

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'Enseignement Supérieur et
De la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira -Bejaia-

Faculté des Sciences de la Nature et de la vie
Département de Microbiologie
Option : Microbiologie Moléculaire et Médicale



Ref :.....

Mémoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Rescherche des bacilles à Gram négatif
multirésistants aux antibiotiques dans les effluents
hospitaliers**

Présenté par :

**M^{elle} Hammami Nour elhouda
M^{elle} Boulbina Rima**

Soutenu le : **21 Juin 2017**

Devant le jury composé de :

Mr AMIR,	MCA	Président
Mme BELHADI,	MAA	Promotrice
Mlle BOUKTIT,	MAA	Examinatrice

Année universitaire : 2016/2017

Remerciement

✚ A **DIEU** le tout puissant :

Maitre de tous les temps, de tous les mondes et de tous cieux de nous avoir permis de voir le jour de grandir. Puisse **ALLAH** le tout puissant continuer à m'aider car nul ne peut se passer de son aide à lui. Amine.

✚ En premier lieu : nous exprimons notre profonde et respectueuse reconnaissance à notre promotrice Mme **Zenati Karima** pour nous avoir suivi dans nos travaux avec une extrême bienveillance, ses remarques, ses conseils judicieux, sa rigueur et son expérience ont améliorer notre travail et permis sa mise au point définitive.

✚ Aux personnes qui nous ont aidé à l'aboutissement de ce travail :

- **MOUHAMMED Cyf**
- **Sabrina**
- **Sonia**
- **Mme Rahmani**

✚ Notre sincère gratitude va vers tous ceux qui ont prêté mains fortes pour sa réalisation, pour ce qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

Dédicace :

JE DÉDIE CE MODESTE TRAVAIL À :

- ✚ Mes parents à ceux que je dois tout et je ne rendrai jamais assez, m'ont trop aidé, encouragé tout au long de mes études et permis d'entreprendre la formation de sciences infirmières sans eux, je ne serais pas là.
- ✚ Mon frère **RAOUF** que je l'adore beaucoup.
- ✚ Toutes mes amies exceptionnellement: **NOZHA, SANA, NABILA, RAZIKA** et **IMANE** pour m'avoir épaulé moralement tous les jours dans la construction de ce mémoire.
- ✚ Ma chère binôme : **NOUR ELHOUDA**
- ✚ Notre promotrice **ZENATI KARIMA**
- ✚ Le groupe des Microbiologistes Master II et toutes le personnelle de laboratoire de Microbiologie à l'université de Bejaia.

RIMA

Dédicace :

JE DÉDIE CE MÉMOIRE À :

DIEU le tout puissant, le Miséricordieux, le très Miséricordieux, par sa grace j'ai pu mener à terminer ce travail .

PROPHET MUHAMMED, paix et salut sur lui.

Mon très chère père **H. DJAMEL**: Tu est toujours au fond du mon cœur, que DIEU t'épargne mon grand, à ta mémoire que soit cette étude une aumône à votre saine ame , je t'aime Abi.

Ma très chère et tendre mère **B.HAFIDA** : Rien au monde ne pourrait compenser tous les sacrifices que tu as consentis pour notre éducation et notre bien être, que DIEU te protège maman.

Mes grandes mères **H.MEGHNA** et **C.KHDAWEDJ** et à l'esprit de mon grand père **B.AMMAR** et mon chère oncle **A.HAMID**.

Ma grande sœur **MERIEM**, **BOUCHRA** la fleur de la famille et mon petit cœur.

Mon oncle **MÉSSAOUD**, tante **LAMIA** et mes petites sœurs **TASNIM** et **ANSSAM**.

MIMA, son marie et mes poussins : **LOUAY**, **YAHIA** et **YAAKOUB**.

Mon oncle **A.AZIZ**, Khalouta **FADILA**, Khalouta **AHLAM** , **ZIZOU**, **ISRAA**, **NIBRAS** et **LINA**

Ma chère tante **HABIBA** Ma tante **MAISSA**, ma sœur **MERIOUMA** et mes frères **ILIAS** et **SAMIR**.

Ma tante **WAFI**, tonton méssaoud et mon frère **AYOUB**.

Mes amies: **KHADIJA** , **HANANE**, **ROSSANA**, **RANIA**, **RIMA** , **NONA**, **SIM**, **SELMA**, **SARA** **NOUZHA**, **TAHANI** et spécialement à tous mes collègues, les mélviennes et les jijeliennes.

Ma binome : **MELLE. BOULBINA RIMA**, j'ai l'honneur de présenter aujourd'hui notre travail de fin d'étude, vous êtes la plus adorable amie au monde.

* **HAMMAMI NOURELHOUDA** *

ADN : Acide désoxyrebonucleique.

AK : Amékacine.

AMC : Amoxicilline + acide clavulanic.

Ampc : Chromosomal located cephalosporinase.

ATB : Antibiotique.

ATM : Aztréonam.

BGN : Bacille à Gram Négatif.

BLSE : Bétalactamase à spectre étendu.

C2G : Céphalosporine de 2^{ème} génération.

C3G : Céphalosporine de 3^{ème} génération.

CASFM : Communié de l'Antibiogramme de la société Française de Microbiologie.

CAZ : Ceftazidime.

CIM : Carbapénèm Inactivation Méthode.

Cloxa : Cloxacilline.

CTX : Céfotaxime.

DD-test : test de double disk.

E.P.E.I : Eau Peptoné Exempte Indole.

ETP : Ertapénème.

EUCAST : European Committee Of Antimicrobial Susceptibility Testing.

H2S : Thiosulfate de Sodium.

I : Intermédiaire.

IPM : Imipénème.

KPC : *Klebsiella pneumoniae* Carbapénémase.

MBL : Métallo β -lactamase.

MEM : Méropénème.

MH : Muller Hinton.

NR : Nitrate Réductase.

Liste des abréviations

OXA : Oxacillinase.

R : Résistant.

RM : Rouge de méthyle.

S : Sensible.

TSI : Three Sugar Iron.

URE : Urée.

VP : Réactif de Voges-proskauer.

Figure 1 : Répartition des BGN isolées.....	13
Figure 2 : Répartition des BGN isolées par espèce.....	14
Figure 3 : Taux de résistance des BGN fermentaires aux β -lactamines.....	15
Figure 4 : Taux de résistance de BGN non fermentaires aux β -lactamines.....	16
Figure 5 : Taux de résistance des BGN aux différents antibiotiques.....	16
Figure 6 : Résultats de test de synergie.....	17
Figure 7 : Souche productrice d'une AmpC.....	18

Tableau I : Sites de prélèvements.....	6
Tableau II : Tests d'identification biochimiques.....	8
Tableau III : Liste des antibiotiques testés.....	9
Tableau IV : Répartition des souches par sites de prélèvement	12
Tableau V : Phénotypes de résistance probables.....	19

Liste des tableaux en annexe

Tableau I : Aspect des colonies sur milieu Chromagar orientation.....	Annexe I
Tableau II : Caractères biochimiques des souches isolées.....	Annexe II
Tableau III : Diamètres critiques des zones d'inhibition édités par EUCAST 2013 et 2016	Annexe II
Tableau IV : Profil de résistance des entérobactéries aux β lactamines.....	Annexe IV
Tableau V : Profil de résistance des souches non fermentaires aux β -lactamines	Annexe IV
Tableau VI : Profil de résistance des entérobactéries aux autres familles	Annexe IV
Tableau VII : Profil de résistance des non fermentaires aux autres familles.....	Annexe IV
Tableau VIII : Résultats test CIM.....	Annexe V

Sommaire

Introduction générale	1
Materiel et méthodes	
I- Méthode de prélèvement.....	7
II- Isolement et purification	7
III- Identification	7
IV- Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques.....	9
V- Recherche des phénotypes de résistance aux β -lactamines.....	10
Résultats	
I- Répartition des souches par site de prélèvement.....	12
II- Répartition des souches par espèce.....	13
III- Sensibilité des souches de bacilles à Gram négatif aux antibiotiques	14
IV-Phénotypes de résistances probables aux β -lactamines.....	17
Discussion.....	20
Conclusion.....	25

Introduction

Les hôpitaux ont une demande en eau potable importante ; en effet, alors qu'en milieu domestique la consommation est de 150 à 200 L par habitant et par jour, la valeur moyenne passe de 400 à 1200 L dans les hôpitaux (**Darsy et al., 2002; Emmanuel, 2004**). A côté de cette demande élevée d'eau potable, se rajoutent des besoins en eaux spécifiques telles que l'eau physiologique ou stérilisée et les sérums. Cette importante consommation en eau des hôpitaux donne naissance à de grands volumes de rejets liquides chargés de microorganismes pathogènes, de radioéléments et de substances chimiques dont certaines peuvent avoir un caractère peu biodégradable (**Leprat, 1998 ; Emmanuel, 2004**).

Les activités de services médicaux, vaccinations, recherches médicales incluant par exemple les essais diagnostiques, traitements médicaux et examens de laboratoire, protègent, rétablissent la santé et sauvent des vies (**OMS, 2000**). La réalisation de ces services et la production de ses biens nécessite la mobilisation de ressources naturelles. Comme c'est le cas pour toutes les activités qui mettent en œuvre de la matière, celles relevant du domaine de la santé sont également génératrices de pollution et de transfert vers les milieux naturels sous forme d'eaux usées, des effluents gazeux et des déchets solides (**Emmanuel, 2004**).

Les effluents liquides hospitaliers se classifient en trois types selon leur réseau d'évacuation. En retrouve les rejets de nature domestique ; il s'agit des eaux destinés exclusivement à satisfaire les besoins des personnes physiques. Dans cette catégorie, on trouve : les rejets des cuisines, les rejets des produits détergents, les rejets des garages et ateliers, ceux de la blanchisserie, de la chaufferie et de la climatisation. Les eaux grasses rejetées en cuisine ne posent pas de risque sanitaire mais peuvent provoquer un colmatage des réseaux et engendrer un développement bactérien (**Jehannin, 1999**).

