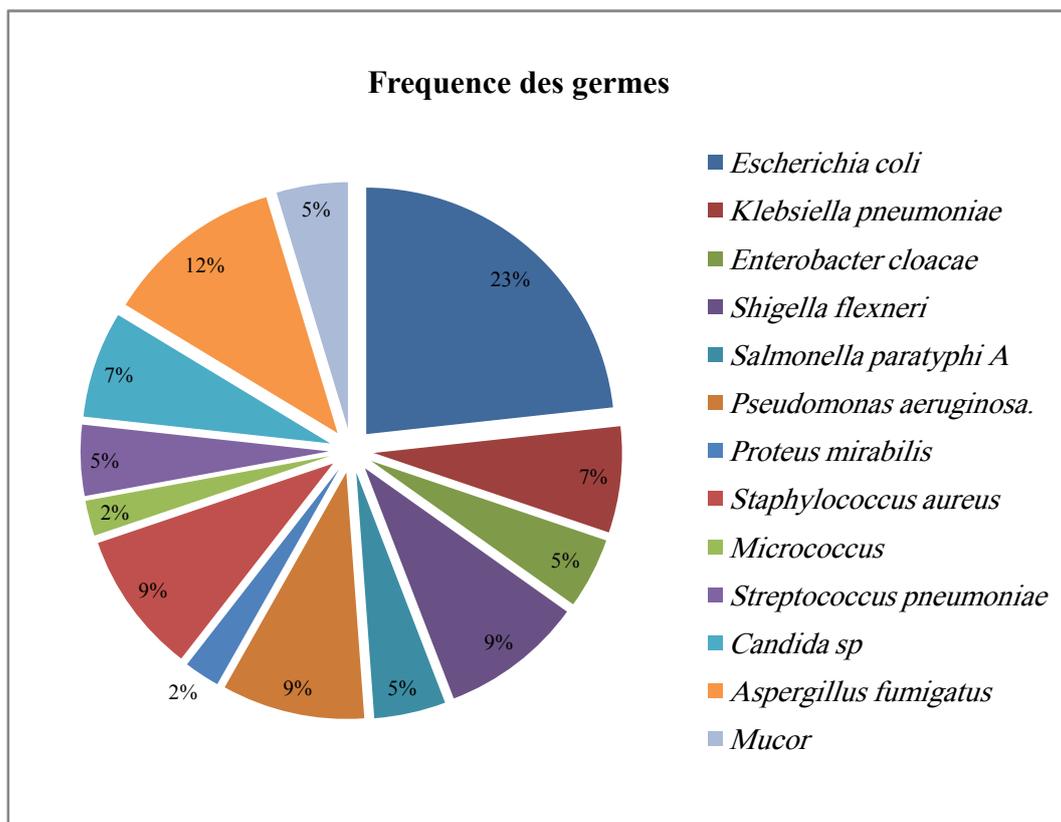


Figure26 fréquence des germes

Interprétation des résultats de la fréquence des germes obtenus

Parmi les 43 souches isolées, après l'identification biochimique, on obtient 13 souches différentes isolées à partir des services de l'hôpital de Hakim Sâadane –Biskra, repartis comme suite (Fig 26).

E. coli occupe la première place avec (23%), au deuxième place c'est *Aspergillus fumigatus* (12%), à la troisième place *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* avec une fréquence de (9 %), ensuite on a les levures de genre *Candida* et les *Klebsiella pneumoniae* avec un pourcentage de (7%), après les *Streptococcus pneumoniae*, les *Salmonella paratyphi A*, les *Enterobacteriaceae* et les champignons de genre *Mucor* présentes avec un pourcentage de (5%), puis les souches *Proteus mirabilis* et les *Micrococcus* ayant un pourcentage de (2%)

- *Escherichia coli* est l'espèce type du genre *Escherichia*, C'est l'espèce dominante de la flore aérobie du tube digestif. *E. coli* ou colibacille est habituellement une bactérie commensale. Elle peut devenir pathogène si les défenses de l'hôte se trouvent affaiblies ou si elle acquiert des facteurs de virulence particulière (Nauciel et Vildé, 2005).
- Au sein des entérobactéries, les bactéries du genre *Klebsiella* se distinguent par leur immobilité constante, leur groupement en diplobacilles généralement encapsulés, Connue autrefois sous le nom de pneumobacille de Friedlander. *Klebsiella pneumoniae* est une bactérie commensale de l'intestin, des voies respiratoires et des animaux (Baerwolf et al., 2002). elle existe à l'état commensal sur la peau et les muqueuses, notamment respiratoires (Sekhri Arafa, 2011). Chez l'homme, elle est l'agent des pneumopathies aiguës, d'angines, d'otites, de cystites et d'affections rénales. *Klebsiella* provoque des infections urinaires (5 % des infections en ville) et des surinfections des bronches chez les bronchitiques chroniques, voire des abcès du poumon (Achmour, 2012).
- Les *Shigelles flexneri*, les bactéries du genre *Shigella*, sont des *Enterobacteriaceae* pathogènes strictes, rencontrées exclusivement chez l'être humain, Les *Shigella* sont des bactéries très proches d'*Escherichia coli*. Les *Shigella* ne font partie d'aucune flore commensale chez l'être humain, elles sont toutes pathogènes et spécifiques du tube digestif ; éliminées par les selles et dispersées dans les sols et les eaux où elles ne survivent que peu de temps (Nauciel et Vildé, 2005).

- Les *salmonelles* forment un genre de protéobactéries appartenant à la famille des entérobactéries. Elles provoquent chez l'espèce humaine des maladies telles que la fièvre typhoïde, la fièvre paratyphoïde et la salmonellose (Nauciel et Vildé, 2005).
- *Enterobacter cloacae* commensale du tube digestif de l'homme et des animaux, pouvant être rencontré dans le sol et les eaux d'égouts. Certaines souches peuvent être responsables d'infections nosocomiales (Lachassinne et al, 2004).
- *Proteus mirabilis* est une bactérie de type bacille à Gram négatif appartenant aux entérobactéries et au genre *Proteus* (Hamdouche et al., 2016).

Elle est commensale du tube digestif des animaux et peut être responsable d'infections essentiellement urinaires et cutanées. Cette bactérie est à l'origine de 90 % de toutes les infections par *Proteus* chez l'être humain. Elle est très présente dans l'eau et les sols (Hamdouche et al., 2016).

P. mirabilis est connu pour provoquer des lithiases rénales. Cette bactérie est uréase positive et produit donc une uréase capable de transformer l'urée en ammoniaque, alcalinisant l'urine. Le pH alcalin va favoriser la précipitation du calcium retrouvé dans l'urine, formant alors des cristaux qui peuvent entraver le bon fonctionnement de l'arbre urinaire (Hamdouche et al., 2016).

- Parmi les bacilles à gram négatif non fermentaires nous avons trouvé les *Pseudomonas aeruginosa* : Le genre *Pseudomonas* est le genre type de la famille *Pseudomonadaceae*. Dans ce genre, *Pseudomonas aeruginosa* représente 80 % des souches isolées ; les autres espèces sont isolées à plus faible fréquence (Flandrois, 1997).
- Il est important de distinguer *S. aureus* des SCN. *S. aureus* a un potentiel de pathogénicité très important et est responsable aussi bien d'infections communautaires que nosocomiales. Par opposition, les SCN sont en règle générale des bactéries opportunistes essentiellement responsables d'infections nosocomiales (Nauciel et Vildé, 2005).
- *Streptococcus pneumoniae*, se colonise au niveau de rhino-pharynx. Sous l'influence de certains facteurs, il pourra devenir pathogène et être responsable d'infections respiratoires : pneumonies (pneumonie franche lobaire aiguë), bronchites, pleurésies, et d'infections ORL : otites, sinusites, mastoïdites (pouvant se compliquer en méningites). La

contamination est interhumaine et se fait par voie respiratoire à partir de porteurs sains ou de personnes malades (Flandrois, 2000).

- *Micrococcus* est un genre de bactéries à coloration Gram positive appartenant à la famille des *Micrococcaceae*, Ce sont des bactéries aérobies, à métabolisme oxydatif, possédant une catalase, *Micrococcus* est généralement considéré comme un organisme saprophyte ou commensal. Il peut cependant être un pathogène opportuniste, notamment chez les patients immunodéprimés (comme les patients infectés par le VIH). Chez ces derniers, les microcoques peuvent être impliqués dans diverses infections, notamment des bactériémies récurrentes, des chocs septiques, de l'arthrite septique, des endocardites ou encore des méningites. Dans de rares cas, la mort d'un patient immunodéprimé peut être due à une infection pulmonaire à *Micrococcus*(Smith et al.,1999).

Si les staphylocoques ou les *klebsielles* que nous avons cités peuvent affecter n'importe quel service hospitalier, certains germes se cantonnent très spécifiquement à certains malades. C'est le cas d'un champignon filamenteux nommé *Aspergillus fumigatus*, première cause d'infection nosocomiale chez les patients atteints de leucémies. Ceux-ci, pour bénéficier d'une allogreffe de moelle osseuse, passent par un état d'immunosuppression profonde et risquent alors d'être infectés par voie aérienne par ce champignon qui se développe dans les poumons puis dans d'autres organes (Institut Pasteur,2011).

Autres champignons responsables d'infections nosocomiales, très répandus, et souvent liés à des procédures invasives (cathéter, sonde urinaire) : les levures *Candida*. Elles sont au 10e rang des maladies liées aux soins, mais la 4e cause de septicémies à l'hôpital, des septicémies fatales dans 40 % des cas, à 30 jours (Institut Pasteur.2011).

D'autres genres ou espèces sont retrouvés moins fréquemment, parmi eux, *Mucor*, *Rhizopus* (Institut Pasteur .2011)

Répartition d' *E coli* selon les services

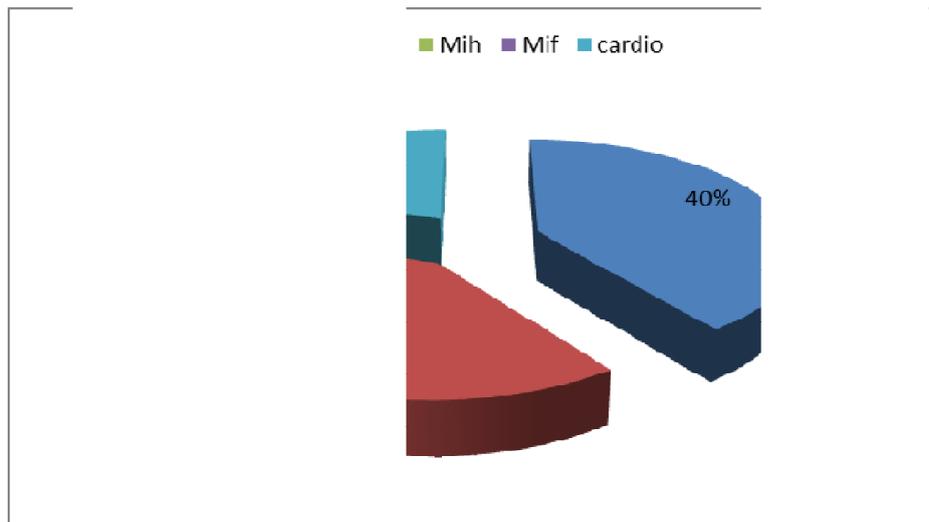


Figure 27 Répartition d' *E coli* selon les services.

La fréquence des infections nosocomiales varie selon les pays, les hôpitaux et les services, et demeure influencée par différents facteurs de risque. La présente étude porte sur l'ensemble des bactéries isolées des prélèvements de surface au niveau de L'hôpital Hakim SâadaneBiskra.

La distribution d'*E coli*, isolée aux différents services révèle (Fig27) qu'elle domine dans les services pédiatrie et néonatalogieavec (40%), la deuxième place avec (20%) dans le service cardiologie, et l'absence totale dans les autres services.

Les infections à *E.coli* sont particulièrement fréquentes chez les malades hospitalisés dans les services : médecine interne (14%), chirurgie générale (11,7%) et la pédiatrie (11,4%). Ces résultats diffèrent de ceux rapportés par (Aissi et al.,2008) qui indiquent des taux plus importants dans ces services. Dans notre étude *E. coli* domine nettement le profil général des bactéries responsables d'infections nosocomiales.

Conclusion

Conclusion

Dans notre étude, nous avons évalué la contamination du milieu hospitalier en réalisant 18 prélèvements au niveau des différents sites dans cinq services distincts (pédiatrie, néonatalogie, médecine interne homme, médecine interne femme et cardiologie) à l'hôpital Hakim Sâadane- Biskra.

A la lumière des résultats obtenus, on peut conclure que les bacilles à Gram négatifs occupent la première place avec une prédominance des entérobactéries majoritairement *E. coli* (23%) L'infection à *E. coli* peut être d'origine endogène après modification de la flore par une antibiothérapie, ou d'origine exogène à partir d'un autre patient ou d'un foyer de l'environnement.

Escherichia coli a été la bactérie la plus fréquemment isolée dans notre étude, elle a été la plus souvent isolé seul ou en association avec d'autres bactéries responsables d'infections nosocomiales. Elle était suivie par *Klebsiellapneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

L'hygiène hospitalière a tout son rôle à jouer dans cette dynamique par la création des comités de lutte contre les infections nosocomiales et la surveillance du bon usage d'antiseptiques appropriés.

C'est cette multi résistance des germes hospitaliers qui doit être à l'heure actuelle le grand défi à relever dans notre milieu hospitalier.

Recommandations

En médecine, le risque zéro n'existe pas. Pour cette raison, il n'est pas toujours possible d'éviter les infections nosocomiales. Il est par contre tout à fait possible d'en limiter la fréquence et la gravité en respectant scrupuleusement quelques règles d'hygiène.

Au terme de cette étude, nous faisons les recommandations suivantes

Respecter strictement les règles d'hygiène Ces règles s'appliquent à trois niveaux :

- l'hygiène des mains du personnel soignant
 - l'asepsie lors des soins
 - la sécurité de l'environnement
- Réduire au strict nécessaire les indications des cathéters

- Établir des programmes de prévention et de surveillance des infections nosocomiales.
- Mettre en place d'un comité de lutte contre les infections nosocomiales à l'Hôpital du Hakim Sâadan".
- Établir des programmes de prévention et de surveillance des infections nosocomiales.
- Équiper le laboratoire de l'Hôpital Hakim Sâadan de matériels nécessaires pour l'identification des germes responsables d'infections nosocomiales tout en évitant les ruptures de stock des réactifs pour le bonheur des malades et du personnel.

Enfin, de point de vue perspective, notre étude montre que l'environnement hospitalier dans la région de Biskra est fréquemment contaminé par les bacilles à Gram négatifs que Cocci à Gram positifs, il serait intéressant de déterminer :

- ❖ La confirmation des résultats obtenus par la galerie API.
- ❖ L'identification des différents types de cocci à Gram+ présents dans l'environnement hospitalier.

Références

Bibliographiques

A

Achkour Z.(2012).Emergence de la résistance aux carbapénemes chez les bacilles à Gram négatif. Thèse de Doctorat en pharmacie. Université Mohammed V- Soussi, Rabat, p.

Infectieuses -006-N-IO,1996,p8.

Ahmed Zine El Abidine Haddadi.2013.Construction d'un score prédictif du risque nosocomialpour des patients de réanimation. p.34-37p.

Amara ImeneKhaldi Zohra. (2015) .Isolement, identification et étude de l'antibiorésistance des souches bactériennes isolées à partir de services de réanimation et d'hémodialyse de CHU Ouargla-Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de master académique-le : 11/06/2015.

Avril J.L., Dabernat H., Denis F., Monteil H. 1992. Bactériologie clinique. Ellipses, Paris, p.511.

Anna Rita C. 2006. Rôle des résidus d'antibiotiques dans les environnements hydriques sur la sélection et la diffusion de bactéries résistantes des genres *Aeromonas*, *Acinetobacter* et *legionella*. Thèse de Doctorat, Université de Genève, 46-47p.

Astragneau P. (1998). Epidémiologie des infections nosocomiales. RevPrat ; 48 : 1525-9.

Avril J.L., P Donnio. (1989). La surveillance des infections nosocomiales. Revue du praticien, 39, (16), 1381, 5.

B

Barnett, H. L. et Hunter, B. B., (1972). Illustred general of imperfect fungi.Burgess PublishingCompany. Minnesota (USA): 3ème edition.

Beaucaire, G. (1997). Infections nosocomiales: Épidémiologie, critères du diagnostic, prévention, principes de traitement. La revue du praticien, 47(2), 201-209

Berche P., Gaillard J.L., Simonet M. 1991. Les IN d'origine bactérienne et leur prévention. Bactériologie des infections humaines de la biologie à la clinique, Paris : Flammarion, p. 64-71,660.

Berche, P., Gallard, J. L., & Simonnet, M. (1988). Les infections nosocomiales d'origine bactérienne et leur prévention. *Bactériologie: les bactéries des infections humaines*. Paris: Flammarion, p 64-74.

Baerwolf S, Geffers C, Behnke M. 2002. Correlation between transmissions and the nosocomial infection rate in five different intensive care units in a German university hospital. SHEA216.

C

Carbonelle B., Denis F., Marmonier A., Pinon G., Vargues. 1990. *Bactériologie médicale*. 3^{ème} tirage, éd SIMERP, Paris, p.113.

Carlet. J, Guibert. J. (1989). Infections urinaires nosocomiales : épidémiologie, dépistage, prévention et conduite à tenir. *Revue du praticien*, 39 (14) : 1386-91.

Coella R et al. The cost of infection in surgical patients: a case study. *J Hosp Infect* 1993; 25:239– 50.

D

Debabza M. 2014. Emergence en milieu hospitalier des bacilles Gram négatifs multirésistants aux antibiotiques : étude bactériologique et moléculaire. Thèse de Doctorat d'état, Université Badji Mokhtar-Annaba, 58-66 p.

Delarras C. 2007. *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire*. Technique et documentation. France. Lavoisier : EM inter, Paris, p .101, 462,276.

Denis F., Martin C., Bingen E., Roland QU., Poly C., Marie. 2007. *Bactériologie médicale : techniques usuelles*. Elsevier Masson, Issy-les Moulineaux, p .9-10,22-26.

Dubos R. (2012). Résistance aux antibiotiques : une impasse thérapeutique ? Implications nationales et internationales .Séance thématique inter-académique; Académie Nationale de Médecine, Académie Nationale de Pharmacie, Académie Vétérinaire de France. Compte rendu mercredi 21 novembre 2012.

DUCEL, G., FABRY, J., NICOLLE, L., 2008. Prévention des infections nosocomiales: Guide pratique. In : *Prévention des infections nosocomiales: guide pratique*.

F

FAGON JY.1998 . Pneumopathies nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*. Med Mal Inf., 1998 ;28 :159-66.

Flandrois JP. 1997. Bactériologie Médicale. Presses universitaires de Lyon, p.309.

G

Guiraud J-P. 2003.Microbiologie alimentaire. Dunod, p .651.

H

Hamza R. (2010). Epidémiologie des infections associées aux soins. Revue Tunisienne d'Infectiologie - Janvier 2010, Vol.4: 1 – 4.

HAMDOUCHE Chaima TABAI Amira . 2016. Proteus mirabilis au niveau CHU Constantine caractérisation biochimique, microbiologique et la mutagénèse.p07.

J

Jarvis WR1, Edwards JR, Culver DH, Hughes JM, Horan T, Emori TG, Banerjee S, Tolson J, Henderson T, Gaynes RP, et al.(1991). Nosocomial infection rates in adult and pediatric intensive care units in the United States. Am. J. Med, 1991, 91 (supp 3. B) 1955- 1915.

L

La Lettre trimestrielle d'informationsde L'INSTITUT PASTEUR, N°72 – Février 2011 p.06.

Lachassinne, E., Letamendia-Richard, E., &Gaudelus, J. (2004). Épidémiologie des infections nosocomiales en néonatalogie. *Archives de pédiatrie*, 11(3), 229-233.

Larpent J-P et Larpent-Gourgau M. 1997. Mémento technique de microbiologie : micro-organismes eucaryotes et procaryotes. Structure. Métabolisme. Systématique. Applications industrielles. Milieux de culture et réactifs. Technique et documentation Lavoisier, p .1039.

Leulmi Z. 2015. Les Proteus incriminés dans les infections communautaires et hospitalières : étude moléculaire de la résistance aux antibiotiques. Thèse de Doctorat, Université des Frères Mentouri, Constantine. p 58.

M

MALLARET MR et OLIVE F. Surveillance épidémiologique des infections de cathéter à chambre implantable. 1996 ; 26 : 752-6.

Fleury, J. (1988, July). Le laboratoire de bactériologie médicale Equipment, techniques de base sécurité. Marchal, N., Bourdon, JL & Bimet, F. (Biologie appliquée). Editions Doin, Paris, 1988. In *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie* (Vol. 139, No. 4, p. 497). Elsevier Masson.

Mchich Anas. (2002). Les infections nosocomiales à propos de 55 cas colligés au Maroc université Cheikh Anta Diop de Dakar - Thèse Doctorat en pharmacie (diplôme d'état) - Sous la direction de Issa Lô, Professeur le 05 juillet 2002 - N° 40

N

Nauciel C et Vildé J-L. 2005. Bactériologie médicale. 2ème édition. Elsevier Masson, Paris, p. 122, 132, 140.

P

P. D., "Candida colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients." ANN. SURG., vol. 8, pp. 751-758, 1994.

B. D. TASSEAU F, "Infections nosocomiales. In : BRUKER Get FASSIN D," *Ellipses eds. Santé publique*, vol. 4, pp. 78-79, 1989.

R

Ruhnke, M. (2006). Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida albicans* yeasts. *Current Drug Targets*, 7(4), 495-504.

S

Said, S. F. (2005). Les infections nosocomiales dans le service de chirurgie B de l'hôpital du point G. Université du Mali: Thèse de Doctorat.

Sekhri Arafâ N. (2011). (Fréquence et marqueurs épidémiologiques de *klebsiella pneumoniae* dans les services à haut risque infectieux au niveau du CHU Benbadis de Constantine. Thèse

deDoctorat en sciences. Université Mentouri de Constantine, Algérie, p.5-70.

Smith K, Neafie R, Yeager J, Skelton H, « *Micrococcus folliculitis* in HIV-1 disease », *Br J Dermatol*, vol. 141, n° 3,61–558 .p ,1999 .

T

TASSEAU F, BARON D. Infections nosocomiales. In: BRÜCKER G ET FASSIN D, eds. Santé publique. Paris : Ellipses, 1989 ; 478-92.

TOURE LAYES. Les infections du site opératoire dans les services de chirurgie générale et pédiatrique du CHU GABRIEL TOURE. Thèse de médecine, Bamako, 2004 ; N°57

Z

Zeroual Zouhair. (2012). profil épidémiologique et bactériologique des infections nosocomiales (à propos d'une Enquête de prévalence des infections nosocomiales du CHU Ibn Sina de Rabat Janvier-2010)- université mohammed V faculté de médecine et de pharmacie –rabat année: 2012- Thèse du Doctorat en pharmacie.

ملخص

الهدف من عملنا هو عزل وتحديد مجموعة من السلالات البكتيرية من العينات المأخوذة على مستوى الخدمات المختلفة (قسم طب الأطفال ، قسم طب حديثي الولادة ، قسم أمراض القلب ، قسم الطب الباطني نساء ، والطب الباطني رجال) في مستشفى حكيم سعدان - بسكرة لتحديد الجراثيم المسؤولة عن الإصابة بالعدوى . من خلال هذه الدراسة ، تم تحديد 43 سلالة بالاعتماد على التحليلات المجهرية و اختبار الخصائص الكيميائية ، يوضح هذا البحث هيمنة بكتيريا الامعاء ، والتي تمثل بشكل رئيسي من خلال الأنواع التالية: *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella paratyphi A*.

من بين الجراثيم التي المتسببة في عدوى المستشفيات تم العثور عليها الفطريات و الخمائر.

الكلمات المفتاحية : بكتيريا الامعاء .عدوى المستشفيات

Résumés

L'objectif de notre travail est d'isoler et d'identifier une collection de souches bactériennes à partir de prélèvements fait au niveau des différents services (pédiatrie, néonatalogie, cardiologie, médecine interne femme et médecine interne homme) à l'hôpital Hakim Sâadane de Biskra afin de déterminer les germes responsables de l'infection nosocomiale. Au terme de cette étude, 43 souches ont été identifiées à partir des analyses microscopiques et la galerie classique, Cette identification montre la dominance des entérobactéries, représentant principalement par les types suivants : *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella paratyphi A*, parmi les germes incriminés dans les infections nosocomiales en plus des bactéries on retrouve aussi les champignons et des levures.

Mot clé : infection nosocomiale, entérobactéries.

Abstract

The main objective of our work is to isolate and identify a collection of bacterial strains from samples taken at the level of the different services (pediatrics, neonatology, cardiology, internal medicine woman and internal medicine man) at the hospital Hakim Sâadane of Biskra to determine the germs responsible for the nosocomial infection. At the end of this study, 43 strains were identified from microscopic analyzes and the classical gallery, This identification shows the dominance of enterobacteria, mainly representing by the following types: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella paratyphi A*, among the germs incriminated in nosocomial infections in addition to bacteria are also found mushrooms and yeasts.

Keyword: nosocomial infection, enterobacteria.

Remerciement

Nous remercions le bon dieu de nous avoir donné la force, la patience, la santé, la volonté et le courage pour accomplir ces études.

Nous tenons à remercier notre encadreur Mme Djamila MOKRANI pour nous avoir donné l'opportunité de travailler sur ce mémoire, pour son grand soutien scientifique et moral, pour les conseils, l'encouragement, l'aide et le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer.

Permettez-nous de vous exprimer toute notre gratitude et notre profond respect.

Nos sincères remerciements aux membres de jury Dr. BENAMEUR.N et Mme MOHAMMDI .K qui ont accepté de juger notre travail.

Nous remercions tous nos amis, tous nos enseignants tout au long de nos études et tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Nous adressons nos remerciements à toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire. Responsable des services à l'hôpital Hakim Saâdan, qui a bien voulu autoriser ce travail.

Nos respectueux remerciements aux personnels du laboratoire de Département de Sciences de la Nature et de la Vie de l'université de Biskra pour leur disponibilité et leur sympathie.

Dédicace

Ma chère maman Saida :

Qui m'a donnée la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargnée aucun effort pour me rendre heureuse quoi que je fasse, je ne pourrais te rendre ce que tu as fait pour moi. Soyez fière de moi aujourd'hui et voyez à travers ce travail mon amour sincère.

Mon cher Papa MouhamedOuali :

L'homme le plus exceptionnel au monde, mon héros, le meilleur papa qu'on puisse avoir, qui a été au près de moi durant toute ma vie et mes années d'études, et qui à toujours veillé à se que rien ne m'y soit refuser.

A mon cher frère Ahmed Walid ; A tous les moments d'enfance passés avec toi mon frère, en gage de ma profonde estime pour l'aide que tu m'as apporté. Tu m'as soutenu, réconforté et encouragé. Sincèrement un grand merci pour toi

*Mes belles adorables sœurs : **Nouha** et **Malak** ; je ne pourrais exprimer à travers ses lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers vous.*

Puisse l'amour et fraternité nous unissent à jamais. Je vous souhaite la réussite dans votre vie, avec tout le bonheur qu'il faut pour vous combler. Merci pour votre précieuse aide à la réalisation de ce travail

*A ma belle **Meryouma** ; ça ne me suffit pas de dire simplement ma sœur , vous êtes bien plus qu'une sœur , avec votre tendresse , votre amour et votre soutien, vous m'avez soutenu pendant mes moments de faiblesse, de peur et de stress .je ne trouve pas les mots pour décrire mon amour et ma reconnaissance pour vous , je vous souhaite tout le bonheur du monde , que dieu vous bénisse .*

*A ma chère meilleure **Hinda** au monde, tu étais toujours l'amie la sœur pour moi durant toutes ces années, peut être on va plus se voir souvent comme avant mais je resterai toujours à tes côtés, merci de m'avoir soutenir et d'être les épaules sur lesquelles j'appuyais tout le temps durant toute ces années. Que dieu te blesse et te donne tout le bonheur du monde.*

*A notre encadreur **Mme .MOKRANI Djamilia** merci énormément pour votre aide et votre prise en charge, on ne pourra jamais rendre tout ce que vous avez fait pour nous encadrer et pour finir ce travail.*

A tous ceux qui m'ont aidé de loin ou de près afin de réaliser ce travail.

Djoudi Maroua

Dédicace

*À MES CHERS PARENTS **Zahia&Jabrane***

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

*A mon très cher frère **Badrane**, et à mes très chères sœurs **Razane&Mayoucha***

Aucun mot ne saurait décrire à quel point je vous suis reconnaissante pour tout ce que vous avez fait pour moi, vous m'avez soutenue et comblée tout au long de mon parcours. L'affection et l'amour fraternel que je vous porte sont sans limite. Pussions-nous rester unis dans la tendresse et fidèle à l'éducation que nous avons reçue.

*A ma binôme « **Maroua** » ma meilleure amie de mon parcours je vous te remerciée pour tous nos jours ensemble, nos souvenir, nos efforts pour présenter ce travail, tu été toujours la personne de mes coté avec tes encouragement.*

KHELLIL Hinda

Liste des figures**Liste des abréviations****Introduction générale..... 1****Partie bibliographique****Chapitre 01 : Infections Nosocomiales****1. Définition des infections nosocomiales 5****2. Origines des germes 5**

2.1. Flore saprophyte du malade lui-même 5

2.2. Personnel soignant médical et paramédical 5

2.3. L'environnement 5

3. Mode de transmission 5

3.1. Voie endogène 5

3.1.1. Auto-infection 5

3.2. Voie exogène 6

3.2.1. Hétéro-infection 6

3.2.2. Xéno-infection 6

3.2.3. Exo-infection 6

4. facteurs à risques..... 7

4.1. Facteurs liés à l'hôte 7

4.1.1. Âge 7

4.1.2. Sexe 7

4.1.3. Etat immunitaire 7

4.2. Facteurs liés à l'environnement 7

4.3. Services à risque 7

5. Diverses infections nosocomiales et fréquences..... 8

5.1. Infections urinaires 8

5.2. Infections post-opératoires 8

5.3. Infections respiratoires 8

5.4. Infections sur cathéter 8

5.5. Les autres localisations infectieuses 8

Chapitre 02 : Germes responsables des infections nosocomiales

1. Les bactéries	10
2. Les autres agents	11
2.1. Les viroses	11
2.2. Parasites et champignons	11

Partie expérimentale**Chapitre 03 : Matériel et méthode**

1. Matériel	14
2. Méthodes	14
2.1. Réalisation des prélèvements.....	14
2.2. Isolement	15
2.3. Purification	16
2.4. Conservation des souches	16
2.5. Test préliminaire.....	16
2.5.1. Examen microscopique après coloration différentielle	16
2.5.2. Etude biochimique (galerie classique)	17
2.5.2.1. Test de catalase	17
2.5.2.2. Milieu mannitol mobilité	18
2.5.2.3. Utilisation du citrate comme unique source de carbone.....	18
2.5.2.4. Gélose T.S.I (Triple Sugar Iron agar).....	19
2.5.2.5. Milieu Urée – Indole.....	19
3. Identification des champignons	20

Chapitre 04 : Résultats et discussion

1. Analyse des prélèvements	23
2. Caractérisation des isolats	24
2.1. Aspect macroscopique des isolats	26
2.2. Aspect microscopique.....	31
2.3. Etude biochimique (galerie classique).....	32
2.3.1. Test de catalase.....	33
2.3.2. Milieu TSI	34

2.3.3. Test du mannitol mobilité	38
2.3.4. Recherche de l'utilisation du citrate.....	40
2.3.5. Test d'urée-indole	41
3. Identification des souches.....	42
4. Répartition des microorganismes au niveau des services	44
Conclusion.....	55
RéférenceBibliographie	57

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
	La répartition des 18 prélèvements provenant de	
01	l'hôpital (Hakim Sâadane-Biskra) et les sites de prélèvement de différents Types de surface.....	15
02	Analyse microbiologique des prélèvements isolés d'hôpital Hakim Sâadane.....	23
03	Aspect de culture des bactéries trouvées sur les cinq milieux de cultures (gélose nutritive (GN), Baird Parker, Hektoene, Mac Conkey, Sabouraud).....	26
04	Codification des colonies trouvées dans des services des différents types de surface.....	28
05	Identification des souches	42
06	Aspect des levures et moisissures isolées.....	43
07	Répartition de 13 germes responsables d'infection nosocomiale.....	45

Liste des figures

N°TitrePage

01 Transmission de l'infection hospitalière **06**

02 Ensemencement des prélèvements sur les cinq milieux de cultures..... **24**

03 Aspects macroscopiques des colonies obtenues dans le milieu Hektoene.....**29**

04 Aspects macroscopiques des colonies obtenues dans le milieu Mac Conkey.....**29**

05 Aspects macroscopiques des colonies obtenues dans le milieu Baird Parker.....**30**

06 Aspects macroscopiques des colonies obtenues dans le milieu Sabouraud.....**30**

07 Aspects macroscopiques des colonies obtenues dans le milieu Gélose nutritive.....**30**

08 Observation Microscopique des bacilles Gram négatif isolées à partir de
service « néonatalogie d'un lit d'un patient ».....**31**