Ensuite, le deuxième type est celui des rejets de nature spécifique à l'hôpital, Ces rejets spécifiques communs aux différents services de soins sont les produits désinfectants et antiseptiques, les médicaments et les métaux lourds (mercure, argent). En ce qui concerne les désinfectants et les antiseptiques, ils sont utilisés en masse pour la désinfection des surfaces et celle du matériel médico-chirurgical. Les produits les plus utilisés sont principalement des dérivés chlorés, les produits contenant des aldéhydes et de la bétadine. L'hôpital rejette également des germes pathogènes issus des personnes malades (Staphylocoques, Streptocoques, *Pseudomonas aeruginosa*...) qui peuvent se retrouver dans les eaux vannes en ayant développé une résistance aux antibiotiques. En effet, les rejets médicamenteux (analgésiques, antibiotiques...) émis après métabolisation par les patients représentent une

quantité importante. A ces rejets s'ajoutent aussi ceux des métaux lourds tels que le mercure et l'argent issus du service de radiologie (**Jehannin, 1999**).

Arrivent en dernier les rejets spécifiques à certains soins ; ce sont les eaux médico-techniques qui sont le résultat de l'utilisation des produits toxiques dans certains services cliniques. C'est le cas de l'hémodialyse (épuration de sang) qui rejette non seulement des toxines, mais également des produits chimiques (formol, eau de Javel...), conséquence de la désinfection de l'appareil, comme le cas de laboratoire et de la pharmacie (**Jehannin, 1999**).

Pour bien appréhender la qualité microbienne d'un effluent hospitalier, il faut connaître les germes présents dans l'environnement de l'établissement. La flore hospitalière est composée de la flore des malades (ou porteurs en incubation, ou convalescents), du personnel soignant, des visiteurs et des germes de l'environnement existant sur les sols, les surfaces, le matériels, l'eau et l'air (**Darsy et al., 2002**).

Les travaux réalisés sur la microbiologie des effluents hospitaliers mettent en évidence de façon systématique la présence de germes ayant acquis des caractères de résistance aux antibiotiques (**Leprat, 1998**). Une flore bactérienne totale de 3.10^5 germes/ml est trouvée dans ces rejets (**Leprat, 1998 ; Bernet et al, 2000 ; Mansotte et Jestin, 2000**). La consommation élevée en eau des centres hospitaliers assure une dilution importante des charges organiques et inorganiques des effluents le long du trajet allant des différents blocs générateurs des déchets bactériologiques jusqu'au collecteur principal (**Ameziane, 2012**).

Dans les établissements de santé, la consommation moyenne en antibiotiques d'un patient hospitalisé est de l'ordre de 10 fois supérieure à la consommation moyenne en ville. Les concentrations en antibiotiques et en bactéries multirésistantes aux antibiotiques dans les effluents hospitaliers sont donc potentiellement bien plus élevées que dans les effluents domestiques. La fraction non métabolisée des antibiotiques consommés est excrétée via l'urine et les fèces et aboutit dans les eaux usées. De même, les antibiotiques exercent une pression de sélection sur la flore intestinale et favorisent les bactéries résistantes, qui se retrouvent dans les eaux usées sous forme de bactéries fécales résistantes (**Passerat et al., 2009**). Des concentrations sub-thérapeutiques peuvent être retrouvées dans les eaux usées hospitalières ce qui maintient la pression de sélection (**Kümmerer et Henninger, 2003**).

Certaines bactéries ont été identifiées comme étant plus concentrées dans les eaux hospitalières: *Pseudomonas aeruginosa* (plus de 10 fois supérieur dans les effluents

hospitaliers) et des staphylocoques (**Schlosser, 1999**). Une étude en Inde a montré que les effluents hospitaliers contiennent une grande quantité d'entérobactéries multirésistantes aux antibiotiques (**Chitnis et al., 2004**).

Les résultats des travaux de Servais (**2009**) ont montrés que 72% de bactéries isolées des eaux usées hospitalières sont résistantes à au moins un antibiotique et 65% de ces bactéries sont multirésistantes. Cette résistance est probablement due aux différents mécanismes tel que : le pompage de l'antibiotique à l'extérieur de la cellule à l'aide des pompes à efflux, modification de la cible de l'antibiotique, diminution de la perméabilité membranaire par réduction du nombre des porines (**Gallini et al., 1995**).

Plusieurs mécanismes sont à la base de la multirésistance des bacilles à Gram négatif aux β -lactamines dont l'inactivation enzymatique reste le mécanisme prépondérant et en particulier la production de β -lactamases, ces enzymes altèrent chimiquement les β -lactamines et les rendent ainsi inactifs en hydrolysant l'anneau β -lactame (**Philippon et al., 2002 ; Jacoby et Munoz-Price, 2005**).

Parmi les β -lactamases, on distingue 4 classes selon le schéma d'Ambler A, B, C et D. Les enzymes de classe A, C et D sont dites à sérine active tandis que celles de classe B sont appelées métallo- β -lactamases.(carbapénèmases). A l'exception des BLSE de type OXA (classe D), les BLSE sont des β -lactamases de classe A (comme TEM1/2 et SHV-1), et selon la classification de Bush-Jacoby- Medeiros, les BLSE font aussi partie du groupe 2be, c'est-à-dire qu'elles sont capables d'hydrolyser les pénicillines, les céphalosporines de 1ère, 2ème, 3ème, 4ème génération et les monobactames. Par contre, les souches productrices de BLSE restent généralement sensibles aux céphamycines et aux carbapénèmes aussi inhibées par les inhibiteurs de β -lactamases (IBL) comme l'acide clavulanique (**Cattoir, 2008**).

Les β -lactamases à spectre élargi (BLSE) sont une grande famille très hétérogène d'enzymes bactériennes. Elles sont induites soit par des plasmides, soit par la mutation du génome naturel chez *Klebsiella sp*, codant pour une β -lactamase SHV. Les deux mécanismes confèrent aux bactéries touchées la capacité d'hydrolyser une grande variété de pénicillines et de céphalosporines (**Vora et al., 2009**).

La distinction de différents types de BLSE (TEM (*Temoneria*), SHV (*sulphydral variable*) et CTX-M (*Cephotaxime Munich*)) permet une analyse détaillée de la propagation épidémiologique. Ces différents enzymes appartiennent aux β -talactamases de classe A et sont

habituellement détectées par une synergie entre une céphalosporine de troisième génération et l'acide clavulanique (aspect en «bouchon de champagne» sur un antibiogramme) (**Cherkaoui et al., 2014**)

L'émergence de la résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif constitue un véritable défi en cela qu'elle conduit à des impasses thérapeutiques. Cette résistance peut être due à des mécanismes chromosomiques (altération de la porine OprD chez *Pseudomonas aeruginosa*), à l'association de mécanismes de résistances (β -lactamase à spectre étendu (BLSE) et/ou céphalosporinase associée à une perte de la perméabilité membranaire chez les entérobactéries) ou à la production d'enzymes hydrolysant les carbapénèmes (**Grall et al., 2011**).

En Algérie la résistance aux antibiotiques indique une situation inquiétante, notamment dans le nord du pays. En effet, ces dix dernières années **Baba Ahmed-Kazi Tani** et ses collaborateurs ont rapporté une importante augmentation de la résistance aux antibiotiques, en particulier chez les bacilles à Gram négatif (**Baba Ahmed-Kazi Tani et al., 2014**).

L'isolement de souches d'entérobactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48 a été rapporté chez des patients hospitalisés à l'hôpital militaire à Constantine (**Agabou et al., 2014**), puis chez d'autres souches de *K. pneumoniae* et *E. cloacae* isolées de l'environnement hospitalier à l'hôpital de Guelma (**Bouguenoun et al., 2016**). Des souches d'*Acinetobacter baumannii* d'origine clinique et environnementale ont été isolées également, qui présentent les gènes bla_{OXA-23} et bla_{NDM-1} (**Bakour et al., 2012 ; Mesli et al., 2013 ; Zenati et al., 2016**).

Nous avons donc décidé d'étudier la contamination par des bacilles à Gram négatif résistant aux carbapénèmes dans différents types de rejets hospitalier (rejets domestiques, rejets spécifiques à l'hôpital et rejets spécifiques à certains soins) de manière à mettre en évidence leurs multirésistances et de caractériser leurs phénotypes de résistance aux antibiotiques.

Afin de développer ces aspects, nous avons adopté la méthodologie suivante :

- ✓ Prélèvements des eaux usées de deux hôpitaux (hôpital de Jijel, hôpital de Mila).
- ✓ Isolement et purification des bactéries à Gram négatif.
- ✓ Identification des souches.
- ✓ Etude de la sensibilité des souches isolées aux antibiotiques.

- ✓ Détermination des phénotypes de résistance probables aux antibiotiques.

Matériel et méthodes

Notre étude s'est déroulée durant la période allant de 15 Février à 10 Mai au sein du laboratoire de Microbiologie de l'Université A. Mira de Bejaia. Des prélèvements de différents types d'effluents hospitaliers, ont été effectués au niveau de deux hôpitaux de l'est Algérien, hôpital de Jijel et hôpital de Mila (**Tableau I**).

Tableau I : Sites de prélèvements.