09 Observation microscopique des cocci Gram positif isolées du service
« Cardiologie partir d'un poignet d'une chambre de malade».....**31**

Observation microscopique d'un type des levures isolées du service	
10 « Pédiatrie à partir du téléphone fixe ».....	32
<hr/>	
11 Observation microscopique d'un type des moisissures isolées du service	
« Cardiologie à partir d'un masque a réanima » coloration par bleu de méthylène.....	32
<hr/>	
12 Résultat de test de catalase	34
<hr/>	
13 Résultat de test de TSI pour les quatre souches HC1a ; MC1a ; HC1b ; MC1b.....	34
<hr/>	
14 Résultat de test de TSI pour la souche HC2a.....	35
<hr/>	
15 Résultat de test de TSI pour la souche MC2b.....	35
<hr/>	
16 Résultat de test de TSI pour la souche GC1.....	36
<hr/>	
17 Résultat de test de TSI pour la souche MC2c.....	37
<hr/>	
18 Résultat de test de TSI pour la souche MC2b.....	37
<hr/>	
19 Résultat de test de mannitol pour la souche HC1a.....	38

20	Résultat de test de mannitol pour la souche HC2a.....	39
21	Résultat de test de mannitol pour la souche MC2c.....	39
22	Résultat de test de mannitol pour la souche BC2.....	40
23	Résultat de test de citrate.....	40
24	Résultat de test d'Urease	41
25	Résultat de Test d'Indole.....	42
26	Fréquence des germes	46
27	Répartition d' <i>E coli</i> selon les services.....	50

Liste des abréviations

IAS	Infection Associées aux Soins
OMS	Organisation Mondiale de Santé
MSPRH	Ministère de la Santé de la Population et de Réforme Hospitalière
MRIN	Microorganismes Responsables des Infection Nosocomiales
CIT	Citrate de soduim
GLU	Glucose
GN	Gélose nutritive
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
H₂S	Sulfure d'hydrogène
IN	Infection nosocomiale
IND	Indole
K.E.S	<i>Klebsiella- Enterobacter– Serratia</i>
MAN	D-mannitol
O₂	Oxygène
SNV	Sciences de la Nature et de la Vie
T.S.I	Triple SugarIron agar
TDA	Tryptophane Désaminase

URE	Uréase
IAS	Infections Associées Aux Soins

Introduction générale

Les infections nosocomiales (IN) ou infections associées aux soins (IAS) sont devenues aujourd'hui un sujet d'actualité, d'où elles constituent un sérieux problème de santé publique, générateur de coûts humains (morbidité et mortalité) et socioéconomiques importants. Le surcoût financier engendré par ces infections est un des éléments majeurs de sensibilisation des décideurs à la mise en œuvre d'une politique de prévention.

Selon l'Organisation Mondiale de la santé (OMS), en 2005 plus de 1,4 millions de personnes dans le monde souffrent de complications infectieuses induites par les soins. Dans certains pays en développement, la proportion des malades hospitalisés atteints dépasse 25%, tandis que dans les établissements modernes des pays dits développés, seule 5 à 10% des patients admis dans les services de soins aigus contractent une infection liée aux soins (World Health Organization. 2005).

Des épidémiologistes ont depuis longtemps alerté de la prévalence très élevée des infections nosocomiales en Algérie, tout en assurant que le « risque zéro » n'existe pas et ne peut être atteint même dans les pays les plus développés.

Selon le ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière (MSPRH), le taux de prévalence en 2012 varie entre 12 et 15 %, un taux qui est loin de refléter la réalité du terrain, mais qui est déjà très élevé par rapport à ceux observés dans les pays développés. (Kernane *et al.*, 2013).

Signalons qu'en Algérie et dans la plupart des pays Maghrébins, il n'existe aucun système de mesure qui permet d'objectiver l'importance du risque dans les hôpitaux ; les infections nosocomiales restent ainsi un problème méconnu et non perçu comme une priorité.

Malgré la disponibilité de différents matériels de stérilisations et d'hygiènes dans les établissements de santé, ces infections persistent de plus en plus et ceci à cause de certains facteurs de risque – que nous verrons davantage plus loin - qui a contribué à une augmentation de l'incidence de ces infections. Pour cela, la moindre diminution des taux des infections nosocomiales représente un vrai défi pour chacun de ces établissements (Kernane *et al.*, 2013).

L'environnement hospitalier joue un rôle dans la transmission des germes responsables des infections nosocomiales, cet environnement comprend habituellement l'eau, l'air, et les surfaces.

L'objectif de cette étude est :

- la mise en évidence et l'isolement des germes aux niveaux des divers services d'un environnement hospitalier à partir de différentes surfaces.
- L'identification des souches par examen microscopique et l'utilisation de la galerie biochimiques classique.

Le présent travail s'articule sur deux parties :

Partie bibliographique :

Est consacrée à un aperçu général sur les infections nosocomiales et les microorganismes responsables ces infections.

Partie pratique :

- Comporte la méthodologie de pratique effectuée dans l'hôpital Hakim Saadane Biskra englobant les parties suivantes :
 - Echantillonnages dans 5 environnements hospitaliers.
 - Isolements des germes et purification.
 - Coloration de Gram et examen microscopique.
 - Identifications en utilisant la Galerie Classique.
 - Dernier axe vise à discuter les différents résultats obtenus.

Enfin, une conclusion générale qui achève ce travail.

Partie
bibliographique

Chapitre 01
Infections
Nosocomiales

1. Définition des infections nosocomiales

Une infection nosocomiale est une infection acquise par les malades au cours de l'hospitalisation qui n'était ni en incubation, ni présente à l'admission du malade, et dont les manifestations cliniques apparaissent habituellement après la 48^{ème} heure d'hospitalisation, lorsque la situation précise du malade n'est pas connue, un délai d'au moins 48 heures après l'admission (ou un délai supérieur à la période d'incubation lorsque celle-ci est connue) est communément accepté pour séparer une infection d'acquisition communautaire d'une infection nosocomiale (Beaucaire, 1997).

2. Origines des germes

2.1. Flore saprophyte du malade lui-même

Elle subit des modifications qualitatives au cours de l'hospitalisation. Ces modifications sont dues à l'environnement hospitalier et à certains traitements (antibiotiques, immunosuppresseurs) (Berche et *al.*, 1991).

2.2. Personnel soignant médical et paramédical

La contamination peut se faire par le biais du personnel soignant qui transmet au patient ses germes ou lui transmet les germes d'un autre patient avec ses instruments ou ses mains souillées (Berche et *al.*, 1991).

2.3. L'environnement

Il est moins déterminant que les deux précédentes origines dans le cadre de programmes de prophylaxie. Il peut être contaminé par le personnel ou par le patient. Il comprend les divers appareillages d'assistance respiratoire et de monitoring par voie intra vasculaire, les lavabos, les instruments, les tubulures, la nourriture, l'air ambiant (Berche et *al.*, 1991).

3. Mode de transmission

Les modes de transmissions sont variés (Fig1).

3.1. Voie endogène

3.1.1. Auto-infection

Le malade s'infecte avec ses propres germes à la faveur d'un acte invasif (porte d'entrée) et /ou en raison d'une fragilité particulière (Garner et *al.*, 1988).

3.2.Voie exogène

3.2.1. Hétéro-infection

Les mains ou les instruments de travail du personnel médical ou paramédical. C'est à ce mode de contamination que s'appliquent les mesures prophylactiques traditionnelles (Hygiène des mains, procédures de désinfection et de stérilisation, sécurité de l'environnement) (Garner et al., 1988).

3.2.2. Xéno-infection

Les agents infectieux sont importés à l'hôpital par les malades, le personnel soignant, ou les visiteurs (Berche, et al., 1988).

3.2.3. Exo-infection

Cette infection est liée à des avaries techniques (stérilisation inefficace, filtre à air non stérile, eau polluée). Ils sont susceptibles d'être contaminés et peuvent ainsi provoquer des infections nosocomiales souvent épidémiques (Berche, et al., 1988).

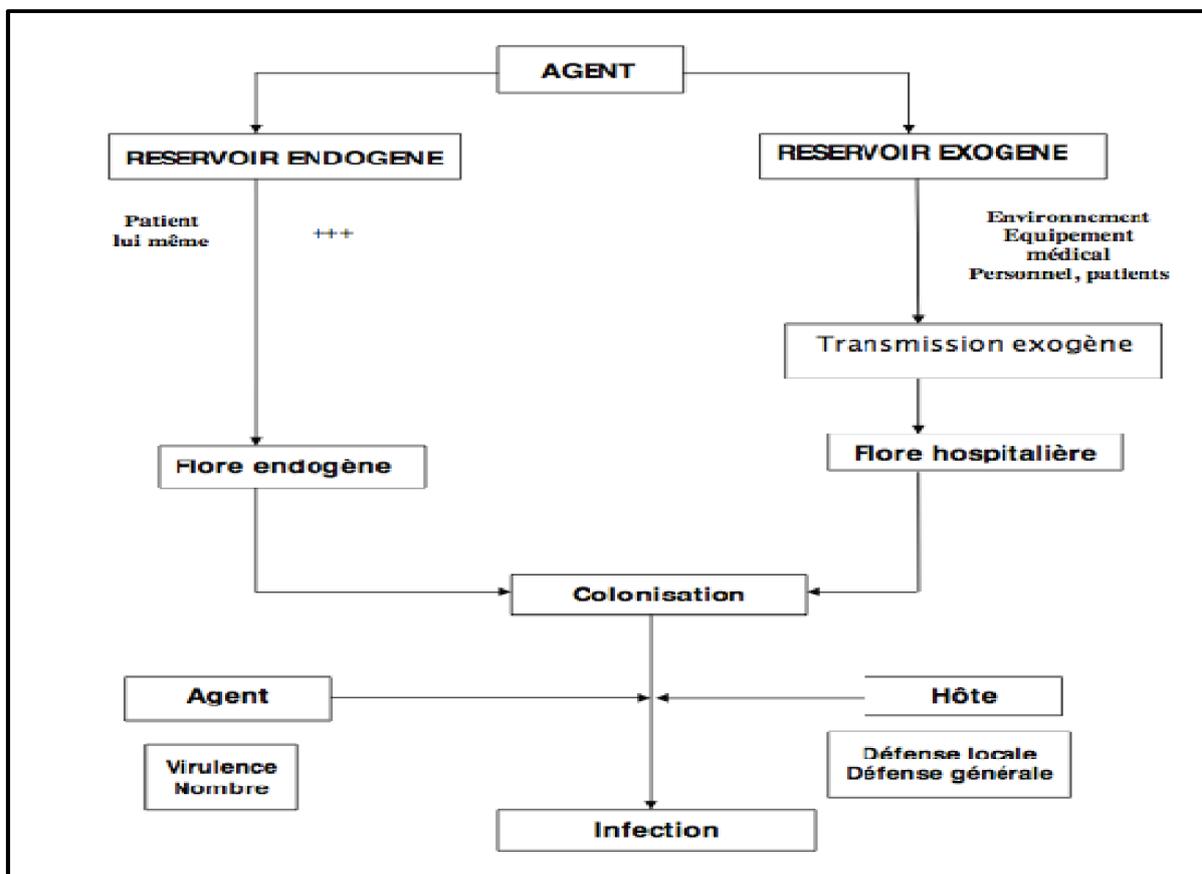


Figure N°1 Mode de transmission de l'infection hospitalière (Lasseau et al., 1989).

4. facteurs à risques

De nombreux facteurs favorisent l'infection chez les patients

4.1.Facteurs liés à l'hôte

4.1.1. Âge

Les taux des infections nosocomiales sont plus élevés chez les personnes âgées (Jarvis et *al.*, 1991).

4.1.2. Sexe

Concernant les infections nosocomiales urinaires, le risque est deux fois plus élevé chez la femme, alors que le risque de bactériémie est plus élevé chez l'homme (Mchich, 2002).

4.1.3. Etat immunitaire

L'incidence des infections nosocomiales croit énormément avec l'immunodépression, c'est le cas des vieillards, des diabétiques, des obèses, des dénutris, des patients ayant une insuffisance rénale ou hépatique, des brûlés, des éthyliques et des cancéreux (Avril et *al.*, 1989).

4.2.Facteurs liés à l'environnement

L'environnement comprend les divers appareillages d'assistance respiratoire (l'humidificateur, respirateur...), les lavabos, les instruments à visée diagnostique ou de soins (stéthoscopes ; tensiomètre...), les liquides perfusés et les tubulures, la nourriture et l'air ambiant (Zeroual, 2012).

4.3.Services à risque

L'incidence des infections nosocomiales est différentes selon les secteurs d'hospitalisation, ainsi les unités de réanimation ou les services de soins aux personnes âgées ont une incidence plus élevée (Carlet et *al.*, 1989); au niveau des unités de soins intensifs polyvalents ; elle est estimée à environ 20%. Dans les unités de réanimation néonatale, elle varie entre 5,2 et 24,6% (Mchich, 2002). De même, selon les différentes spécialités une disparité est observée : pour la réanimation 30%, la médecine 7%, la chirurgie 7%, la pédiatrie 3,8%, la psychiatrie 2,7% (Mchich, 2002).

5. Diverses infections nosocomiales et fréquences

On peut distinguer les infections nosocomiales d'origine bactérienne en fonction de leur localisation primitive.

5.1. Infections urinaires

Les infections urinaires sont associées à une plus faible morbidité que les autres infections nosocomiales, mais peuvent dans certains cas provoquer une bactériémie potentiellement mortelle.

Les bactéries responsables proviennent de la flore intestinale du patient, normale (*Escherichia coli*) ou acquise à l'hôpital (*Klebsiellamultirésistantes*) (Ahmed, 2013).

5.2. Infections post-opératoires

Les infections bactériennes provoquées par l'acte opératoire représentent près de 23% des infections nosocomiales et l'on admet qu'environ 7% de plaies postopératoires s'infectent dans Les jours qui suivent l'intervention. Le germe le plus souvent rencontré est le staphylocoquedoré. (Toure, 2004)

5.3. Infections respiratoires

Les infections respiratoires sont surtout observées dans les unités de réanimation ou de soin intensif représentant près de 15% des infections. (Ahmed, 2013).

5.4. Infections sur cathéter

La technique de la pose et la localisation du cathéter jouent un rôle important sur la fréquence des infections. Les germes en cause sont très souvent des bactéries de la flore cutanée tels que *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* (50 à 70%) et les bacilles à Gram négatif (Mallaret et Olive, 1996).

5.5. Les autres localisations infectieuses

Il existe de nombreux autres sites potentiels d'infection, par exemple

Infections de la peau et des tissus mous : les plaies ouvertes (ulcères, brûlures, escarres) favorisent la colonisation bactérienne et peuvent conduire à une infection généralisée.

La gastro-entérite est l'infection nosocomiale la plus fréquente chez l'enfant, avec un rota virus comme principal agent pathogène.

Autres infections de la sphère ORL, infections de l'œil et de la conjonctive (Ahmed, 2013).

Chapitre 02

Germes responsables des infections nosocomiales

Germes responsables des infections nosocomiales

En ce qui concerne les infections nosocomiales la plupart des agents pathogènes en cause appartiennent à la flore hospitalière(Ahmed,2013).

1. Les bactéries

Ce sont les plus courants des agents pathogènes responsables d'infections associées aux soins On peut distinguer :

- Les bactéries commensales : présentes dans la flore normale des sujets en bonne santé.

Elles jouent un rôle protecteur significatif en empêchant la colonisation par des microorganismes pathogènes.

Certaines bactéries commensales peuvent provoquer une infection si les défenses immunitaires de l'hôte sont affaiblies (Coella et al, 1993).

Les staphylocoques cutanés à coagulase-négative provoquent des infections sur cathéter vasculaire et les *Escherichia coli* présentes dans l'intestin sont la cause la plus courante d'infections urinaires (Coella et al, 1993).

- Les bactéries pathogènes : ont une virulence plus élevée et provoquent des infections (Sporadiques ou épidémiques) quel que soit l'état immunitaire de l'hôte :

– Bactéries a Gram positif : *Staphylococcus aureus* (bactérie cutanée qui colonise la peau et le nez du personnel hospitalier et des patients) provoque une grande variété d'infections pulmonaires, osseuses, cardiaques et sanguines et résiste fréquemment aux antibiotiques.

Les streptocoques bêta-hémolytiques sont également des agents pathogènes importants.

– Bactéries a Gram négatif : les entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Serratiamarcescens*) peuvent coloniser certains sites lorsque les défenses immunitaires de l'hôte sont affaiblies (site d'insertion d'un cathéter, d'une canule, sonde urinaire) et provoquer des infections graves (infection du site opératoire, infection pulmonaire, bactériémie, infection du péritoine).

– Autres micro-organismes a Gram négatif : *Pseudomonas spp.* sont souvent isolés dans l'eau et les milieux humides. Ils peuvent coloniser les voies digestives des patients hospitalisés.

– Plusieurs autres bactéries représentent un risque spécifiquement hospitalier (les diverses espèces de *Legionella* peuvent provoquer des pneumopathies (sporadiques ou endémiques) par inhalation d'aérosols impliquant de l'eau contaminée (climatisation, douches, aérosols à visée thérapeutique).

– Les anaérobies a Gram positif : (*Clostridium*) provoquent la gangrène (Coella et al.,1993).

2. Les autres agents

2.1. Les viroses

De toutes les infections nosocomiales documentées, seulement 5% sont causées par des virus dont l'unique réservoir en milieu hospitalier est l'homme-. Les services de pédiatrie sont de loin les plus affectés.L'implication des virus (hépatite B, CMV, VIH), dans un contexte nosocomial est avérée autant chez l'adulte que chez l'enfant (El Bouderkouï ,1988).

2.2. Parasites et champignons

Certains parasites (par exemple *Giardia lamblia*) se transmettent facilement chez l'adulte et l'enfant. De nombreux champignons sont des agents opportunistes et provoquent des infections en cas de traitement antibiotique prolongé et d'immunodépression sévère (*Candida albicans*, *Aspergillus spp*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptosporidium*). Ils sont une cause majeure d'infection généralisée chez les patients immunodéprimés. La contamination de l'environnement par des germes aéroportés comme *Aspergillus spp*. Présent dans les poussières et le sol (Ducel et *al.*, 2002).

Partie expérimentale

Chapitre 03

Matériel et méthodes

Cadre d'étude

Dans notre travail, les prélèvements ont été réalisés à partir de divers sites d'environnement hospitalier (pédiatrie, pédiatrie nourissants, médecine interne femme, médecine interne homme, cardiologie) de l'hôpital Hakim Sâadane wilaya de Biskra.

Les différentes manipulations microbiologiques sont réalisées dans le laboratoire de microbiologie département de SNV à l'université de Biskra.

1. Matériel

L'ensemble des milieux de culture, réactifs et appareillages seront cités au fur et à mesure de leurs utilisations.

2. Méthodes

2.1.Réalisation des prélèvements

Les prélèvements ont été réalisés à partir de différents sites environnementaux : des surfaces sèches (coin de la pièce, lit, poignée de porte, appareils, sol, paillasses), des surfaces humides (sanitaire) (Tab N°1).

Nous avons utilisé la méthode d'écouvillonnage qui consiste à frotter sur la surface sèche à analyser, l'extrémité cotonnée de l'écouvillon préalablement humidifiée à l'aide d'eau physiologique stérile, puis tromper et agiter dans un tube contenant 9 ml du bouillon nutritif. Si la surface à analyser est humide, il suffit de frotter directement sans l'utilisation de l'eau physiologique (Debabza, 2014).

Les échantillons ainsi prélevés ont été rapidement transportés, dans un sac isotherme avec des glaçants à l'intérieur en contact des prélèvements écouvillonnées, au laboratoire de microbiologie, où 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.

Tableau 1. Répartition des 18 prélèvements provenant des hôpitaux (Hakim Sâadane-Biskra) et les sites de prélèvement.

Service	Nombre des prélèvements	Type de surface
Pédiatrie	04	Paillasse
		Téléphone
		Sanitaire
		Masque a réanima
Néonatalogie	04	Masque a réanima
		Poignet
		Sol
		Lit
Médecine interne homme	03	Lit
		Poignet
		Moniteur de surveillance
Médecine interne femme	03	Seringue électrique
		Mur
		Sol
Cardiologie	04	Masque a réanima
		Défibrillateur
		Sol
		Poignet

2.2. Isolement

Après incubation, l'isolement a été fait à partir des tubes de bouillon nutritif présentant un trouble.

Cinq types de milieux de culture ont été utilisés : la gélose nutritive (GN) et la gélose MacConkey, Hektoen, Baired Parker (BP), et la gélose Sabouraud.

L'ensemencement se fait par l'anse de platine ou une pipette Pasteur à la surface de la gélose.

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

2.3.Purification

Après une lecture morphologique (examen macroscopique des bactéries pour déterminer les caractères culturels de ces bactéries par exemple : forme de la colonie, nombre types de colonies) (Delarras, 2007).

Les différentes colonies obtenues sont ré-isolées sur le même milieu afin d'obtenir de souches pures.

2.4.Conservation des souches

La conservation courte durée des isolats purifiés a été réalisée par ensemencement sur les quatre milieux de cultures inclinée (GN, Mac Cokey, Hektoen, Baird parker). Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les tubes ont été conservés au réfrigérateur à 4°C.

2.5.Test préliminaire

2.5.1. Examen microscopique après coloration différentielle

Principe

La coloration de Gram est basée sur la différence de perméabilité des bactéries à l'alcool (Beraud, 2001). Donc sur la composition chimique de la paroi, elle permet de distinguer la morphologie des bactéries et de les classer en deux grands groupes, celui des Gram positive et celui des Gram négative, basés sur la composition pariétale en lipides qui est élevée (20%) chez les Gram négatives et faible chez les Gram positives (Carbonelle et *al.* 1990).

Technique

La coloration différentielle distingue les bactéries en fonction de la structure de leur paroi .Deux colorations de référence sont employées, la coloration de Gram distinguant bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif. Elle est réalisée comme suit :

- Sur frottis fixé à la chaleur.
- Recouvrir la lame de violet de gentiane : 1 minute.
- Rejeter le violet de gentiane.
- Recouvrir le lugol : 1 minute.

- Rejeter le lugol.
- Décolorer à l'alcool, la lame était tenue inclinée. En pratique la durée de décoloration est suffisante lorsque ce qui s'écoule en bas de la lame inclinée est devenu clair.
- Stopper la décoloration par un nouveau lavage à l'eau.
- Recouvrir la lame de fuschine diluée, 30 secondes à 1 minute.
- Laver à l'eau.
- Sécher entre deux feuilles de papier filtre, puis à la chaleur.
- Examiner à l'immersion (Denis et *al.* 2007).

Lecture

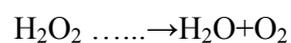
Les bactéries à Gram positif doivent apparaître colorées en violet et les bactéries à Gram négatif en rose (Denis et *al.* 2007).

2.5.2. Etude biochimique (galerie classique)

2.5.2.1. Test de catalase

Principe

La catalase est une enzyme anti-oxydante présente chez les bactéries aérobies et dans les cellules des plantes et des animaux. Le peroxyde d'hydrogène engendré comme sous-produit du métabolisme est un agent oxydant puissant et nocif qui doit être éliminé. La catalase assure cette fonction d'élimination en convertissant le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Perry et *al.*, 2004), (Anna Rita, 2006) ; selon l'équation :



Technique

Pour cela, une goutte d'eau oxygénée à 3 %, prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur est déposée sur une lame de microscope optique. Une partie de la colonie pure à tester est alors déposée sur la goutte d' H_2O_2 , à l'aide d'une anse en plastique stérile (Anna Rita, 2006).

Lecture

La formation de bulles engendrée par la production d'oxygène (O₂), due à l'activité de la catalase, indique une réaction positive (Anna Rita, 2006).

2.5.2.2.Milieu mannitol mobilité**Principe**

Il s'agit d'un milieu semi-solide contenant entre autres du mannitol, et du rouge de phénol comme indicateur de pH (Denis et *al.* 2007).

Technique

- Le milieu est ensemencé par piqûre centrale jusqu'au fond des tubes à l'aide d'une anse de platine.
- Incuber à 37°C pendant 24 h à 48 h.

Lecture

Lorsque l'indicateur coloré passe du rouge au jaune, ce qui correspond à l'acidification du milieu, le mannitol a été utilisé.

Le caractère mobile est défini dans ce milieu par un trouble envahissant toute la largeur de la gélose de part et d'autre de la piqûre centrale, alors qu'une bactérie immobile ne se développe que le long de la piqûre centrale (Denis et *al.* 2007).

2.5.2.3.Utilisation du citrate comme unique source de carbone**Principe**

Le milieu au citrate de Simmons contient du citrate de sodium et du sel d'ammonium ainsi que du bleu de bromothymol. Où il détermine si la bactérie peut utiliser le citrate comme seule source de carbone (Denis et *al.*, 2007).

Technique

- À partir d'une colonie obtenue sur gélose, à l'aide d'une anse de platine, nous avons fait un prélèvement peu abondant, puis ensemencé en stries serrées la surface de la pente du milieu gélosé.
- Incubé à 37°C pendant 24 à 48 heures (Guiraud, 2003).

Lecture

Une utilisation du citrate se traduit par une culture sur la gélose et, le plus souvent, cette croissance s'accompagne d'une libération d'ammoniaque à partir des sels d'ammonium, ce qui se traduit par un virage du bleu de bromothymol au bleu (Denis *et al.* 2007).

2.5.2.4. Gélose T.S.I (Triple Sugar Iron agar)

Principe

Cette gélose permet l'identification des Entérobactéries par la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose (avec ou sans production de gaz), du saccharose et de la production de sulfure d'hydrogène (H₂S) (Leulmi, 2015).

Technique

- Elle consiste à ensemencer en stries de la pente de la gélose puis par piqûre centrale du culot.
- La lecture se fait après 18h d'incubation à 37°C (Guiraud, 2003).

Lecture

Lecture de glucose et du gaz au niveau du culot

- La fermentation du glucose se traduit par le virage au jaune du culot.
- La production de gaz se traduit par la formation ou non de bulles de gaz dans la masse du culot.

Lecture de la pente

- La fermentation du glucose et /ou du lactose se traduit par le virage au jaune de la masse du culot.

Production de l'H₂S se traduit par noircissement du milieu (Guiraud, 2003).

2.5.2.5. Milieu Urée – Indole

Principe

Ce milieu permet de mettre en évidence les caractères suivants

- Présence d'une uréase.
- Présence d'une tryptophanase.
- Présence d'un tryptophane désaminase (TDA) Ce milieu est utilisé pour l'identification des entérobactéries (bacille Gram -, oxydase -).

Technique

- Ensemencer avec quelques gouttes de suspension bactérienne ou avec une colonie prélevée à l'anse sur un milieu solide.
- Incubation 24 heures à 37°C.

Lecture

Lecture d'Uréase

- **Milieu rouge**

Alcalinisation du milieu due à la dégradation de l'urée, la bactérie possède l'uréase elle est dite uréase +.

- **Milieu orangé (inchangé)**

Pas d'alcalinisation du milieu La bactérie ne possède pas l'uréase elle est dite uréase -

Lecture d'Indole

Recherche de la production d'indole

Ajouter 3 gouttes du réactif de Kovacs et effectuer la lecture sans agiter le milieu.

- Apparition d'un anneau rouge Présence d'indole.
- Le tryptophane a donc été hydrolysé, la bactérie a produit de l'indole et elle est dite indole+.
- L'anneau reste orangé.
- Absence d'indole, la bactérie n'a pas produit d'indole et elle est dite indole -.

3. Identification des champignons

Après quelques jours d'incubation des champignons sur le milieu Sabouraud, on tombe sur de nombreuses espèces qui sont difficiles à identifier à l'œil nu, donc on doit faire une étude macroscopique puis une étude microscopique.

3.1. Étude macroscopique

L'identification macroscopique est un acte essentiel.

On doit noter

- La vitesse de croissance : nombre de jours pour obtenir une culture (1, 2, une semaine, deux à trois semaines).
- L'aspect de la colonie en surface et la forme de la colonie : type bactérienne ou filamenteuse duvet, acumination centrale, poudreuse
- La couleur de la colonie : blanc, jaune, rouille, chamois ± clair, gris verdâtre, beige, violet, cireuse, ocre, jaune, rosée...

3.2. Étude microscopique

Tests microscopiques après isolement

Examen direct

Comme à l'examen direct du produit pathologique, l'état frais permettra une orientation de l'identification ou une identification en lien avec la macroscopie.

Pour les filamenteux, cet examen doit absolument prélever le mycélium sans le casser pour voir les fructifications. Les hyphes : couleur, présence ou non de cloisons, diamètre approximatif, structures particulières. Structure et disposition des spores : couleur, forme, nombre, cloisons, taille

Les études microscopiques sont faites à partir d'un échantillon monté entre lame et lamelle dans une goutte d'eau ou de colorant. (Barnett *et al.*, 1972).

❖ Pour les colonies de types bactérie

- Ajouter une goutte d'eau distillée sur une lame.
- Prélever une colonie des levures à l'aide d'une anse de platine.
- Déposer la colonie sur la goutte d'eau distillée et les mélanger.
- Poser la lamelle, en partant d'une position inclinée.
- Faire l'observation microscopique à un grossissement (X40).

❖ Pour les colonies filamenteuses

- Prélever les extrémités des colonies parce que sont les colonies les plus jeunes
- Prélever des colonies au niveau de centre qui sont des colonies âgées.
- Puis déposer tous les deux types des colonies sur une lame bien séparés.
- L'ajout de goutte de colorant (bleu de méthylène) pour bien visualiser.
- Déposer la lamelle.
- Observation microscopique X40.

Chapitre 04

Résultats et discussions

Dans ce chapitre, nous présente tous les résultats de cette recherche et l'identification phénotypique des germes isolés dans un milieu hospitalier (Hakim Sâadane- Biskra).

1. Analyse des prélèvements

Après une période d'incubation à 37°C pendant 24h à 48h en bouillon nutritif, nous avons obtenu les résultats résumés dans le tableau (2)

Tableau 2. Analyse microbiologique des prélèvements isolés d'hôpital Hakim Sâadane.

Service	Nombre des prélèvements	Type de surface	Résultats après 24h à 48h à 37°C
Pédiatrie	04	Paillasse	+
		Téléphone	+
		Sanitaire	+
		Masque a réanima	+
Néonatalogie	04	Masque a réanima	+
		Poignet	+
		Sol	+
		Lit	+
Médecine interne homme	03	Lit	+
		Poignet	+
		Moniteur de surveillance	+
Médecine interne femme	03	Seringue électrique	+
		Mur	+
		Sol	+
Cardiologie	04	Masque a réanima	+
		Défibrillateur	+
		Sol	+
		Poignet	+

Dix-huit prélèvements de surface ont été collectés à partir de cinq services à l'hôpital Hakim Sâadane. Les échantillons de surface ont été déposés dans un milieu d'enrichissement (bouillon nutritif). Après l'incubation de 24 à 84h à 37°C, on observe que le bouillon obtient trouble qui indiquant la multiplication des bactéries, puis les échantillons sont ensemencés sur les cinq milieux de culture : Gélose nutritive (GN) ; la Gélose MacConkey, Hektoene, Baird Parker (BP), et la gélose Sabouraud. (Fig 2)



Figure N°2 Ensemencement des prélèvements sur les cinq milieux de cultures

2. Caractérisation des isolats

Nous avons utilisé dans notre étude, pour isoler les différents types des microorganismes responsables des infections nosocomiales (MRIN), cinq milieux considérés qui sont :

Une gélose nutritive

Ce milieu est dit non sélectif car il ne permet pas de sélectionner une souche bactérienne précise. Ce milieu permet donc à toutes souches bactériennes de pouvoir pousser, à condition qu'elles soient non exigeantes (Fleury, 1988).

Le milieu Baird Parker

La gélose Baird Parker est le milieu sélectif des *S. aureus*. Milieu semi-synthétique Ce milieu est caractérisé par Une base nutritive riche.

Les colonies de *S. aureus* présentent un aspect caractéristique après 24 heures d'incubation à 37 °C : Colonies noires, brillantes, entouré d'un halo transparent et d'un liseré opaque de 2 à 5 mm de diamètre.

D'autres germes : *Micrococcus*, *Bacillus*, voire levures peuvent cultiver sur ce milieu sans être inhibés mais leurs aspects macroscopiques sont différents de celui de *S. aureus* après 24 heures (Fleury, 1988)

Gélose Hektoen

La gélose Hektoen est un milieu d'isolement des *Salmonelles* et des *Shigelles*, bien que de nombreuses bactéries à Gram négatif puissent se développer sur ce milieu. L'identification d'entérobactéries pathogènes repose sur le non utilisation des glucides présents dans le milieu (Fleury, 1988).

Le résultat de la culture dans ce milieu

- Colonies saumon : *Escherichia*, *Levinea*, *Citrobacterdiversus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Yersinia*.
- Colonies saumon à centre noir *Citrobacterfreundii*, *Proteusvulgaris*,
- Colonies bleu-vert à centre noir Suspicion de *Salmonella*, à différencier de *Proteus mirabilis*
- Colonies bleu-vert ou vertes Suspicion de *Shigella* ou de *Salmonella* (Fleury, 1988).