Type d'effluent	Site de prélèvement	Type de prélèvement	Nombre de prélèvement par hôpital		Date
			Mila	Jijel	
Rejets de nature domestique	Regard principal collecteur des eaux usées salles de bain	Eaux accumulées dans le bassin	02 Mila	02 Jijel	20/02/17
Rejets de nature spécifique à l'hôpital	Regard collecteur des services cliniques coté homme	Eaux accumulées dans le bassin	02 Mila		09/04/17
	Regard collecteur des services cliniques coté femme	Eaux accumulées dans le bassin	01 Mila		09/04/17
	Regard service urgence	Eaux accumulées dans le bassin	01 Mila		09/04/17
Rejets spécifiques aux soins	Service hémodialyse	Machine de dialyse : 4 ^{ème} heure de dialyse	01 Mila	01 Jijel	13/03/17
		Machine de dialyse : 31 ^{ème} minute de la désinfection 72°C.	01 Mila		13/03/17
		Station de purification	01 Jijel		13/03/17
	Service maternité	Eaux usées lavabo	02 Mila		02/04/17
	Service gynécologie : salle de curetage	Eaux usées lavabo	01 Mila		02/04/17
	Service stérilisât : • Chirurgie générale • Chirurgie gynécologie	Lavabo de stérilisation	02 Mila		09/04/17
	Bloc opératoire	Collecteur liquide d'aspiration	01 Mila		02/04/17
TOTAL : 18					

I- Méthode de prélèvement

Les prélèvements au niveau du réseau d'assainissement ont été effectués dans la période où l'activité est accentuée, vers 11h du matin, appelé temps chaud ; à cette période tous les services de soins réalisent le nettoyage des appareils, toilettes des patients et la quantité d'eau rejeté et très élevée.

D'une manière stérile, on introduit un flacon en verre de 200 ml stérile dans les eaux usées, pour la machine de dialyse nous avons prélevés aseptiquement des échantillons d'eaux usées de la dialyse directement après le dialyseur en débranchant le raccordement d'effluent, après avoir laissé le liquide de dialyse circuler pendant 60s ; nous avons récolter le liquide et remplir le flacon en laissant un volume d'air suffisant pour permettre une agitation correcte avant l'analyse. L'ouverture et la fermeture du flacon a été faite à l'intérieur pour éviter toute contamination extérieur. Les échantillons d'eaux usées prélevées étiquetés (date et site de prélèvement) ont été transportés immédiatement dans une glacière, au laboratoire de Microbiologie.

II- Isolement et purification

Nous avonsensemencé 50 ml d'eau à analyser de chaque échantillon, dans 50 ml de bouillon nutritif. Les flacons ont été incubés pendant 24h à 48h à 37°C. A partir des bouillons d'enrichissement positifs nous avonsensemencé une gélose Mac Conkey auquel nous avons additionné deux antibiotiques ; Ertapénème à raison de 0,5 µg/ml pour la sélection des bacilles à Gram négatif résistantes aux Carbapénèmes et de la Vancomycine à raison de 32 µg/ml pour l'élimination des Gram positifs.

Après 24 d'incubation à 37°C, les colonies ont fait l'objet d'un repiquage successif sur le même milieu d'isolement jusqu'à l'obtention d'une souche pure.

III- Identification

L'identification basée sur la base des :

- Caractères cultureux (taille, forme et aspect des colonies)
- Coloration de Gram.
- Aspect des colonies sur milieu chromogène orientation (**Annexe I**).
- Mini galerie biochimique classique (**Annexe II** et **Tableau II**).

Tableau II : Tests d'identification biochimiques.

Tests/ milieux	Principe	Lecture
Fermentation des sucres, sur milieu TSI	Ensemencement à partir d'une suspension bactérienne de la pente par stries serrés puis le culot par piqure centrale. Incubation à 37°C/24h.	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Virage au jaune du culot : fermentation de glucose (+). ➤ Virage au jaune de la pente : fermentation de lactose (+). ➤ Apparition de bulle d'air : production de gaz. ➤ Noircissement du milieu : production d'H₂S.
Utilisation de citrate comme seule source de carbone sur milieu citrate de Simmons.	Ensemencement par stries serrés de la pente. Incubation à 37°C/24h à 7 jours.	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Un virage au bleu indique un test positif.
Recherche du nitrate Réductase sur milieu bouillon nitraté.	Ensemencement du bouillon à partir de la suspension. Incubation à 37°C/24h.	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Après l'ajout de NRI et NRII : coloration rouge nitrate réductase (+). ➤ Nitrate réductase (-) ajout poudre de zinc : coloration rouge (-), absence de coloration (+).
Production de l'indole sur milieu eau peptonée exempte d'indole.	Ensemencement du milieu à partir de culture solide. Incubation à 37°C/24h.	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Addition du réactif de Kovacs : l'apparition d'un anneau rouge indole (+).
Recherche d'une uréase sur milieu urée-indole.	Ensemencement du milieu à partir de culture solide. Incubation à 37°C/24h.	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Virage du milieu au rouge/rose : uréase (+).
Etude du types fermentaires sur milieu Clark et Lubs.	Ensemencement du milieu par quelque goutte de la suspension bactérienne. Incubation à 37°C/24h.	<p>On divise le contenu de tube en deux :</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Ajout de réactifs VPI puis VP II dans le premier tube, virage au rouge : VP(+). ➤ Ajout de rouge de méthyle (RM), coloration rouge : RM (+).

IV- Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques

1- Préparation de l'inoculum et ensemencement

A partir d'une culture pure de 18H à 24H, on prélève 4 à 5 colonies qu'on dissocie dans 5 ml d'eau physiologique, bien homogénéiser la suspension bactérienne, la charge de l'inoculum doit être équivalente au standard Mc Ferland (correspondant à environ 10^8 UFC/ml).

Les boîtes de Pétri préalablement coulées avec du milieu Mueller Hinton, sont ensemencées par écouvillonnage. Par la suite les disques d'antibiotiques sont déposés à l'aide d'une pince stérile, les antibiotiques testés sont résumés dans le tableau ci-dessous. Les boîtes sont incubées pendant 24h à 37°C.

Tableau III : Liste des antibiotiques testés.

Famille		Antibiotique	Symbole	Charge (µg)	Marque
Aminopénicillines		Amoxicilline+ acide clavulanique	AMC	30	Bioanalyse
Céphalosporines	C3G	Céftazidime	CAZ	30	HIMEDIA
		Céfotaxime	CTX	30	Cypress Diagnostic
	C2G	Céfoxitine	FOX	30	Bioanalyse
Carbapénèmes		Imipénème	IMP	10	Cypress Diagnostic
		Méropénème	MEM	10	Cypress Diagnostic
		Ertapénème	ETP	10	OXOID
Monobactames		Aztréoname	ATM	30	Cypress Diagnostic
Aminosides		Tobramicine	TOB	10	Cypress Diagnostic
		Amikacine	AK	30	Bioanalyse
Fluoroquinolones		Ciprofloxacine	CIP	5	Cypress Diagnostic
Polymixines		Colistine	CT	50	OXOID

2- Lecture

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés avec un pied à coulisse. L'interprétation en sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R) a été faite selon les critères définis par l'EUCAST 2016 et le CA-SFM 2013 (Annex III).

V- Recherche des phénotypes de résistance aux β -lactamines

➤ V-1- Recherche de la production de β -lactamases à spectre étendu

- DD-test (test de synergie)

La production d'une β -lactamase à spectre élargie (BLSE) est détectée par le test de synergie qui consiste à placer les disques de céphalosporines de 3^{ème} génération (Céftazidime et Céfotaxime) et d'un monobactames (Aztréoname) à une distance de 20mm (centre à centre) d'un disque d'Augmentin (Amoxicilline/ Acide clavulanique). L'augmentation de la zone d'inhibition entre le disque d'AMC et les disques de CAZ, CTX et/ou ATM indique la production d'une BLSE (Jarlier et *al.*, 1988).

- DD-test à la cloxacilline

Ce test est effectué pour identifier une BLSE associée à une céphalosporinase déréprimée, La cloxacilline (0,25 mg/ml) ajoutée au milieu Mueller-Hinton inhibe très fortement toutes les cephalosporinases de la classe C d'Amblar. Si un tel mécanisme de résistance est présent, on constate, en comparant les boites de Pétri contenant le milieu Muëller-Hinton avec et sans cloxacilline, une restauration de l'activité des β -lactamases et apparition de l'image de synergie en bouchon de champagne recherchée (EUCAST, 2016).

➤ V-2- Recherche de la production de Carbapénèmases

- Test CIM (Carbapénème Inactivation Méthode)

Pour effectuer le test CIM, une suspension a été effectuée en suspendant une boucle de culture dans 500 μ l d'eau physiologique d'un témoin positif (souche productrice de NDM-1), un témoin négatif (E. coli ATCC 29522) et les souches à testé qui sont incubés en présence d'un disque de Méropénème pendant 2h.

Après incubation, les disques de Méropénème correspondants au témoin positif, témoin négatif et aux souches à testé sont retiré de la suspension, puis déposés sur une gélose MH préalablementensemencée par la souche E. coli sensible. Les boites sont incubées à 37°C/24h.

Si l'isolât bactérien produit une Carbapénémase, le Méropénème dans le disque sera dégradé, ce qui permettra la croissance de la souche *E. coli* sensible (**Zwaluw et al., 2015**).

La lecture est faite en mesurant les diamètres des zones d'inhibition et l'interprétation en S, R ou I est réalisée selon les recommandations de **l'EUCAST 2016**, les résultats sont résumés dans l'annexe V.

Résultats

I- Répartition des souches par site de prélèvement

Au cours de cette étude, 18 échantillons d'effluents hospitaliers ont été prélevés au niveau de deux hôpitaux de l'est de l'Algérie.

La recherche des BGN sur milieu sélectif additionné de Carbapénème a permis de sélectionner 31 souches, le tableau ci-dessous montre la répartition des souches par site de prélèvement (**Tableau VI**).

Tableau VI- Répartition des souches par sites de prélèvement.

Type d'effluent	Site de prélèvement	Hôpital	Nombre de souche	Total
Rejets de nature domestique	Regard principal collecteur des eaux usées salles de bain de tous les services cliniques	Mila	4	11
		Jijel	7	
Rejets de nature spécifiques à l'hôpital	Regard collecteur des services cliniques hommes	Mila	2	6
	Regard collecteur des services cliniques femmes	Mila	2	
	Regard service urgence	Mila	2	
Rejets spécifiques aux soins	Service hémodialyse	Mila	4	14
		Jijel	4	
	Service maternité	Mila	1	
	Service génécologie : eaux usées salle de curetage.	Mila	1	
	Service stérilisât : <ul style="list-style-type: none"> • Chirurgie générale. • Chirurgie génécologie 	Mila	3	
	Bloc opératoire	Mila	1	

II- Répartition des souches par espèce

L'identification des souches isolées sur la base des caractères cultureux, de la galerie biochimique classique et sur Chromagar orientation a permis de caractériser 31 souches de BGN, dont 16/31 souches sont des bacilles à Gram négatif non fermentaires et 15/31 souches sont des entérobactéries (**Figure 1**).