Milieu Mac Conkey

Milieu sélectif pour l'isolement des bacilles Gram- *Salmonella* et *Shigella* ainsi que des bactéries coliformes dans les eaux, les produits alimentaires, les produits pharmaceutiques et biologiques.

Ce milieu contient deux inhibiteurs de la flore Gram+, les sels biliaries et le cristal violet.

Le milieu contient un critère de différenciation, le lactose dont l'utilisation est révélée par l'indicateur coloré du milieu, le rouge neutre, il vire au rouge en milieu acide.

Si la bactérieensemencée fermente le lactose, le milieu devient rouge, par virage du rouge neutre, du fait de l'acidification du milieu (Fleury, 1988).

La lecture après l'incubation de 18 à 24 h à 37 °C.

- Colonies rouges entourées d'un halo opaque de la même couleur du à la précipitation des sels biliaries: lactose+
- Colonies jaunes ou incolores : lactose- (Fleury, 1988).

La gélose de Sabouraud

La gélose de Sabouraud constitue un milieu classique pour la culture, l'isolement et l'identification des levures et des moisissures saprophytes ou pathogènes.

Elle est recommandée essentiellement pour l'isolement des moisissures dans les prélèvements peu chargés en bactéries, les contrôles de stérilité des produits pharmaceutiques, cosmétiques ou alimentaires, la culture des moisissures en vue de réaliser leur identification (Fleury, 1988).

Parmi les 18 échantillons prélevés dans une période de 2 mois, 43 souches sont isolées à partir des milieux de cultures utilisés ayant été sélectionnés sur la base des caractères culturels. Ce taux de détection relativement fort pourrait être dû aux conditions de croissance et facteur de temps.

2.1. Aspect macroscopique des isolats

L'examen macroscopique des colonies sur les cinq milieux de culture après l'ensemencement et incubation ont montré la présence de plusieurs types de colonies ce qui nécessite une étape de caractérisation et d'identification des isolats. (Nos résultats sont similaires ou différents aux résultats).

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau N°3.

Tableau 3. Aspect de culture des bactéries trouvées sur les cinq milieux de cultures (gélose nutritive (GN), Baird Parker, Hektoene, MacConkey, Sabouraud).

Milieu de culture	Numéro de colonie	Les caractères macroscopiques des colonies	Le code de la colonie
Hektoen	Colonie 01	Petites colonies jaune saumon ; rondes à bord régulier, de relief bombé et d'aspect lisse.	HC1a
	Colonie 02	Grandes colonies jaune saumon rondes à bord irrégulier, bombées et d'un aspect lisse	HC1b

	Colonie 03	Colonies rondes vertes claires a bleuâtres sans centre noir, a bord régulier et d'un aspect lisse.	HC2a
	Colonie 04	Petites colonies rondes vertes à bord régulier et bombées avec un aspect lisse.	HC2b
Mac conkey	Colonie 01	Grandes colonies rouges entourées d'un halo opaque de la même couleur rondes à bord régulier et d'un aspect lisse.	MC1a
	Colonie 02	Petites colonies rouges rondes à bord régulier et d'un aspect lisse.	MC1b
	Colonie 03	Colonies moyennes incolore jaunâtres, rondes à bord régulier d'un aspect lisse.	MC2a
	Colonie 04	Des colonies moyennes incolores rondes à bord irrégulièresd'un aspect lisse	MC2b
	Colonie 05	Petites colonies incolore jaunâtres, rondes à bord régulier d'un aspect lisse	MC2c
Baird parker	Colonie 01	Colonies rondes noires, brillantes, entouré d'un halo transparent et d'un liseré opaque	BC1

	Colonie 02	Colonies brunes rondes, à bord régulier, de relief bombé et d'aspect lisse et brillant.	BC2
Sabouraud	Colonie 01	Colonies lisses blanches crémées rondes et bombées	SC1
	Colonie 02	Moisissures filamenteuses d'un aspect cotonneux blancs puis verts puis vert foncé à grise	SC2
	Colonie 03	Moisissure d'un aspect cotonneux blanc gris clair puis gris foncé à noir	SC3
Gélose nutritive	Colonie 01	Colonies blanchâtres, de taille grande muqueuse ronde à contour régulier	GC1
	Colonie 02	Colonies jaunâtre rondes à contour régulières	GC2

Tableau 04 Codification des colonies trouvées dans des services des différents types de surfaces.

Service	Nombre des prélèvements	Type de surface	Les colonies
Pédiatrie	04	Paillasse	HC1b ; MC2c
		Téléphone	HC1b ; HC2a ; SC1
		Sanitaire	HC1a ; MC1a ; MC2b
		Masque a réanima	HC1a ; MC1a ; MC1b
Néonatalogie	04	Masque a réanima	MC1b ; MC2b ; SC2
		Poignet	HC1a ; MC1a ; SC2
		Sol	MC2b ; MC1b ; SC2
		Lit	HC1a ; MC1a ; SC1

Médecine homme	interne	03	Lit	HC2b ; MC2a
			Poignet	SC1 ; MC2b
			Moniteur de surveillance	HC1b ; BC2
Médecine femme	interne	03	Seringue électrique	HC2a
			Mur	BC1 ; GC2
			Sol	HC2a ; SC3
Cardiologie		04	Masque a réanima	HC2a ; SC2
			Défibrillateur	HC1a ; MC1a
			Sol	SC3 ; GC1
			Poignet	GC1 ; GC2 ; BC1

Observation macroscopique des colonies obtenues :

Les différents aspects macroscopiques des colonies illustrés dans les figures 3, 4, 5, 6 et 7.

Concernant l'aspect macroscopique de différentes colonies regroupées dans le (Tab 03)

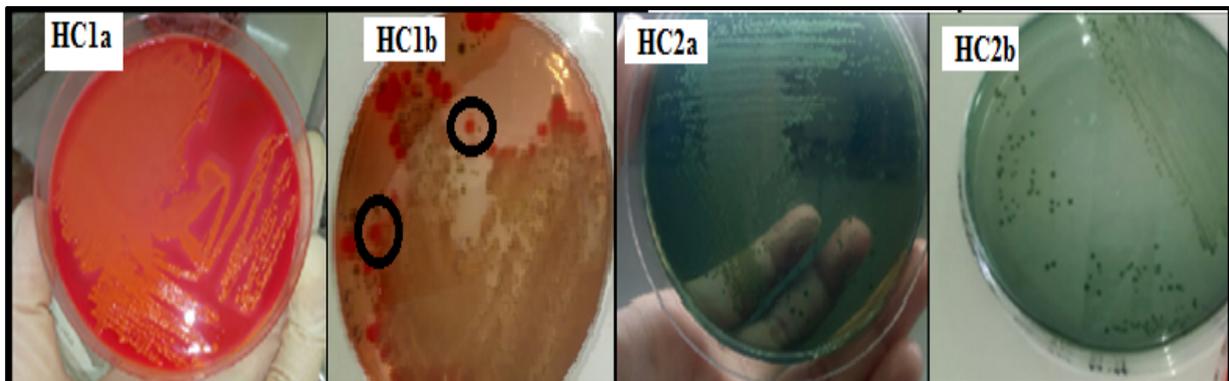


Figure N°3 Les aspects macroscopiques des colonies obtenues dans le milieu Hektoen.

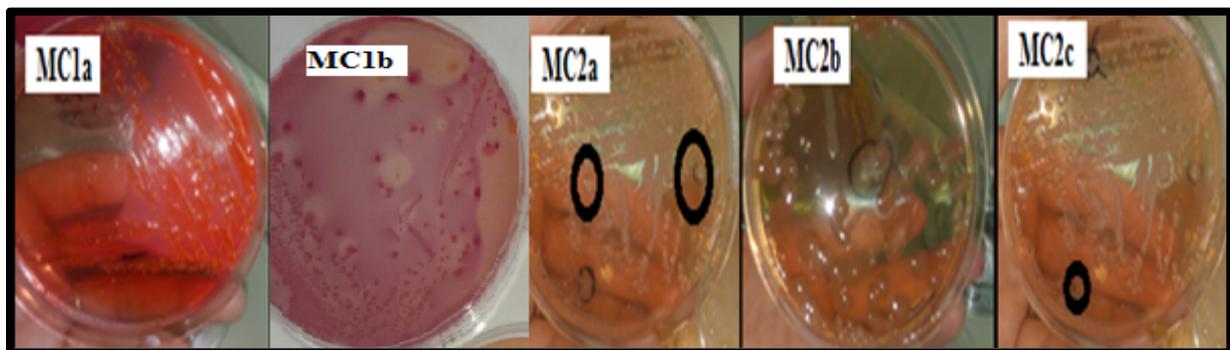


Figure N°4 Les aspects macroscopiques des colonies obtenues dans le milieu Mac Conkey

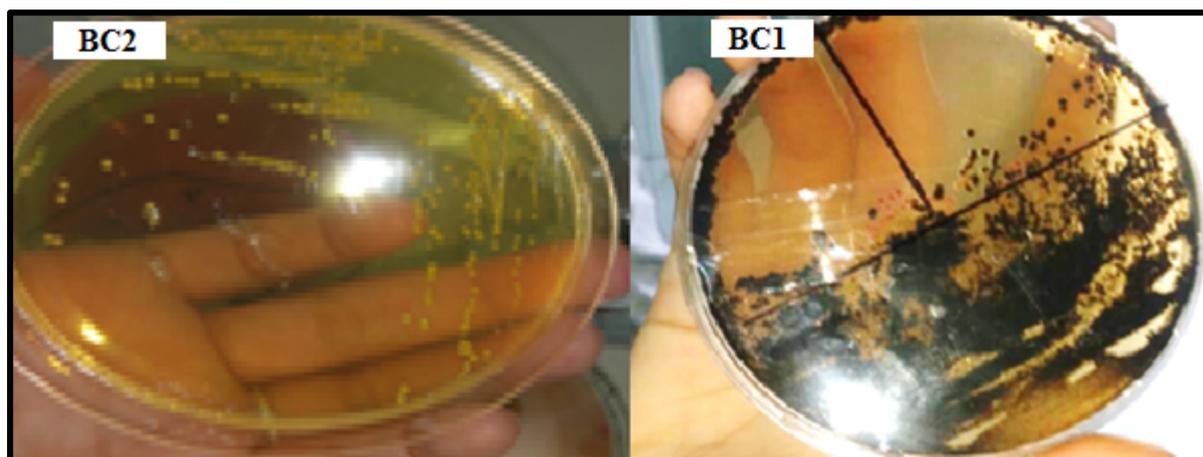


Figure N°5 Les aspects macroscopiques des colonies obtenues dans le milieu Baird Parker

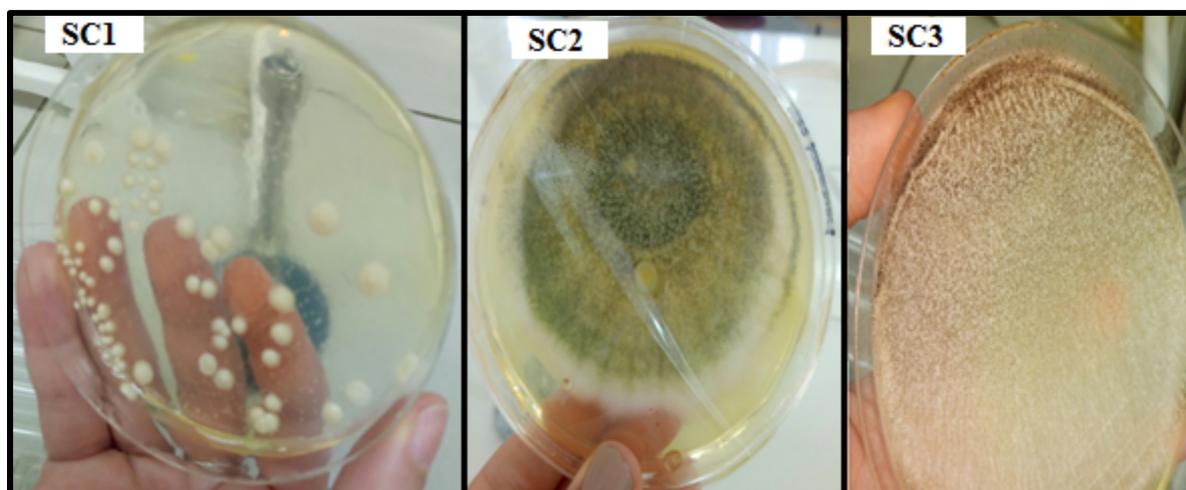


Figure N° 6 les aspects macroscopiques des colonies obtenues dans le milieu Sabouraud

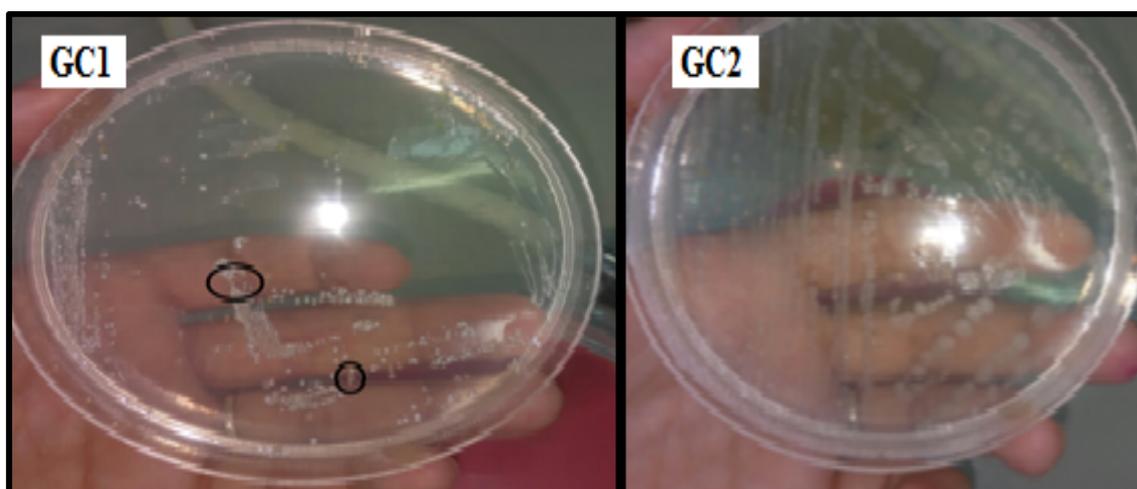


Figure N°7 Les aspects macroscopiques des colonies obtenues dans le milieu Gélose Nutritive

2.2. Aspect microscopique

Les résultats de l'examen microscopique des différents types de colonies ayant poussé sur les 5 différents milieux de cultures (GN ; Baird Parker ; Hektoene ; Mac Conkey et Sabouraud) sont :

La coloration de Gram des neuf souches parmi les souches isolées (MC1a ; HC1a ; MC1b ; HC1b ; HC2a ; HC2b ; MC2a ; MC2b ; MC2c) ont une forme bâtonnet (des bacilles) a un Gram négatif (-) (Fig 8). Et quatre souches isolées (GC1 ; GC2 ; BC1 ; BC2) ont une forme de cocci a Gram positif (Fig 9).

Les autres souches d'après leur observation macroscopique et microscopique sont : 2souches des moisissures (SC2 ; SC3) (Fig 11), et une souche de levure (SC1) (Fig 10).

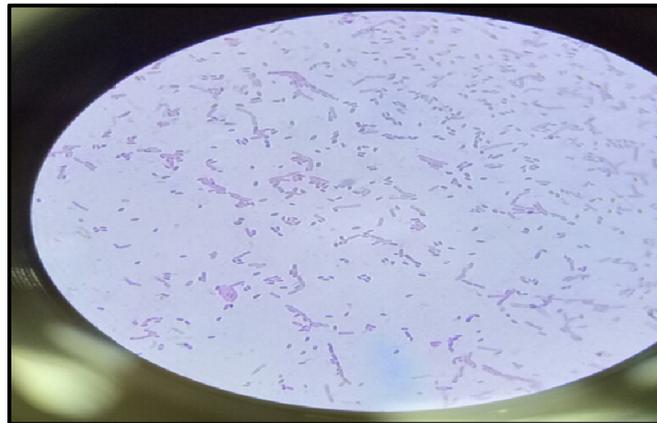


Figure N°8 Observation Microscopique des bacilles Gram négatif isolées à partir de service « néonatalogie d'un lit d'un patient ».

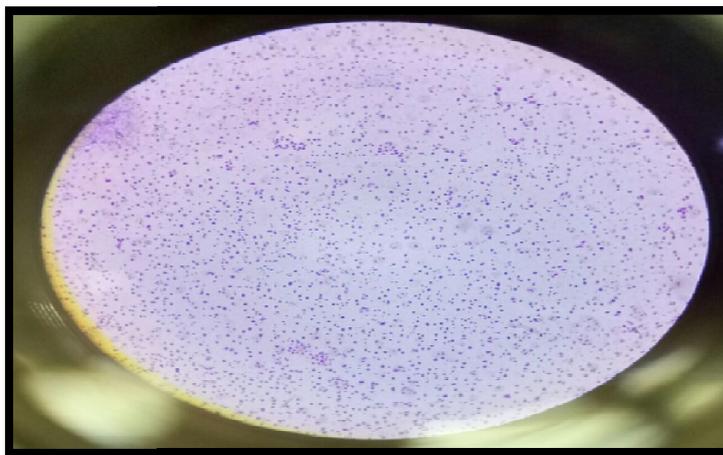


Figure N°9 Observation microscopique des cocci Gram positif isolées du service « cardiologie à partir d'un poignet d'une chambre de malade ».



Figure N°10 Observation microscopique d'un type des levures « SC1 » isolées du service « Pédiatrie à partir du téléphone fixe ».

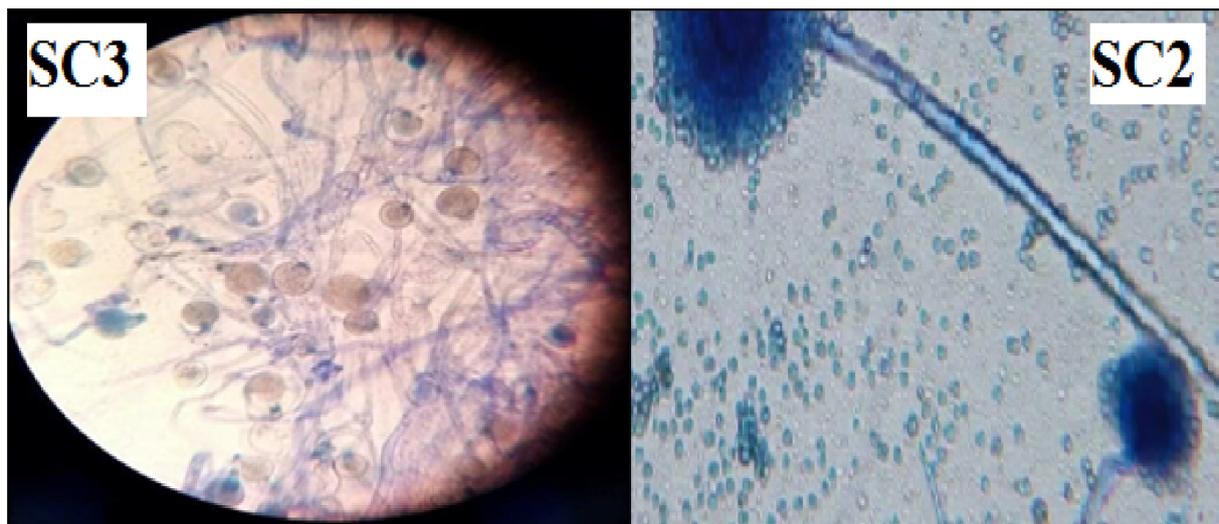


Figure N°11 Observation microscopique d'un type des moisissures isolées du service « cardiologie à partir d'un masque a réanima » coloration par bleu de méthylène.

Les résultats obtenus montrent la domination des bacilles à Gram négatif par rapport aux cocci à Gram positif dans l'environnement étudié.

2.3. Etude biochimique (galerie classique) : Un manque des galeries commerciales, on a opté de suivre le travail d'essai d'identification par l'utilisation de protocole classique, les différentes résultats sont mentionnées dans le (Tab 5).

Tableau 5. Résultats de la galerie classique

La souche	Forme	Gram	CAT	TSI		CIT	URE	IND	H ₂ S	MAN		Production De gaz
				La ponte (Lac)	Le culot (Glu)					+/-	Mobilité	
HC1a	Bacille	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
MC1a	Bacille	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
MC1b	Bacille	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
HC1b	Bacille	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
HC2a	Bacille	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+
HC2b	Bacille	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
MC2a	Bacille	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
MC2b	Bacille	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
MC2c	Bacille	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
BC1	Cocci	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
GC2	Cocci	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
BC2	Cocci	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
GC1	Cocci	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-

2.3.1. Test de catalase

Les isolats ont montré HC1a ; MC1a ; MC1b ; HC1b ; HC2a. HC2a ; MC2a ; MC2b ; MC2c ; BC1 ; GC2 ; BC2 une réaction positive avec le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), donc ils possèdent l'enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Fig 12), alors que les souches GC1 ne la possèdent pas.

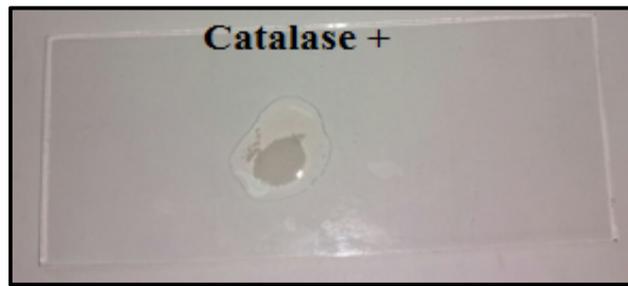


Figure N°12 Résultat de test de catalase

2.3.2. Milieu TSI

Après l'incubation, on a remarqué que pour les souches suivantes : HC1a ; MC1a ; HC1b ; MC1b, il y a eu croissance sur milieu Triple SugarIron agar (TSI) et une acidification dans la pente et le culot, d'où le virage du rouge de phénol au jaune, avec la présence des bulles d'air et l'absence de noircissement (Fig13), donc les six souches sont capables de fermenter le lactose et saccharose et le glucose, avec la production de gaz et sans production d' H_2S . Donc ces bactéries sont : lactose et Saccharose (+), glucose (+), gaz (+), H_2S (-).

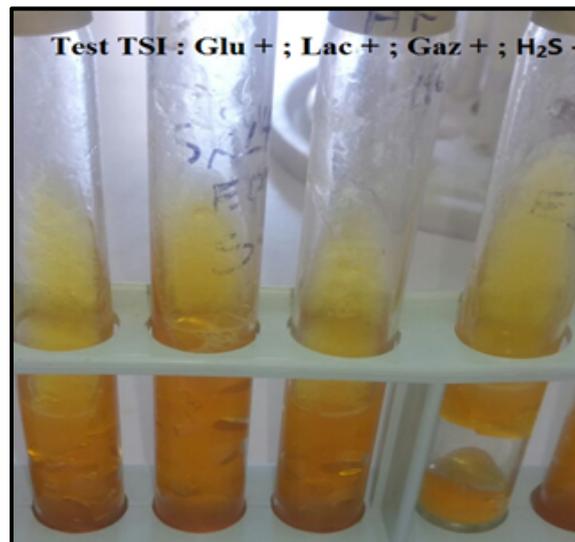


Figure N°13 Résultat de test de TSI pour les quatre souches HC1a ; MC1a ; HC1b ; MC1b.

Mais pour la souche HC2a il y a une croissance dans le milieu mais avec acidification dans le culot et sans acidification dans la pente, d'où le virage de couleur de milieu de rouge de phénol au jaune au niveau de culot mais reste rouge dans la pente, avec la présence des bulles d'air et l'absence de noircissement, donc la souche est capable de fermenter le Glucose avec la production de gaz et incapables de fermenter le lactose sans production de H_2S . Donc les bactéries sont Glu (+), Lac (-), gaz(+), H_2S (-)(Fig 14).

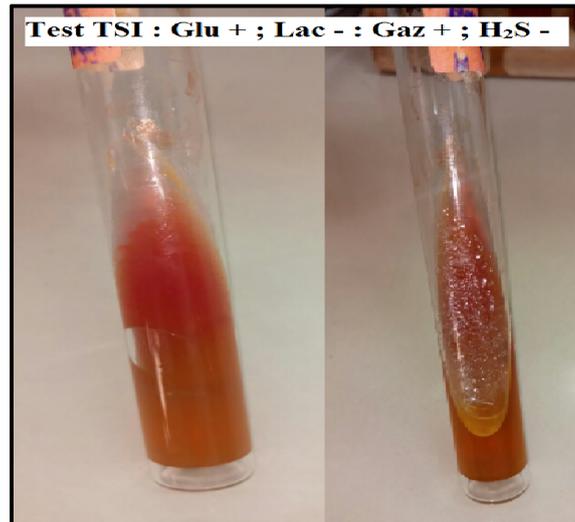


Figure N°14Résultat de test de TSI pour la souche HC2a

Pour les souches HC2b ; MC2b et BC2 il y a une croissance dans le milieu TSI avec acidification dans le culot et sans acidification dans la pente, elle est observée par le virage de couleur de milieu de rouge phénol au jaune au niveau de culot mais elle reste rouge au niveau de la pente sans la présence des bulles d'air et l'absence de noircissement (Fig 15) , donc les trois souches sont capables de fermenter le Glucose et incapable de fermenter le Lactose sans production de gaz et sans production d'H₂S. Donc les bactéries sont : Glu(+), Lac(-), gaz(-), H₂S(-).



Figure N°15Résultat de test de TSI pour la souche MC2b

Pour les souches BC1 ; GC2 ; GC1, il y a une croissance dans le milieu TSI avec acidification dans le culot et dans la pente est remarquée par le virage de couleur de milieu de rouge phénol au jaune au niveau de culot et au niveau de la pente, sans la présence des bulles d'air et l'absence de noircissement (Fig 16). Donc ces souches sont capable de fermenter le Lactose et de Glucose sans la production de gaz et d' H_2S , Donc les trois souches sont Glu (+), Lac(+), Gaz(-), H_2S (-).



Figure N°16Résultat de test de TSI pour la souche GC1.

Pour la souche MC2c il y a une croissance dans le milieu TSI avec acidification dans le culot et sans acidification dans la pente, elle est remarquée par le virage de couleur de milieu de rouge phénol au jaune au niveau de culot mais elle reste rouge au niveau de la pente, avec la présence des bulles d'air et de noircissement (Fig 17), donc la souche est capable de fermenter le Glucose et incapable de fermenter le Lactose avec la production de Gaz et de l' H_2S .alors la souche MC2c est : Glu+, Lac-, Gaz+, H_2S + .



Figure N°17Résultat de testTSI pour la souche MC2c

Alors pour la souche MC2b il n'y a une croissance dans milieu, mais pas d'acidification dans la pente et le culot, avec la présence des bulles d'air et l'absence de noircissement (Fig 18), donc la souche est incapable de fermenter le lactose et saccharose et le glucose, et elle ne produit pas l'H₂S et capable de produire le gaz. Donc cette bactérie est : lactose et Saccharose (-), glucose (-), H₂S (-), gaz (+).

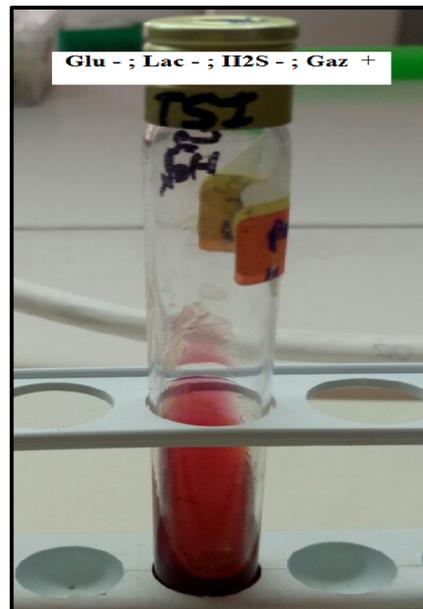


Figure N°18Résultat de test de TSI pour la souche MC2b.

2.3.3. Test du mannitol mobilité

Les résultats obtenus montrent que pour les dix souches HC1a ; MC1a ; MC1b ; HC1b ; HC2a ; HC2b ; MC2a ; MC2b ; BC1 ; GC2, il y a une acidification du milieu, d'où le virage du rouge de phénol au jaune, donc les dix souches utilisent le mannitol. Par contre les trois souches MC2c ; BC2 ; GC1, sont mannitol négatif.

En ce qui concerne la mobilité, les bactéries mobiles sont diffusées à partir de la ligne verticale d'ensemencement en créant un trouble, ce qui a été observé pour les sept souches suivantes : HC1a ; MC1a ; MC1b ; HC2b ; MC2a ; MC2b ; MC2c. Alors que les six souches HC1b ; HC2a ; BC1 ; GC2 ; BC2 ; GC1 : ont uniquement poussé le long de la strie d'ensemencement donc elles sont immobiles.

Alors les souches HC1a ; MC1a ; MC1b ; HC2b ; MC2a ; MC2b utilisent le mannitol (mannitol +) et mobiles (Fig 19).



Figure N°19 Résultat de test de mannitol pour la souche HC1a

Les souches HC2a ; HC1a ; BC1 ; GC2 sont des souches utilisent le mannitol (mannitol+) mais immobiles (Fig 20).



Figure N°20 Résultat de test de mannitol pour la souche HC2a

Pour la souche MC2c, elle n'utilise pas le mannitol (mannitol -) mais elle est mobile (Fig 21).

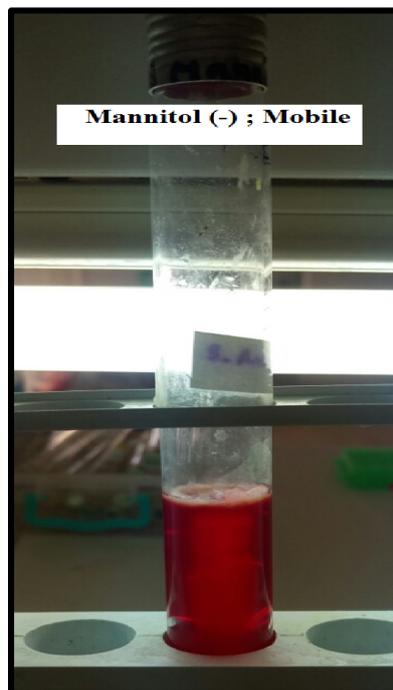


Figure N°21 Résultat de test de mannitol pour la souche MC2c.

Et pour les souches BC2 et GC1 sont mannitol (-) et immobiles (Fig 22).



Figure N°22 Résultat de test de mannitol pour la souche BC2

2.3.4. Recherche de l'utilisation du citrate

Les bactéries sont capables d'utiliser le citrate comme seule source de carbone (Fig 23) s'il est utilisé aussi il y a une croissance et le milieu s'alcalinise, cela se traduit par le virage de couleur du vert en bleu. Ceci a été constaté que pour les six souches suivantes : MC1b ; HC1b ; HC2a ; MC2b ; MC2c ; BC1 ; GC2, mais pas pour les souches : HC1a ; MC1a ; HC2b ; MC2a ; BC2 ; GC1, donc elles sont dépourvus de citrate perméase, et par conséquent elles sont incapables d'utiliser le citrate comme seule source de carbone.

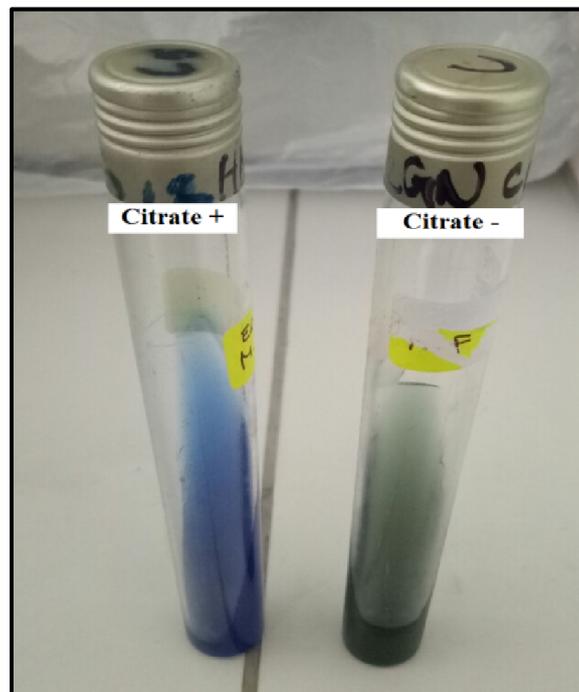


Figure N° 23 Résultat de test de citrate

2.3.5. Test d'urée-indole

Les résultats qu'on a obtenu montrent que pour les cinq souches HC1b ; MC2c ; BC1 ; GC2 ; BC2, il y a une alcalinisation de milieu, accompagnée par le virage de couleur du jaune en rouge, dû à la dégradation de l'urée donc les bactéries possèdent l'uréase et elles sont : uréase +.

Contrairement pour les huit autres souches HC1a ; MC1a ; MC1b ; HC2a ; HC2b ; MC2a ; MC2b ; GC1 (Fig 24), où la couleur de milieu reste jaune à jaune orangée signifiant l'absence de l'alcalinisation de milieu, parce que les bactéries ne possèdent pas l'uréase pour dégrader l'urée, donc ces bactéries sont (uréase -).