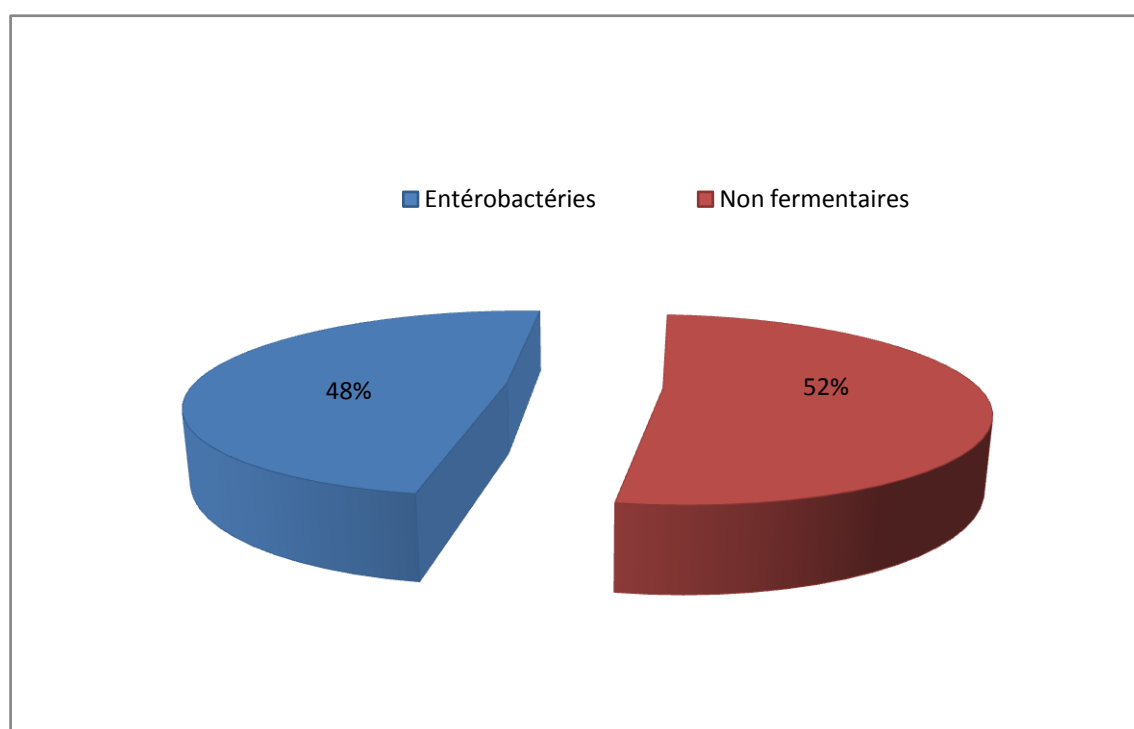


Figure 1 : Répartition des souches par famille.

La figure 2 montre que parmi la totalité des souches identifiées (31), l'espèce la plus isolée est *Pseudomonas sp* (14/31). Suivi d'*E. Coli* (05/31). Les autres souches d'entérobactéries présentent un taux faible.

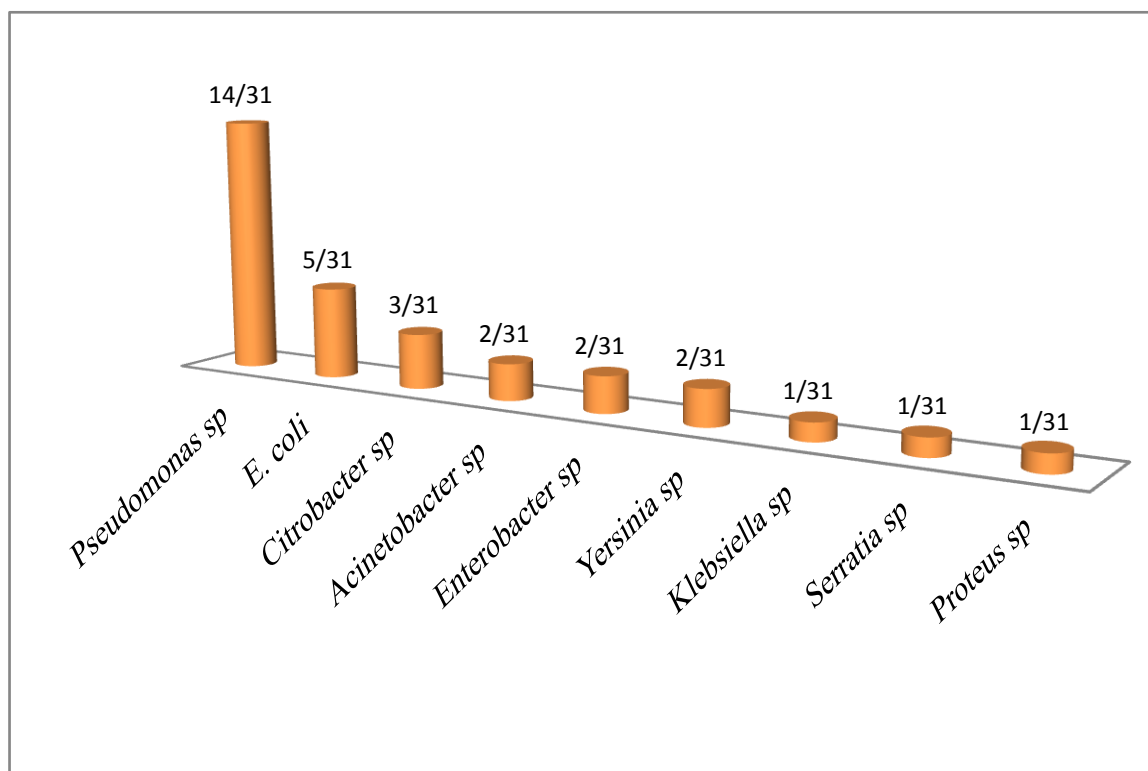


Figure 2 : Répartition des souches isolées par espèce.

III- Sensibilité des souches de bacilles à Gram négatif aux antibiotiques

III-1- Sensibilité des entérobactéries aux β -lactamines

L'ensemble des 15 souches fermentaires isolées de différents prélèvements ont été testées vis-à-vis de 08 β -lactamines : Amoxicilline+acide clavulanique, Céfotaxime, Céfotaxime, Imipénème, Méropénème, Ertapénème, Céfoxitine et l'Aztréonam. Les résultats sont indiqués dans l'annexe IV (**Tableau IV**).

La figure 3 illustre les taux de résistance des souches d'entérobactéries étudiées vis-à-vis des β -lactamines. La quasi-totalité des souches (13/31) est résistante à l'ETP et CAZ, une résistance au carbapénèmes est remarquée également pour les molécules de Méropénème et Imipénème avec 09 souches et 04 souches respectivement.

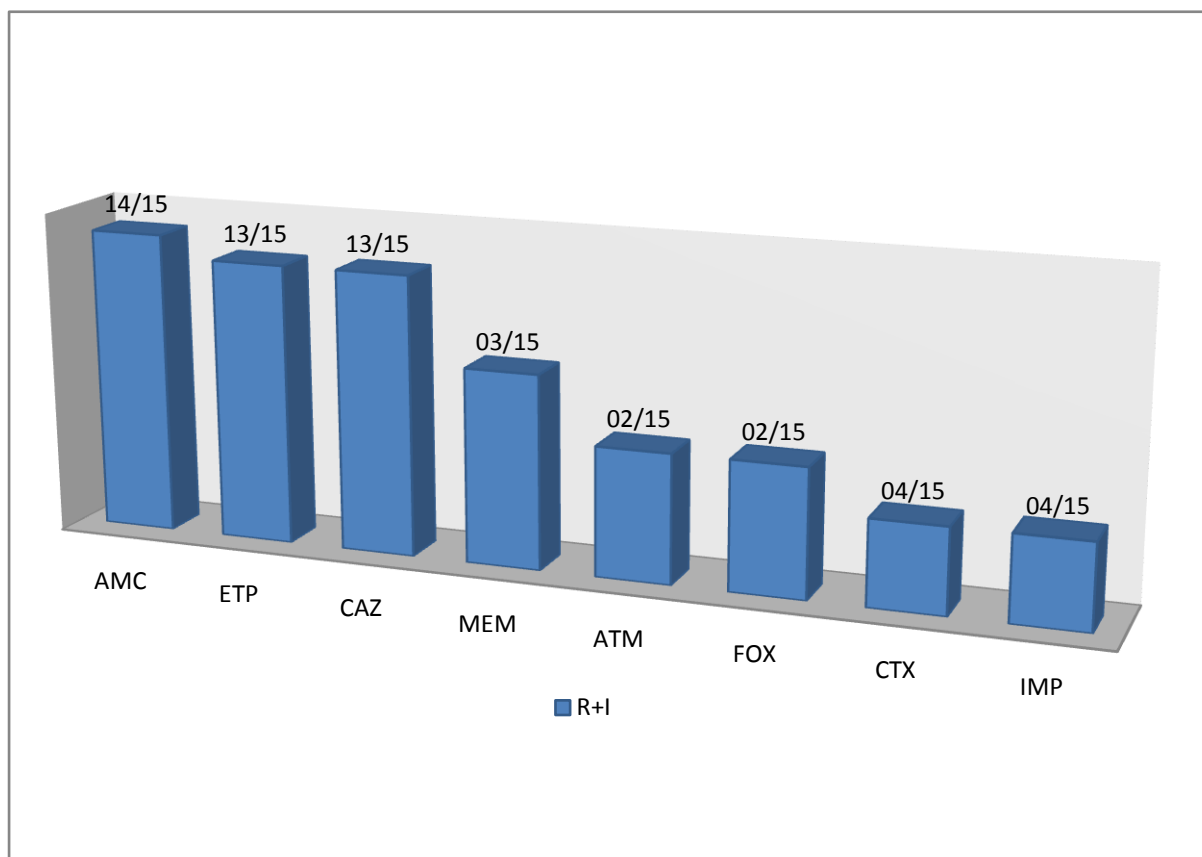


Figure 3 : Taux de résistance des BGN fermentaires isolées aux β -lactamines.