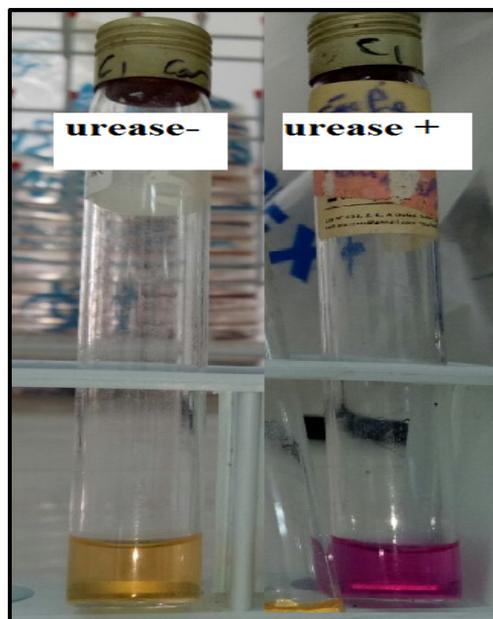


Figure N°24 Résultat du test d'Uréase

Recherche de la production d'indole

Après l'addition de 3 gouttes du réactif de Kovacs et la lecture sans agiter le milieu, on constate qu'il y a une apparition d'un anneau rouge pour les souches HC1a ; MC1a ; HC2a, (Fig 25) ; ça signifie que les bactéries sont capables de produire l'indole et hydrolyser le tryptophane, donc ces bactéries sont (Indole +).

Alors pour les autres souches HC1b ; MC1b ; HC2b ; MC2a ; MC2b ; MC2c ; BC1 ; BC2 ; GC1 ; GC2, l'anneau reste orangé ça signifie l'absence d'indole et les bactéries incapables de produire l'indole, donc elles sont (Indole -).



Figure N°25Résultat de test d'Indole

Remarque : après la réalisation des tests biochimique pour toute les souches on observe qu'il y a certaines souches ayant les mêmes caractères biochimique qui sont : [(HC1a) identique à la souche (MC1a) et (HC2b =MC2a), (BC1=GC2)].

3. Identification des souches

En englobant les résultats des différents tests, on peut conclure l'identification des isolats regroupée dans le tableau 6.

Tableau6.Identification des souches

Souche	Espèce
HC1a=MC1a	<i>Ecoli</i>
MC1b	<i>Enterobactercloacae</i>
HC1b	<i>Klebsiellapneumoniae</i>
HC2a	<i>Shigellaflexneri</i>
HC2b = MC2a	<i>Salmonellaparatyphi A</i>

MC2b	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
MC2c	<i>Proteus mirabilis</i>
BC1=GC2	<i>Staphylococcus aureus</i>
BC2	<i>Micrococcuspp</i>
GC1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>

Parmi les espèces trouvées à partir des milieux de prélèvement : 5 espèces appartiennent à la famille des Entérobactéries qui sont (*E.coli*, *Enterobactercloacae*, *Klebsiellapneumoniae*, *Shigellaflexneri*, *Salmonellaparatyphi A.*)

Les Entérobactéries constituent une famille hétérogène de bactéries à Gram négatif, qui est fréquemment impliquée dans les infections humaines. Elle se compose d'environ 30 genres de bactéries et de plus de 100 espèces (Avril et al. 2000).

Ce sont des bactéries mobiles par ciliature péritriche ou immobiles. Une de leurs caractéristiques est de réduire les nitrates en nitrites, et d'acidifier le glucose par voie fermentative avec souvent la production de gaz (Avril et al. 2000).

Tableau 7.Aspect des levures et moisissures isolées

	<i>Candida</i>	<i>Aspergillusfumigatus</i>	<i>Mucor</i>
Délai de la culture	18-24 heures à 37°C	24 à 48 h à 37°C	24 à 48 h à 37°C
Aspect macroscopique	Colonies leviformes blanches et crémeuses	Aspect poudreux blanc, puis bleu-vert, puis vert foncé à gris	Cotonneux : blancs gris claires puis foncés
Aspect microscopique	Levures bourgeonnantes, ovalaires (3 x 6 µm), non capsulées, à bourgeonnement multipolaire	La tête aspergillaireUnisériée, en colonne compacte, assez grande. Phialides directement portées par la	Les hyphes non septès ; les spongiophores : naissants sur les hyphes, non ramifieurs, sans

	Filaments :pseudomycélium, eumycélium avec blastospores	vésicule, dressée. Conidies : Globuleuses, vertes, échaulées, petites. Conidiophore : Court, lisse et incolore, évasement progressif au sommet.	aprophyse, les sporocystes et les spores : des grandes tailles, globuleux. Les spores (sporangiospores) ovales, lisses et rugueuses
--	--	--	--

En ce qui concerne les germes isolés au niveau de milieu sabouraud, et d'après l'analyse des résultats et les observations macroscopique et microscopique (Tab 7), on peut conclure que ce germe est *Candidasp.* (SC1) l'espèce de levure la plus connue du genre *Candida*. Un autre genre de « champignons imparfaits » est détecté l'*Aspergillusfumigatus*(SC2), les *Mucor*(SC3).

Les Infection fongique signée par une fréquence croissante enregistrée ces dernières années, l'émergence des champignons microscopiques comme agents pathogènes majeurs est notable.

Les infections fongiques les plus récurrentes sont l'Aspergillose dont l'origine est exogène et les candidoses dont les sources peuvent être digestives où provenant de solutions contaminées: collyres, liquide d'alimentation (Anna et al, 1994).

4. Répartition des microorganismes au niveau des services

Service de Pédiatrie

E. coli occupe la première place par sa présence dans les deux surfaces (sanitaire et masque a réanima) avec la présence d'un *Enterobacteriecloacae* au niveau masque a réanimasuiivi par *Klebsiellapneumoniae* au niveau de la pailleasse et téléphone, avec la présence de *Proteus mirabilis* et *Shigella flexneri* au niveau de pailleasse, téléphone respectivement. Ainsi la présence des *Candida* au niveau de téléphone, et *Pseudomonas aeruginosa* obtenu au niveau du sanitaire.

Service de néonatalogie

Les bactéries isolées sont des *Escherichia coli* au niveau de poignet et le lit d'un patient, avec la présence des *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter cloacae* au niveau de masque a réanima et le sol, a l'addition des *Aspergillus* au niveau de masque a réanima, poignet et sol et une souche de *Candidasp* au niveau de lit d'un patient.

Service Médecine Interne Homme

D'après les 3 prélèvements pris, une souche de *Salmonella paratyphi A* est isolée au niveau de lit de patient, et à partir de poignet les germes isolés sont *Candidasp*, *Pseudomonas aeruginosa*. *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus spp* qui ont été isolés au niveau du moniteur de surveillance.

Service Médecine Interne Femme

Shigella flexneri est la bactérie isolée à partir de la seringue électrique, autre bactérie de genre *Staphylococcus aureus* a été trouvée au niveau de mur. Par ailleurs au niveau de sol on obtient le *Mucor* et *Shigella flexneri*.

Service Cardiologie

Shigella flexneri, *Aspergillus fumigatus*, ces deux souche ont été trouvés au niveau de masque a réanima, et au niveau de défibrillateur, les germes isolés sont des *Escherichia coli*, et au niveau de poignet on a des *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*

Et au niveau de sol les souches isolées sont *Mucor* et *Streptococcus pneumoniae*, (Tab 8).

Tableau 8. Répartition de 13 germes responsables d'infection nosocomiale

Germes	Effectif	Fréquence
<i>Escherichia coli</i>	10	23%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	7%
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	5%
<i>Shigella flexneri</i>	4	9%

<i>Salmonella paratyphi A</i>	2	5%
<i>Pseudomonas aeruginosa.</i>	4	9%
<i>Proteus mirabilis</i>	1	2%
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	9%
<i>Micrococcusspp</i>	1	2%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2	5%
<i>Candidasp</i>	3	7%
<i>Aspergillus fumigatus</i>	5	12%
<i>Mucor</i>	2	5%

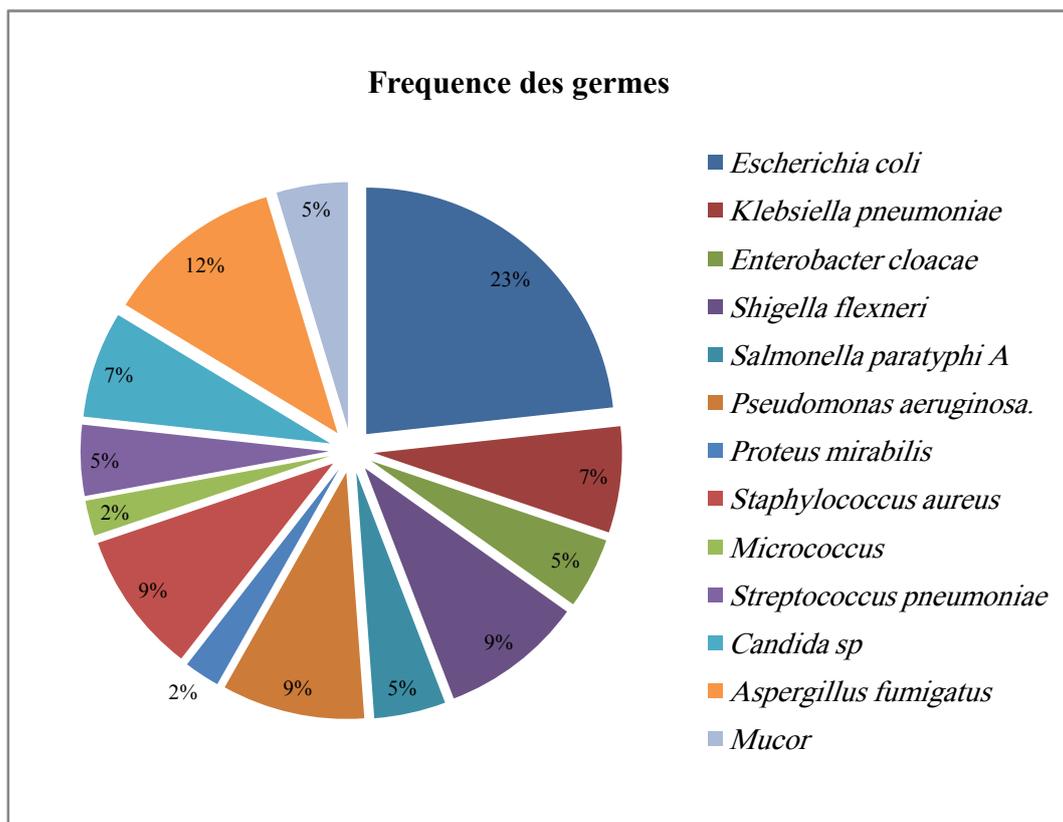


Figure26 fréquence des germes

Interprétation des résultats de la fréquence des germes obtenus

Parmi les 43 souches isolées, après l'identification biochimique, on obtient 13 souches différentes isolées à partir des services de l'hôpital de Hakim Sâadane –Biskra, repartis comme suite (Fig 26).

E. coli occupe la première place avec (23%), au deuxième place c'est *Aspergillus fumigatus* (12%), à la troisième place *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* avec une fréquence de (9 %), ensuite on a les levures de genre *Candida* et les *Klebsiella pneumoniae* avec un pourcentage de (7%), après les *Streptococcus pneumoniae*, les *Salmonella paratyphi A*, les *Enterobacteriaceae* et les champignons de genre *Mucor* présentes avec un pourcentage de (5%), puis les souches *Proteus mirabilis* et les *Micrococcus* ayant un pourcentage de (2%)

- *Escherichia coli* est l'espèce type du genre *Escherichia*, C'est l'espèce dominante de la flore aérobie du tube digestif. *E. coli* ou colibacille est habituellement une bactérie commensale. Elle peut devenir pathogène si les défenses de l'hôte se trouvent affaiblies ou si elle acquiert des facteurs de virulence particulière (Nauciel et Vildé, 2005).
- Au sein des entérobactéries, les bactéries du genre *Klebsiella* se distinguent par leur immobilité constante, leur groupement en diplobacilles généralement encapsulés, Connue autrefois sous le nom de pneumobacille de Friedlander. *Klebsiella pneumoniae* est une bactérie commensale de l'intestin, des voies respiratoires et des animaux (Baerwolf et al., 2002). elle existe à l'état commensal sur la peau et les muqueuses, notamment respiratoires (Sekhri Arafa, 2011). Chez l'homme, elle est l'agent des pneumopathies aiguës, d'angines, d'otites, de cystites et d'affections rénales. *Klebsiella* provoque des infections urinaires (5 % des infections en ville) et des surinfections des bronches chez les bronchitiques chroniques, voire des abcès du poumon (Achmour, 2012).
- Les *Shigelles flexneri*, les bactéries du genre *Shigella*, sont des *Enterobacteriaceae* pathogènes strictes, rencontrées exclusivement chez l'être humain, Les *Shigella* sont des bactéries très proches d'*Escherichia coli*. Les *Shigella* ne font partie d'aucune flore commensale chez l'être humain, elles sont toutes pathogènes et spécifiques du tube digestif ; éliminées par les selles et dispersées dans les sols et les eaux où elles ne survivent que peu de temps (Nauciel et Vildé, 2005).

- Les *salmonelles* forment un genre de protéobactéries appartenant à la famille des entérobactéries. Elles provoquent chez l'espèce humaine des maladies telles que la fièvre typhoïde, la fièvre paratyphoïde et la salmonellose (Nauciel et Vildé, 2005).
- *Enterobacter cloacae* commensale du tube digestif de l'homme et des animaux, pouvant être rencontré dans le sol et les eaux d'égouts. Certaines souches peuvent être responsables d'infections nosocomiales (Lachassinne et al, 2004).
- *Proteus mirabilis* est une bactérie de type bacille à Gram négatif appartenant aux entérobactéries et au genre *Proteus* (Hamdouche et al., 2016).

Elle est commensale du tube digestif des animaux et peut être responsable d'infections essentiellement urinaires et cutanées. Cette bactérie est à l'origine de 90 % de toutes les infections par *Proteus* chez l'être humain. Elle est très présente dans l'eau et les sols (Hamdouche et al., 2016).

P. mirabilis est connu pour provoquer des lithiases rénales. Cette bactérie est uréase positive et produit donc une uréase capable de transformer l'urée en ammoniaque, alcalinisant l'urine. Le pH alcalin va favoriser la précipitation du calcium retrouvé dans l'urine, formant alors des cristaux qui peuvent entraver le bon fonctionnement de l'arbre urinaire (Hamdouche et al., 2016).

- Parmi les bacilles à gram négatif non fermentaires nous avons trouvé les *Pseudomonas aeruginosa* : Le genre *Pseudomonas* est le genre type de la famille *Pseudomonadaceae*. Dans ce genre, *Pseudomonas aeruginosa* représente 80 % des souches isolées ; les autres espèces sont isolées à plus faible fréquence (Flandrois, 1997).
- Il est important de distinguer *S. aureus* des SCN. *S. aureus* a un potentiel de pathogénicité très important et est responsable aussi bien d'infections communautaires que nosocomiales. Par opposition, les SCN sont en règle générale des bactéries opportunistes essentiellement responsables d'infections nosocomiales (Nauciel et Vildé, 2005).
- *Streptococcus pneumoniae*, se colonise au niveau de rhino-pharynx. Sous l'influence de certains facteurs, il pourra devenir pathogène et être responsable d'infections respiratoires : pneumonies (pneumonie franche lobaire aiguë), bronchites, pleurésies, et d'infections ORL : otites, sinusites, mastoïdites (pouvant se compliquer en méningites). La

contamination est interhumaine et se fait par voie respiratoire à partir de porteurs sains ou de personnes malades (Flandrois, 2000).

- *Micrococcus* est un genre de bactéries à coloration Gram positive appartenant à la famille des *Micrococcaceae*, Ce sont des bactéries aérobies, à métabolisme oxydatif, possédant une catalase, *Micrococcus* est généralement considéré comme un organisme saprophyte ou commensal. Il peut cependant être un pathogène opportuniste, notamment chez les patients immunodéprimés (comme les patients infectés par le VIH). Chez ces derniers, les microcoques peuvent être impliqués dans diverses infections, notamment des bactériémies récurrentes, des chocs septiques, de l'arthrite septique, des endocardites ou encore des méningites. Dans de rares cas, la mort d'un patient immunodéprimé peut être due à une infection pulmonaire à *Micrococcus*(Smith et al.,1999).