III-2- Sensibilité des BGN non fermentaires aux β -lactamines :

L'ensemble des 16 souches non fermentaires isolées de différents prélèvements ont été testées vis-à-vis de 04 β -lactamines : Aztréonam, Céftazidim, Méropénème et l'Imipénème. Les résultats sont indiqués dans l'annex IV (**Tableau V**).

La figure 4 montre les taux de résistance des BGN non fermentaires vis-à-vis des β -lactamines. La totalité des souches testées est résistante à l'ATM. La résistance au CAZ et MEM est observée avec un taux plus ou moins important chez (10/16) souches et (07/16) souches respectivement. Une résistance réduite à l'IMP est observée chez 04 souches.

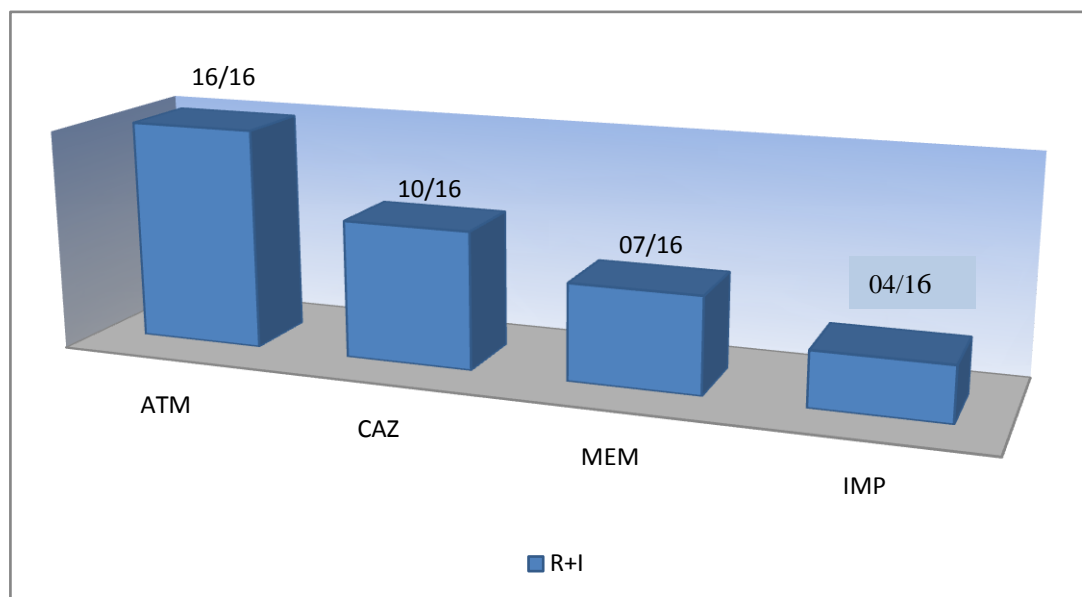


Figure 4 : Taux de résistance de BGN non fermentaires aux β -lactamines.

III-3- Sensibilité des souches BGN aux autres familles d'antibiotiques :

L'ensemble des BGN ont été testées vis-à-vis de 04 familles d'antibiotiques autres que les β -lactamines : Aminosides (Tobramicine et Amikacine), Polymixines (Colisistine) et Fluoroquinolones (Ciprofloxacine). Les résultats des antibiogrammes sont donnés dans l'annexe IV (Tableaux VI et VII).

Les taux de résistance des souches isolées à ces antibiotiques sont illustrés dans cette figure.

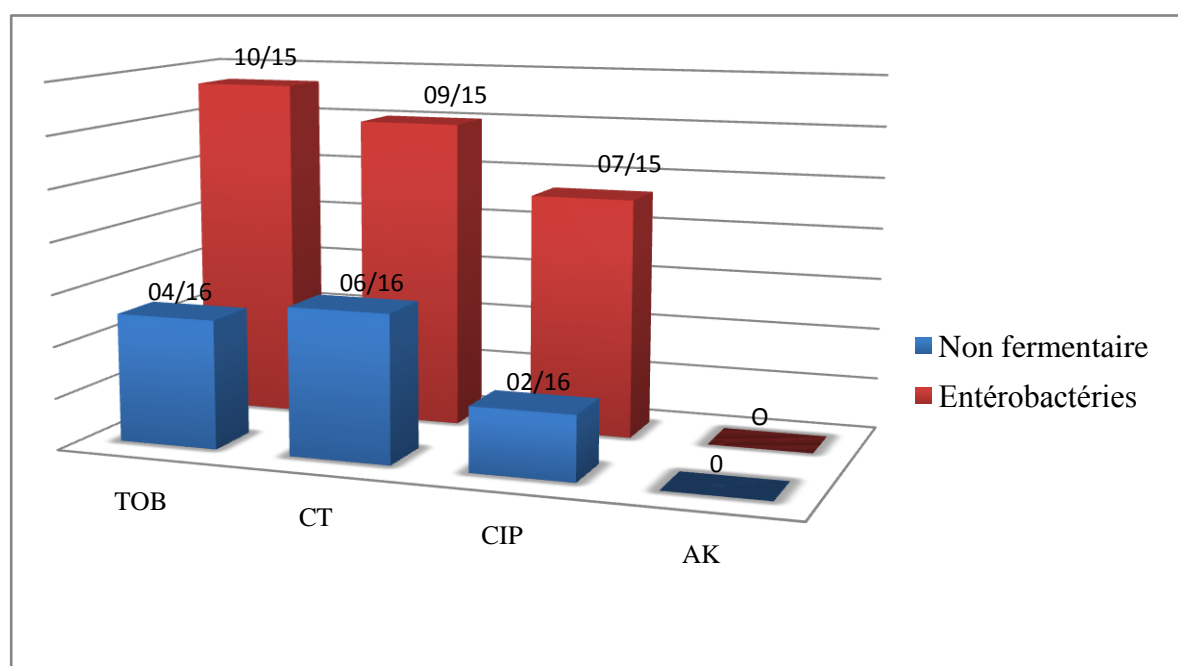


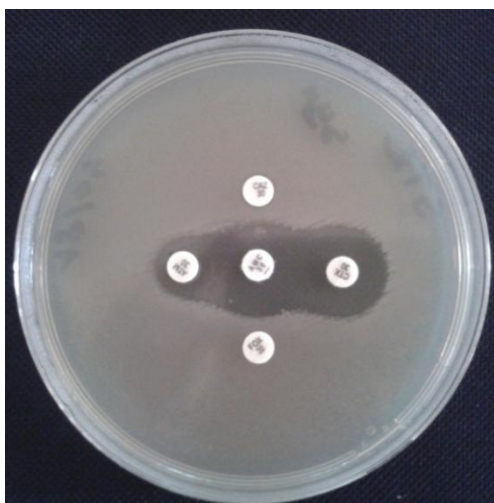
Figure 5: Taux de résistance des BGN aux différents antibiotiques.

D'après la figure ci-dessus, une résistance modérée est observée chez les souches d'entérobactéries vis-à-vis d'autres familles d'antibiotiques : TOB, CT, CIP. L'AK reste l'antibiotique le plus actif contre ces souches. Chez les souches BGN non fermentaires des taux plus faible sont rapportés vis-à-vis de ces molécules comparés aux entérobactéries.

IV-Phénotypes de résistances probables aux β -lactamines

IV-1-Recherche des β -lactamases à spectre étendu (BLSE)

Les résultats du test de synergie réalisé sur les souches d'entérobactéries, ont révélé la production d'une β -lactamase à spectre étendu chez 02 souches (test de synergie positif) (**Figure 6**). Les diamètres des zones d'inhibition obtenus sont présentés dans le tableau suivant.



Test de synergie de la souche ST2
(*Proteus sp*) : BLSE+



Test de synergie de la souche EF2
(*Klebsiella sp*) : BLSE -

Figure 6 : Résultats de test de synergie.

IV-2-Recherche de la production de Céphalosporinase sur gélose à la cloxacilline :

Parmi les 15 souches d'entérobactéries testées, 05 souches sont résistantes à la FOX qui correspond à un marqueur phénotypique de la présence d'une céphalosporinase.

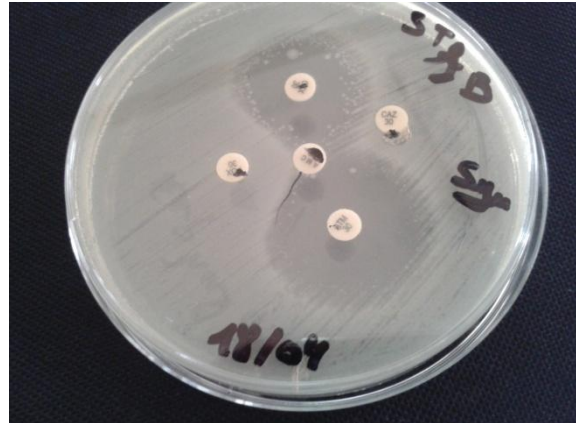


Figure 7 : Souche productrice d'une AmpC (*Serratia sp.*).

Le test à la Cloxacilline effectué a confirmé l'association d'une céphalosporinase avec une BLSE chez une seule souche de *Serratia sp.*

IV-3-Recherche de la production de la Carbapénèmase :

Les résultats de test CIM ont révélés que 08 souches parmi les 12 souches résistantes aux carbapénèmes sont probablement productrices de carbapénèmases (**Annexe V**).

Tableau V- Phénotypes probables de résistance aux antibiotiques.

Type d'effluent	Code de la souche	Espèce	Profil de la résistance	Synergie	Cloxa	CIM	Phénotype probable
Rejets de nature domestique	EF1	<i>E. coli</i>	AMC, IPM, MEM, ETP	-	NI	NI	Céphalosporinase
	EF2a	<i>Pseudomonas sp</i>	CAZ, ATM, CT, TOB	NI	NI	/	Céphalosporinase
	EF2b	<i>Klebsiella sp</i>	AMC, ETP, CT	-	/	/	Céphalosporinase
	EF2c	<i>E. coli</i>	AMC, CAZ, ETP, CT, TOB	-	NI	S	Céphalosporinase
	EF2d	<i>Acinetobacter sp</i>	CAZ, ATM, CT, TOB	NI	/	/	Céphalosporinase
	EF3a	<i>Pseudomonas sp</i>	MEM, ATM	NI	NI	/	Carbapénèmase
	EF3b	<i>Yersinia sp</i>	AMC, FOX, CAZ, CTX, IPM, MEM, ETP, ATM, CIP, TOB	+	+	S	BLSE+Céphalosporinase
	F1a	<i>Citrobacter sp</i>	AMC, CAZ, MEM, ETP, CIP	-	/	R	Carbapénèmase
	F1b	<i>Pseudomonas sp</i>	MEM, ATM	NI	NI	S	Céphalosporinase
	F1c	<i>Klebsiella</i>	/	NI	/	S	/
	F3a	<i>Pseudomonas</i>	CAZ, IPM, ATM	NI	NI	/	Céphalosporinase
	F3b	<i>Enterobacter sp</i>	AMC, CAZ, MEM, ETP, CIP	-	/	/	Céphalosporinase
	Rejets de nature spécifique à l'hôpital	Z	<i>Pseudomonas sp</i>	CAZ, ATM, CT	/	/	NI
Z1		<i>Klebsiella sp</i>	/	/	/	/	/
Z2		<i>E. coli</i>	/	NI	NI	NI	/
CFa		<i>Citrobacter sp</i>	AMC, CAZ, MEM, ETP, ATM, CT	-	NI	/	Céphalosporinase
CFb		<i>Pseudomonas sp</i>	CAZ, ATM	/	/	/	Céphalosporinase
CUa		<i>E. coli</i>	AMC, CAZ, CTX, MEM, ETP, ATM, CIP	-	-	S	Céphalosporinase
CUb		<i>E. coli</i>	/	-	/	/	/
CUC		<i>Pseudomonas sp</i>	CAZ, ATM	NI	/	/	Céphalosporinase
Rejets spécifiques à certains soins	EF5a	<i>Pseudomonas sp</i>	MEM, ATM	/	/	/	Carbapénèmase
	EF5b	<i>Enterobacter sp</i>	AMC, FOX, CAZ, CT, TOB	-	NI	/	BLSE
	EF6a	<i>Yersinia sp</i>	AMC, CAZ, MEM, ETP, CIP	-	NI	R	Carbapénèmase
	EF6b	<i>Pseudomonas sp</i>	MEM, ATM	/	/	R	Carbapénèmase
	F4	<i>Pseudomonas sp</i>	MEM, ATM	NI	/	/	Carbapénèmase
	F5a	<i>E. coli</i>	AMC, CAZ, IPM, CT, TOB	-	/	S	Céphalosporinase
	F5b	<i>Pseudomonas sp</i>	IPM, MEM, ATM, CT, TOB, CIP	/	NI	NI	Carbapénèmase
	F5c	<i>Enterobacter sp</i>	AMC, FOX, CAZ, IPM, ETP, ATM	/	/	/	Case+ imperméabilité
	T1	<i>Pseudomonas sp</i>	CAZ, IPM, MEM, ATM	/	NI	/	Céphalosporinase
	T2	<i>Acinetobacter sp</i>	CAZ, ATM, CT, TOB	/	/	/	Céphalosporinase
	T3a	<i>E. coli</i>	/	NI	/	NI	/
	T3b	<i>Pseudomonas sp</i>	CAZ, IPM, ATM	NI	/	NI	Case+ imperméabilité
	T5b	<i>Citrobacter sp</i>	AMC, FOX, CAZ, CTX, MEM, ETP, ATM, CT, CIP, TOB	-	/	S	AmpC+ imperméabilité
	ST1a	<i>Pseudomonas sp</i>	CAZ, ATM, CT, CIP	/	/	/	Céphalosporinase
	ST1b	<i>Serratia sp</i>	AMC, FOX, CAZ, ETP, TOB	-	NI	R	Carbapénèmase
ST2a	<i>Proteus sp</i>	FOX, CAZ, CTX, ETP, ATM, CT, TOB	+	NI	/	BLSE	
ST2b	<i>Pseudomonas sp</i>	/	/	NI	R	/	

NI : Non interprété

/ : Non testé

Discussion

Un totale de 31 souches de bacille à Gram négatif ont été isolées de différents types d'effluents hospitaliers, récoltée au niveau de deux hôpitaux. Dont 48% appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella sp.*, *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Yersinia sp.*, *Proteus sp* et *Serratia sp*) et 52% font partie des bacilles à Gram négatif non fermentaires.

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés en Afrique (Algérie, Maroc, Côte d'Ivoire et Benin) et en Europe (Espagne et France), qui ont mis en évidence une flore bactérienne dans les effluents hospitaliers dominée par les bacilles à Gram négatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Klebsiella sp*) et des *Pseudomonaceae* (*Pseudomonas aeruginosa*) (Marisol et al., 2000; Jeannette et al., 2007; Atef et al., 2008 ; Ekhaïse, 2008; Ameziane et al., 2012 ; Bakour et al., 2013 ; Guessennnd et al., 2013). Le même constat a été rapporté par une étude réalisée en 2016 sur les effluents hospitaliers au niveau du CHU de Khelil Amrane de Bejaia (Hezouat et Khane, 2016). Cette flore est composée principalement de la flore des malades, du personnel et de celle de l'environnement hospitaliers (sols, surfaces, matériels, eau, air) (Guessennnd et al., 2013).

Des travaux nationaux et internationaux ont rapportés la contamination par des souches d'*A.baumannii*, *P.aeruginosa* et *K.pneumoniae* multi-résistante de l'environnement hospitalier proche des patients et du personnel. Ces souches ont une capacité de survie qui peut durer des mois sur des surfaces inanimées et sont fréquemment isolées des patients atteints d'infections nosocomiales (Touati et al., 2007 ; Touati et al., 2010 ; Obeïdat et al., 2014 ; Stoesser et al.,2014 ; Zenati et al.,2016).

Le niveau de contamination des effluents est très variable selon l'heure, le jour ou le débit au moment du prélèvement. Sur le plan microbiologique, les concentrations en germes sont plus faibles dans les effluents hospitaliers que dans les effluents urbains, ce qui est probablement lié à des concentrations plus élevées en désinfectants et antibiotiques (Darsy et al., 2002) ce qui explique la présence du même type de bactéries et leur faible charge microbienne.

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* sont plus dominantes dans les eaux usées hospitalières (plus de 10 fois supérieur) que les eaux usées urbaines (Schlosser, 1999). La prédominance des *Pseudomonas sp* trouvés dans nos échantillons concorde avec ces données. En effet, *Pseudomonas aeruginosa* est une espèce ubiquitaire, capable de persister dans plusieurs environnements. Elle est capable d'utiliser différents composants organiques comme sources d'énergie et de survivre longtemps dans des environnements humides, *P.*

aeruginosa est un pathogène hôpitalo-acquis commun des voies respiratoires et urinaires dans tous les services et spécifiquement dans ceux des soins intensifs (**Jarvis et Martone, 1992; Spencer, 1996**).

Dans la famille des entérobactéries, *E. coli* est la souche la plus dominante (05/31). Suivi d'*Enterobacter sp* (02/31) et de *Klebsiella sp* et *Citrobacter sp* (01/31 respectivement). Pour les non entérobactéries, en plus de *Pseudomonas sp* décrit précédemment, nous avons isolé deux souches d'*Acinetobacter sp*. Ces mêmes espèces sont rapportées par **Guessennd** et ses collaborateurs en 2013 à partir des effluents hospitaliers d'un CHU au Côte d'Ivoire.

Cette faible concentration de la flore bactérienne pourrait s'expliquer par la présence probable de résidus de substances antibactériens spécifiques dans les effluents (antibiotiques, désinfectants, antiseptiques,...etc) (**Nunez et Moretton, 2007**). Dont le plus courant est l'eau de javels comparé aux produits désinfectants et antiseptiques utilisés dans les activités de soin en forte concentration (**Leprat, 1998 ; Metcal et Eddy, 1991**).

L'étude de la sensibilité des souches d'entérobactéries vis-à-vis des β -lactamines a montré une résistance non négligeable à l'Ertapénème, à la Céfotaxime (13/15) et au Méropénème (09/15) comparée à celle de l'imipénème (04/15). Par contre les souches de BGN non fermentaire montre une résistance totale à l'Aztréonam et une résistance modérée vis-à-vis de la Céfotaxime (10/16), du Méropénème (07/16) suivi de Imipénème (04/16).

Chez les Entérobactéries, la résistance aux carbapénèmes résulte essentiellement de deux mécanismes impliquant tous deux des β -lactamases. Le premier mécanisme est associé à la production d'une céphalosporinase chromosomique et/ou plasmidique ou une BLSE avec une diminution quantitative ou qualitative de l'expression des porine. Le second est lié à la production d'une β -lactamase à forte activité hydrolitique vis-à-vis des carbapénèmes (**Nordmann et Carer, 2010**).