Si les staphylocoques ou les *klebsielles* que nous avons cités peuvent affecter n'importe quel service hospitalier, certains germes se cantonnent très spécifiquement à certains malades. C'est le cas d'un champignon filamenteux nommé *Aspergillus fumigatus*, première cause d'infection nosocomiale chez les patients atteints de leucémies. Ceux-ci, pour bénéficier d'une allogreffe de moelle osseuse, passent par un état d'immunosuppression profonde et risquent alors d'être infectés par voie aérienne par ce champignon qui se développe dans les poumons puis dans d'autres organes (Institut Pasteur,2011).

Autres champignons responsables d'infections nosocomiales, très répandus, et souvent liés à des procédures invasives (cathéter, sonde urinaire) : les levures *Candida*. Elles sont au 10e rang des maladies liées aux soins, mais la 4e cause de septicémies à l'hôpital, des septicémies fatales dans 40 % des cas, à 30 jours (Institut Pasteur.2011).

D'autres genres ou espèces sont retrouvés moins fréquemment, parmi eux, *Mucor*, *Rhizopus* (Institut Pasteur .2011)

Répartition d' *E coli* selon les services

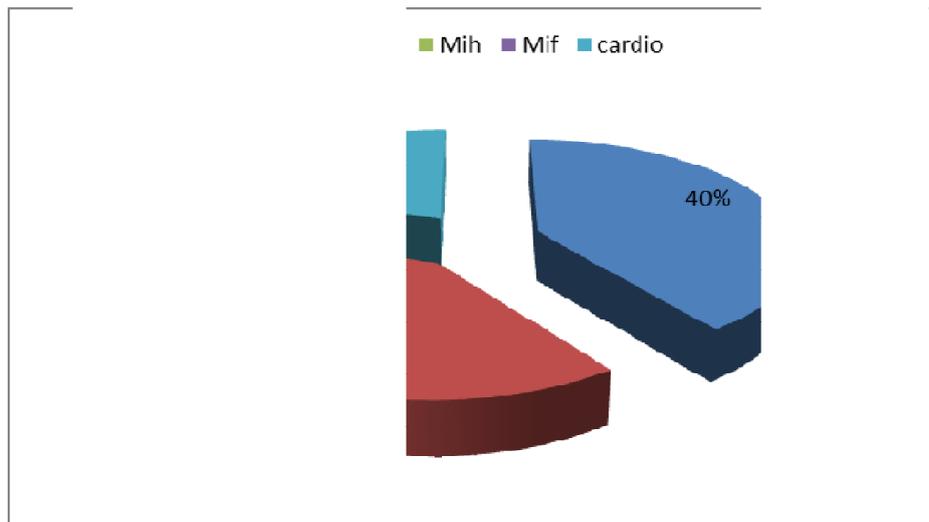


Figure 27 Répartition d' *E coli* selon les services.

La fréquence des infections nosocomiales varie selon les pays, les hôpitaux et les services, et demeure influencée par différents facteurs de risque. La présente étude porte sur l'ensemble des bactéries isolées des prélèvements de surface au niveau de L'hôpital Hakim SâadaneBiskra.

La distribution d'*E coli*, isolée aux différents services révèle (Fig27) qu'elle domine dans les services pédiatrie et néonatalogie avec (40%), la deuxième place avec (20%) dans le service cardiologique, et l'absence totale dans les autres services.

Les infections à *E.coli* sont particulièrement fréquentes chez les malades hospitalisés dans les services : médecine interne (14%), chirurgie générale (11,7%) et la pédiatrie (11,4%). Ces résultats diffèrent de ceux rapportés par (Aissi et al., 2008) qui indiquent des taux plus importants dans ces services. Dans notre étude *E. coli* domine nettement le profil général des bactéries responsables d'infections nosocomiales.

Conclusion

Conclusion

Dans notre étude, nous avons évalué la contamination du milieu hospitalier en réalisant 18 prélèvements au niveau des différents sites dans cinq services distincts (pédiatrie, néonatalogie, médecine interne homme, médecine interne femme et cardiologie) à l'hôpital Hakim Sâadane- Biskra.

A la lumière des résultats obtenus, on peut conclure que les bacilles à Gram négatifs occupent la première place avec une prédominance des entérobactéries majoritairement *E. coli* (23%) L'infection à *E. coli* peut être d'origine endogène après modification de la flore par une antibiothérapie, ou d'origine exogène à partir d'un autre patient ou d'un foyer de l'environnement.

Escherichia coli a été la bactérie la plus fréquemment isolée dans notre étude, elle a été la plus souvent isolé seul ou en association avec d'autres bactéries responsables d'infections nosocomiales. Elle était suivie par *Klebsiellapneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

L'hygiène hospitalière a tout son rôle à jouer dans cette dynamique par la création des comités de lutte contre les infections nosocomiales et la surveillance du bon usage d'antiseptiques appropriés.

C'est cette multi résistance des germes hospitaliers qui doit être à l'heure actuelle le grand défi à relever dans notre milieu hospitalier.

Recommandations

En médecine, le risque zéro n'existe pas. Pour cette raison, il n'est pas toujours possible d'éviter les infections nosocomiales. Il est par contre tout à fait possible d'en limiter la fréquence et la gravité en respectant scrupuleusement quelques règles d'hygiène.

Au terme de cette étude, nous faisons les recommandations suivantes

Respecter strictement les règles d'hygiène Ces règles s'appliquent à trois niveaux :

- l'hygiène des mains du personnel soignant
 - l'asepsie lors des soins
 - la sécurité de l'environnement
- Réduire au strict nécessaire les indications des cathéters

- Établir des programmes de prévention et de surveillance des infections nosocomiales.
- Mettre en place d'un comité de lutte contre les infections nosocomiales à l'Hôpital du Hakim Sâadan".
- Établir des programmes de prévention et de surveillance des infections nosocomiales.
- Équiper le laboratoire de l'Hôpital Hakim Sâadan de matériels nécessaires pour l'identification des germes responsables d'infections nosocomiales tout en évitant les ruptures de stock des réactifs pour le bonheur des malades et du personnel.

Enfin, de point de vue perspective, notre étude montre que l'environnement hospitalier dans la région de Biskra est fréquemment contaminé par les bacilles à Gram négatifs que Cocci à Gram positifs, il serait intéressant de déterminer :

- ❖ La confirmation des résultats obtenus par la galerie API.
- ❖ L'identification des différents types de cocci à Gram+ présents dans l'environnement hospitalier.

Références

Bibliographiques

A

Achkour Z.(2012).Emergence de la résistance aux carbapénemes chez les bacilles à Gram négatif. Thèse de Doctorat en pharmacie. Université Mohammed V- Soussi, Rabat, p.

Infectieuses -006-N-IO,1996,p8.

Ahmed Zine El Abidine Haddadi.2013.Construction d'un score prédictif du risque nosocomialpour des patients de réanimation. p.34-37p.

Amara ImeneKhaldi Zohra. (2015) .Isolement, identification et étude de l'antibiorésistance des souches bactériennes isolées à partir de services de réanimation et d'hémodialyse de CHU Ouargla-Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de master académique-le : 11/06/2015.

Avril J.L., Dabernat H., Denis F., Monteil H. 1992. Bactériologie clinique. Ellipses, Paris, p.511.

Anna Rita C. 2006. Rôle des résidus d'antibiotiques dans les environnements hydriques sur la sélection et la diffusion de bactéries résistantes des genres *Aeromonas*, *Acinetobacter* et *legionella*. Thèse de Doctorat, Université de Genève, 46-47p.

Astragneau P. (1998). Epidémiologie des infections nosocomiales. RevPrat ; 48 : 1525-9.

Avril J.L., P Donnio. (1989). La surveillance des infections nosocomiales. Revue du praticien, 39, (16), 1381, 5.

B

Barnett, H. L. et Hunter, B. B., (1972). Illustred general of imperfect fungi.Burgess PublishingCompany. Minnesota (USA): 3ème edition.

Beaucaire, G. (1997). Infections nosocomiales: Épidémiologie, critères du diagnostic, prévention, principes de traitement. La revue du praticien, 47(2), 201-209

Berche P., Gaillard J.L., Simonet M. 1991. Les IN d'origine bactérienne et leur prévention. Bactériologie des infections humaines de la biologie à la clinique, Paris : Flammarion, p. 64-71,660.

Berche, P., Gallard, J. L., & Simonnet, M. (1988). Les infections nosocomiales d'origine bactérienne et leur prévention. *Bactériologie: les bactéries des infections humaines*. Paris: Flammarion, p 64-74.

Baerwolf S, Geffers C, Behnke M. 2002. Correlation between transmissions and the nosocomial infection rate in five different intensive care units in a German university hospital. SHEA216.

C

Carbonelle B., Denis F., Marmonier A., Pinon G., Vargues. 1990. *Bactériologie médicale*. 3^{ème} tirage, éd SIMERP, Paris, p.113.

Carlet. J, Guibert. J. (1989). Infections urinaires nosocomiales : épidémiologie, dépistage, prévention et conduite à tenir. *Revue du praticien*, 39 (14) : 1386-91.

Coella R et al. The cost of infection in surgical patients: a case study. *J Hosp Infect* 1993; 25:239– 50.

D

Debabza M. 2014. Emergence en milieu hospitalier des bacilles Gram négatifs multirésistants aux antibiotiques : étude bactériologique et moléculaire. Thèse de Doctorat d'état, Université Badji Mokhtar-Annaba, 58-66 p.

Delarras C. 2007. *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire*. Technique et documentation. France. Lavoisier : EM inter, Paris, p .101, 462,276.

Denis F., Martin C., Bingen E., Roland QU., Poly C., Marie. 2007. *Bactériologie médicale : techniques usuelles*. Elsevier Masson, Issy-les Moulineaux, p .9-10,22-26.

Dubos R. (2012). Résistance aux antibiotiques : une impasse thérapeutique ? Implications nationales et internationales .Séance thématique inter-académique; Académie Nationale de Médecine, Académie Nationale de Pharmacie, Académie Vétérinaire de France. Compte rendu mercredi 21 novembre 2012.

DUCEL, G., FABRY, J., NICOLLE, L., 2008. Prévention des infections nosocomiales: Guide pratique. In : *Prévention des infections nosocomiales: guide pratique*.

F

FAGON JY.1998 . Pneumopathies nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*. Med Mal Inf., 1998 ;28 :159-66.

Flandrois JP. 1997. Bactériologie Médicale. Presses universitaires de Lyon, p.309.

G

Guiraud J-P. 2003.Microbiologie alimentaire. Dunod, p .651.

H

Hamza R. (2010). Epidémiologie des infections associées aux soins. Revue Tunisienne d'Infectiologie - Janvier 2010, Vol.4: 1 – 4.

HAMDOUCHE Chaima TABAI Amira . 2016. Proteus mirabilis au niveau CHU Constantine caractérisation biochimique, microbiologique et la mutagénèse.p07.

J

Jarvis WR1, Edwards JR, Culver DH, Hughes JM, Horan T, Emori TG, Banerjee S, Tolson J, Henderson T, Gaynes RP, et al.(1991). Nosocomial infection rates in adult and pediatric intensive care units in the United States. Am. J. Med, 1991, 91 (supp 3. B) 1955- 1915.

L

La Lettre trimestrielle d'informationsde L'INSTITUT PASTEUR, N°72 – Février 2011 p.06.

Lachassinne, E., Letamendia-Richard, E., &Gaudelus, J. (2004). Épidémiologie des infections nosocomiales en néonatalogie. *Archives de pédiatrie*, 11(3), 229-233.

Larpent J-P et Larpent-Gourgau M. 1997. Mémento technique de microbiologie : micro-organismes eucaryotes et procaryotes. Structure. Métabolisme. Systématique. Applications industrielles. Milieux de culture et réactifs. Technique et documentation Lavoisier, p .1039.

Leulmi Z. 2015. Les Proteus incriminés dans les infections communautaires et hospitalières : étude moléculaire de la résistance aux antibiotiques. Thèse de Doctorat, Université des Frères Mentouri, Constantine. p 58.

M

MALLARET MR et OLIVE F. Surveillance épidémiologique des infections de cathéter à chambre implantable. 1996 ; 26 : 752-6.

Fleury, J. (1988, July). Le laboratoire de bactériologie médicale Equipment, techniques de base sécurité. Marchal, N., Bourdon, JL & Bimet, F. (Biologie appliquée). Editions Doin, Paris, 1988. In *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie* (Vol. 139, No. 4, p. 497). Elsevier Masson.

Mchich Anas. (2002). Les infections nosocomiales à propos de 55 cas colligés au Maroc université Cheikh Anta Diop de Dakar - Thèse Doctorat en pharmacie (diplôme d'état) - Sous la direction de Issa Lô, Professeur le 05 juillet 2002 - N° 40

N

Nauciel C et Vildé J-L. 2005. Bactériologie médicale. 2ème édition. Elsevier Masson, Paris, p. 122, 132, 140.

P

P. D., "Candida colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients." ANN. SURG., vol. 8, pp. 751-758, 1994.

B. D. TASSEAU F, "Infections nosocomiales. In : BRUKER Get FASSIN D," *Ellipses eds. Santé publique*, vol. 4, pp. 78-79, 1989.

R

Ruhnke, M. (2006). Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida albicans* yeasts. *Current Drug Targets*, 7(4), 495-504.

S

Said, S. F. (2005). Les infections nosocomiales dans le service de chirurgie B de l'hôpital du point G. Université du Mali: Thèse de Doctorat.

Sekhri Arafâ N. (2011). (Fréquence et marqueurs épidémiologiques de *klebsiellapneumoniae* dans les services à haut risque infectieux au niveau du CHU Benbadis de Constantine. Thèse

deDoctorat en sciences. Université Mentouri de Constantine, Algérie, p.5-70.

Smith K, Neafie R, Yeager J, Skelton H, « *Micrococcus folliculitis* in HIV-1 disease », *Br J Dermatol*, vol. 141, n° 3,61–558 .p ,1999 .

T

TASSEAU F, BARON D. Infections nosocomiales. In: BRÜCKER G ET FASSIN D, eds. Santé publique. Paris : Ellipses, 1989 ; 478-92.

TOURE LAYES. Les infections du site opératoire dans les services de chirurgie générale et pédiatrique du CHU GABRIEL TOURE. Thèse de médecine, Bamako, 2004 ; N°57

Z

Zeroual Zouhair. (2012). profil épidémiologique et bactériologique des infections nosocomiales (à propos d'une Enquête de prévalence des infections nosocomiales du CHU Ibn Sina de Rabat Janvier-2010)- université mohammed V faculté de médecine et de pharmacie –rabat année: 2012- Thèse du Doctorat en pharmacie.

ملخص

الهدف من عملنا هو عزل وتحديد مجموعة من السلالات البكتيرية من العينات المأخوذة على مستوى الخدمات المختلفة (قسم طب الأطفال ، قسم طب حديثي الولادة ، قسم أمراض القلب ، قسم الطب الباطني نساء ، والطب الباطني رجال) في مستشفى حكيم سعدان - بسكرة لتحديد الجراثيم المسؤولة عن الإصابة بالعدوى . من خلال هذه الدراسة ، تم تحديد 43 سلالة بالاعتماد على التحليلات المجهرية و اختبار الخصائص الكيميائية ، يوضح هذا البحث هيمنة بكتيريا الامعاء ، والتي تمثل بشكل رئيسي من خلال الأنواع التالية: *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella paratyphi A*.

من بين الجراثيم التي المتسببة في عدوى المستشفيات تم العثور عليها الفطريات و الخمائر.

الكلمات المفتاحية : بكتيريا الامعاء .عدوى المستشفيات

Résumés

L'objectif de notre travail est d'isoler et d'identifier une collection de souches bactériennes à partir de prélèvements fait au niveau des différents services (pédiatrie, néonatalogie, cardiologie, médecine interne femme et médecine interne homme) à l'hôpital Hakim Sâadane de Biskra afin de déterminer les germes responsables de l'infection nosocomiale. Au terme de cette étude, 43 souches ont été identifiées à partir des analyses microscopiques et la galerie classique, Cette identification montre la dominance des entérobactéries, représentant principalement par les types suivants : *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella paratyphi A*, parmi les germes incriminés dans les infections nosocomiales en plus des bactéries on retrouve aussi les champignons et des levures.

Mot clé : infection nosocomiale, entérobactéries.

Abstract

The main objective of our work is to isolate and identify a collection of bacterial strains from samples taken at the level of the different services (pediatrics, neonatology, cardiology, internal medicine woman and internal medicine man) at the hospital Hakim Sâadane of Biskra to determine the germs responsible for the nosocomial infection. At the end of this study, 43 strains were identified from microscopic analyzes and the classical gallery, This identification shows the dominance of enterobacteria, mainly representing by the following types: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella paratyphi A*, among the germs incriminated in nosocomial infections in addition to bacteria are also found mushrooms and yeasts.

Keyword: nosocomial infection, enterobacteria.