En ce qui concerne la résistance aux autres familles d'antibiotiques, une résistance modérée est observée chez les entérobactéries vis à vis de la Tobramycine, colistine et Ciprofloxacine (09/15), (08/15) et (07/15) respectivement et faible chez les non fermentaire vis-à-vis de la Colistine, Tobramycine et Tiprofloxacine (06/16), (04/16) et (02/16) respectivement. Ces résultats sont différents à ceux d'**Islam et al** en 2008, qui ont trouvés dans leurs travaux sur les bactéries multirésistantes isolées des effluents hospitaliers à 5 familles d'antibiotiques avec un taux de résistance de 100% à la ciprofloxacine (**Islam et al., 2008**).

L'observation de cette multi-résistance traduit bien la présence de BMR dans les effluents hospitaliers. Cette multi-résistance pourrait s'expliquer par le fait que les antibiotiques font partie des molécules les plus prescrites en Afrique et parmi ces antibiotiques les β -lactamines venaient en tête (**Dosso et al., 2000**). Aussi elle pourrait s'expliquer par la présence de faibles concentrations d'antibiotiques non métabolisés rejetées par l'hôpital (**Jeannette et al., 2007 ; Thomas et al., 2007**). En effet, les médicaments atteignent généralement les effluents hospitaliers par deux voies ; la première est à travers les urines, les fèces et les divers liquides biologiques des patients; la seconde concerne l'élimination des médicaments non utilisés ou périmés à travers les vidoirs et les éviers (**Ameziane, 2009**).

Pseudomonas aeruginosa est caractérisé par son niveau élevé de résistance et par son aptitude à acquérir et cumuler de nombreux gènes de résistances aussi bien en milieu hospitalier que dans l'environnement sous l'effet de la sélection exercée par les antibiotiques : sécrétion de β -lactamases, modification de la perméabilité membranaire (efflux, imperméabilité) et modification de cible (**Defez et al., 2004; Mesaros et al., 2007**).

Les résultats de test CIM ont été positifs pour 08/10 souches testées, elles sont donc probablement productrices de carbapénèmases. La résistance à l'Imépinème ainsi qu'à l'Ertapénème est due à la production d'enzymes de types carbapénèmases regroupées en 3 classes, il s'agit de carbapénèmases de type oxacillinase (classe D), de métallob- β -lactamases (classe B), et des carbapénèmases de (classe A) (**Kempf et Rolain, 2012**).

La production d'une BLSE a été identifiée chez une souche de *Proteus sp.* L'association d'une céphalosporinase avec la production d'une BLSE a été également détectée chez une souche de *Serratia sp.* La résistance aux β -lactamines chez les entérobactéries est dominée par la production de BLSE de type CTX-M-3 et CTX-M-15 en milieu hospitalier (**Touati et al., 2006, Touati et al., 2010 ; Gharout-Sait et al., 2012**).

Conclusion

Au cours de cette étude qui s'est déroulée au niveau du laboratoire de l'université de Béjaia, les résultats que nous avons obtenus montrent que les effluents hospitalier (rejets de nature domestique, rejets spécifique à l'hôpital, rejets spécifique à certains soins) peut constituer un réservoir potentiel de Bacille à Gram Négatif multirésistantes aux antibiotiques.

Sur les 18 prélèvements effectués à partir des eaux usées hospitalières, 31 souches de bacilles à Gram négatif ont été isolées et identifiées, dont 14 sont des *Pseudomonas sp* et 02 sont des *Acinetobacter sp*, 15 entérobactéries réparties comme suite : 09 souches d'*Escherechia Coli sp.*, 03 souches de *Citrobacter sp.*, 02souches d'*Enterobacter sp* et une seule souches de *Klebsiella Pneumoniae sp.*, *Proteus sp.*, *Yersinia sp* et *Serratia sp*.

La résistance des souches vis-à-vis des antibiotiques testés a montré que :

- ✓ La totalité des souches de *P. aerogenosa* présente une résistance à l'ATM, β -lactamines testés, (08/14) vis-à-vis de la Céftazidime et (04/14) vis-à-vis de l'Imipénème. Deux souches ont été constatées comme résistantes à la Tobramicyne.
- ✓ les deux souches d'*Acinetobacter sp* sont résistantes aux β -lactamines (Céftazédime et Imipénème). Elles sont également résistantes à la Tobramicyne et Céfoxitine (02/02).
- ✓ Les souches d'entérobactéries présentent un taux de résistance élevée vis-à-vis des carbapénèmes testés dont 13 souches sont résistantes à l'Ertapénème, 09 souches sont résistantes au Méropénème et seulement 04 souches sont résistantes à l'Imipénème. Elles présentent également une résistance modérée vis-à-vis de TOB, CT et CIP. L'AK reste l'ATB le plus actif sur ces souches.

Ces résultats montrent que les effluents hospitaliers dans les deux régions ; Mila et Jijel, sont largement contaminés par des bacilles à Gram négatif multirésistantes. Ces résultats nous incitent à proposer des recommandations au sein des structures de soins. Il s'agit particulièrement de la mise en place de station de traitement des eaux usées par les autorités afin de réduire le risque sanitaire de ces effluents hospitaliers. Ainsi, Il est primordial de recourir à des ressources hydriques alternatives autres que les eaux usées hospitalières vue la demande en eau croissante pour l'irrigation. Cela pourra contribuer dans la limitation du risque da la dissémination des BMR et des gènes de résistance dans l'environnement.

Les résultats de notre étude restent préliminaires et méritent d'être complétés par :

- ✓ La détermination de l'évolution de la contamination des effluents hospitaliers à différentes durées journalières.
- ✓ L'élargissement de l'étude sur toute la flore environnementale pour inclure les bactéries à Gram positif pour déterminer les places des BMR parmi ces microorganismes ;
- ✓ La réalisation d'autres tests phénotypiques : CarbaNP, test de Hodge.
- ✓ La détermination de l'efficacité de la mise en place de station d'épuration dans la désinfection des eaux usées hospitalières ;
- ✓ L'étude de la résistance des souches isolées des effluents à d'autres agents antibactériens autres que les antibiotiques.

Sommaire

Introduction générale **Erreur ! Signet non défini.**

Materiel et méthodes

I- Méthode de prélèvement..... 6

II- Isolement et purification 7

III- Identification 7

IV- Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques..... 9

V- Recherche des phénotypes de résistance aux β -lactamines 10

Résultats

I- Répartition des souches par site de prélèvement 12

II- Répartition des souches par espèce..... 13

III- Sensibilité des souches de bacilles à Gram négatif aux antibiotiques 14

IV-Phénotypes de résistances probables aux β -lactamines 17

Discussion **Erreur ! Signet non défini.**

Conclusion **Erreur ! Signet non défini.**

Références bibliographie

A

Ameziane N. (2009) : La problématique des déchets hospitaliers au niveau de la ville de Meknès (Maroc) entre gestion et impact sur l'environnement et la santé humaine. Fac. Sc. Meknès.

Atef, M., Diab, Idriss, M., Al-Turk., Mohames, K., Ibrahim., Khalil, D et Al-Zhrany. (2008). Tracing of Gram negative antibiotic-resistant bacteria in hospitals final affluent at Al-Mounawwarah. Journal of Taibah University for Science(JTUSCI) 1:23-34.

Avril, J.L., Dabernat, H., Denis, F et Monteil, H. (2000). Bactériologie clinique. Caractère généraux de *Staphylococcus aureus*. Ed. Ellipses paris. P 7-28.

B

Baba, Ahmed, K., Tai, Z et Arlet, G. (2014). News of antibiotic resistance among Gram-negative bacilli in Algeria. PathoBiol. 62 : 169-178.

Bakour S, Loucif L, Brunel JM, Touati A, Rolain JM. Rapid identification of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* using a Modified Carba NP test. *J Med Microbial.* 2015. 7 : 89-93.

Bakour S, Kempf M, Touati A. (2012). Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in tow university hospitals in Algeria. *J Med Microbiol.* **61** : 1341-1343.

Berche, P., Gaillard, J.L et Simonet, M. In Bactériologie. Paris : Flammarion : 1988. P. 267-275.

Bernet, S et Fines, M. (2000). Effluents du CHU de CAEN ; Etude qualitative et quantitative de la flore microbienne et recherche de bactéries multirésistantes. Quatrième journée du Réseau Régional d'Hygiène de Basse-Normandie, Caen.

Bert F., Lambert-Zechovsky N. (1999). Résistance aux antibiotiques et problèmes thérapeutiques posés par *Pseudomonas aeruginosa*. Presse Med 28 :451-8.

Blanc, A. (1999). Analyse de cycle de vie des filières de traitement des sites industriels pollués. Thèse. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon. 209.

C

Carmeli, Y., Troillet, N., Eliopoulos, G.M et Samore, M.H. (1999). Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risk associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob. Agents Chemoth* 1379 infectieuses. 408 : 365-372.

Cattoir V, Poirel L, Mazel D, Soussy CJ, et Nordmann, P. (2007). *Vibrio splendidus* as the source of plasmid-mediated QnrS-like quinolone resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51 :2650-2651.

Cherkaoui. A, Emonet. S, Renzi. G, Riat. A, Greub. G, Schrenze.J. (2014). β -lactamases à spectre étendue et carbapénémases chez les entérobactériacea. *Rev Med Suisse* 2014; 2142-2148.

Chitnis, V., Chitnis, S., Vaidya, K., Ravikant, S., Patil, S et Chitnis D.S. (2004). Bacterial population changes in hospital effluent treatment plant in central India. *Water Research.* 38 : 441-447.

Chuanchuen, R., Karkhoff-Schweizer, R.R et Schweizer, H.P., (2003). High-level triclosan resistance in *Pseudomonas aeruginosa* issolely a result of efflux. *Am. J. Infect. Control.* 31 : 124–127.

Coralie, Darsy., Irene, Lescure., Veronique, Payot et Geraldine, Rouland. (2002). Effluents des établissements hospitaliers et la maîtrise de la diffusion des bactéries multi résistantes : teneur en microorganismes pathogènes, risques sanitaires, procédures particulières d'épuration et gestion des boues. P 10.

D

Dadie, A. T., Guessennd, N., Tiekoura, B., Faye-Kette H et Dosso, M. (2003). Résistance aux bêtalactamines d'Escherichia coli d'origine alimentaire et humaine isolés à Abidjan. *J.Sci. Pharma. Biol.* 4 (1) :62-69.

Darsy, Coralie., Lescure, Irene., Payot, Veronique et Rouland, Geraldine. (2002). Effluents des établissements hospitaliers : teneur en microorganismes pathogènes, risques sanitaires, procédures particulières d'épuration et de gestion des boues.OFFICE INTERNATIONAL DE L'EAU, Service National d'Information et de Documentation sur l'Eau. Web: <http://www.oieau.org>.

Defez C., Fabbro-Peray P., Bouziges N., Gouby A., Mahamat A et Daures J. P. (2004). Risk factors for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial infection. *J Hosp Infect.* 57: 209-16.

Dosso, M., Bissagnene, E et Coulibaly, M. (2000). Résistances Acquisés Et Prescriptions d'antibiotiques en Afriques : quelles adéquations ? *Med Mal Infec.* 30 :197-204.

E

Ekhaise, F.O et Omavwoya, B, P. (2008). Influence of wastewater discharged from university of Benin reaching Hospital (UBTH), Benin City on its receiving environment. *America Eurasian J. Agric and Environ. Sci.* 4 (4): 484-488.

Emmanuel, Evens. (2004). Evaluation des risques sanitaires etécotoxicologiques liés aux effluents hospitaliers.Thèse de doctorat, INSA de Lyon.

Engel Hj, Collingnon Pj, Whiting Pt et Kendy Kj. (2009). *Serratia sp.* Bacteria in Canberra, Australia ; a population basedstudy over 10 years. *Microbial and infect. Dis.* 28 :821-824.

J

Jacoby, Ga et Munoz-Price Ls. (2005). The new β -lactamase. The new Englend *J of Med.* 91: 352-380.

Jarvis, W.R., Martone, W.J. (1992). Predominant pathogens in hospital infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 29 (Suppl. A), 19–24.

Jeannette, Munez-Aguayo., Kelvin, S., Lang., Timothy, M., Lapara., Gerald, Gonzalez et Randall, S. Singer., (2007). Evaluating the Effect of Chlortetracycline on the proliferation of Antibiotic-resistant bacteria in a stimuled river water ecosystem. *Applied and Environnemental Microbiology.* 73 (7): 5421-5425.

Jehannin, Pascal. (1999). Caractérisation et gestion des rejets liquides hospitaliers. Etudeparticulière de la situation du C.H. de Hyères (Var). (Mémoire de fin d'études). Ecole Nationale de la Santé publique.

Julien, Passerat., Fatima, Tamtam., Barbara, Lebot., Joëlle, Eurin., Marc, Chevreuil., Pierre et Servais. (2009). Rejets hospitaliers d'antibiotiques et de bactéries fécales antibiorésistantes dans les rivières du bassin de la Seine.

H

Hezouat, S et Khane, A. (2016). Criblage de souches de bacilles à Gram négatif résistantes aux β -lactamines isolées de l'environnement hospitalier du CHU de Khlil Amran de Bejaia. Mémoire de fin d'étude. Univ Bejaia.

Hocquet, D., Bertrand, X., Kohler, T., Talon, D et Plesiat, P. (2003). Genetic and phenotypic variations of aresistant *Pseudomonas aeruginosa* epidemic clone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 :1887–1894.

I

Islam, M. J., M. S. Uddin., M. A. Hakim., K. K. Das et M. N. Hasan. (2008). Role of untreated liquid hospital waste to the development of antibiotic resistant bacteria. *J. Innov. Dev. Strategy.* 2 (2): 17-21.

Ito Y et Hirano T. (1997). Carbenicillin-hydrolysing penicillinase mediated by a plasmid of *Proteus mirabilis* and its relationship to the pse-type enzymes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology.* P 175-180.

G

Gadelle F. (1995). Le monde manquera-t-il bientôt d'eau ? *Sécheresse*, vol 6, 1 :11-15.

Galleni, M., Raquet, X., Lamotte-Brasseur, J., Fonze, E., Amicosante, G et Frère, J.M. (1995). DD-peptidases and beta-lactamases : catalytic mechanisms and specificities. *Jrnl of antimicrob Chemotherp.* 7 : 3-7.

Gharout-Sait, A., Touati, A., Benallaoua, S., Guillard, T., Brasme, L., Madoux, J et Champs, C. (2012). CTX-M from community-acquired urinary tract infections in Algeria. *African Journal of Microbiology Research* 6, 5306-5313.

Guessennd, K. N., Loubienga, S. W., Gbonon V., Kouassi, M'bengue, A., Kacou, N'douba A et Dosso, M. (2004). Résistance aux antibiotiques de 241 souches

d'Escherichia coli isolées des infections urinaires des patients hospitalisés au CHU de Cocody à Abidjan. *J. Sci. Biol.*, Vol. 5, n°1. P 38-45.

K

Kempf I et Zeitoni S (2012). Cout biologique de la résistance aux antibiotiques : analyse et conséquences. *Path Biol.* **60**: 9-14.

Kolpin D.W., Skopec M., Meyer M.T., Furlong E.T. et Zaugg S.D. (2004). Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. *Sci. Total. Environ.*, 328, 119–130.

Kümmerer A. et Henninger A. (2003). Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. *Clin. Microbiol. Infect.*, 9, 1203–1214.

L

Lavigne J P., Sotto A., Merle C., Jourdan J., Soussy Cj et Sirot D. (2002). Résistance enzymatique d'*Escherichia coli* aux β -lactamines et prévalence en clinique. *Pathologie biologique.* 50 : 388-393.

Lazar, V., Cernet, R., Balotesco, C., Coter, A., Coipan, E et Cojacaru, C. (2002) . β -lactam résistance in aquatic *Enterobacter cloacae* strains using phenotypique and genotypique criteria. 47 :3-4.

Leprat. (1998) : Les rejets liquides hospitaliers; quels agents et quelles solutions techniques? Les assises Nationales QUALIBIO 1998. "Santé et Environnement hospitaliers", Caen. P 10-13.

M

Mainardi JI., Mugnier P., Coutrot A., Buu-Hoi A., Collatz E et Gutmann L. (1997). Carbapenem resistance in a clinical isolate of *Citrobacter freundii*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 23 :52-4.

Maurin. M., Musso. D., Chareler. R., Perez. R., Nguyen. A., Dumon. H et Demico. P. (1995). Résistance aux antibiotiques des bactéries hospitaliers (bacilles à Gram négatif aérobies). Médecine et maladies infectieuses. 408 :365-372.

Mansotte, F et Jestin, E. (2000). Les rejets liquides des établissements de santé : Caractérisation à la source et impact sur l'environnement marin côtier. Direction départementale des affaires sanitaires et sociales de la Seine Maritime, Agence de l'eau de la Seine Normandie. Synthèse réalisée et complétée sur la base du travail de Florence Merrant Lebrun. Centre hospitalier du Havre. Clin-Club Environnement, France.

Marisol, G., Capdepuy, M., Arpin C., Raymond, N., Caumette, P et Quentin, C. 2000. Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of river in *enterobacteriaceae* and *Aeromonas spp.* Applied and Environmental Microbiology. 66 (1): 125-132.

Mesaros, N., Nordmann, P., Plesiat, P., Roussel delvallez, M., Van Eldere, J et Glupczynski, Y. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the new millennium. *Clin Microbiol Infect.* 13:560-78.

Mesli E, Berrazeg M, Drissi M, Bekkhoucha SN, Rolain JM. (2013).Prevalence of carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter* species, Algeria. *Int J Infect Dis.* **17** : 739-743.

Metcalf et Eddy. (1991): Wastewater Engineering : Treatment and reuse.
New York: Mc Graw-Hill Book Company, 3rd (Ed). P 303.

N

Nordmann P, Carreer. (2010). Entérobactéries productrices de carbapénémase,
Archives de pédiatrie, Hôpital de Bicêtre, France. 17:S154-S162.

Nuñez L.; J. Moretton., 2007. Disinfectant- Resistant bacteria in Buenos Aires city
hospital wastewater. *Brazilian Journal of Microbiology.* 38:644-648.

O

OMS (Organisation Mondiale de la Santé). (1994). Directives de qualité de l'eau de
boisson, 2^e ed, Vol. 1 : Recommandations, OMS, Genève. 8-30.

Obeidat, N; F. Jawdat et A.G. Al-Bakri. (2014). Major biologic characteristics of
Acinetobacter baumannii isolates from hospital environmental and patient's
respiratory tract sources. *Am J Infect Control* 2014 ; 42 :40140-40144.

P

Philippon, A., Arlet, G et Lagrange, P.H. (1994). Origin and impact of plasmid-
mediated extended spectrum beta lactamases *Eur J Clin Microbial Infec Dis.*13 Suppl.
1: 17-29.

Julien PASSERAT ; Fatima TAMTAM ; Barbara LE BOT ; Joëlle EURIN ; Marc CHEVREUIL et Pierre SERVAIS. (2009). Rejets hospitaliers d'antibiotiques et de bactéries fécales antibiorésistantes dans les rivières du bassin de la Seine. *Eur. j. water qual.*

S

Schlosser. (1999) : Exposition aux eaux usées et risques Microbiologiques.

Sougakoff, W et Tyrstram, D., (2003). Resistance aux b-lactamines. Université Pierre et Marie Curie. Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie. P 78.

Spencer, R.C. (1996). Predominant pathogens found in the European Prevalence of Infection in Intensive Care Study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15 :281–285.

Stoesser, A., E.Giess, M. Batty, A.E. Sheppard, A.S. Walker, D.J. Wilson, X. Didlo, A. Bashir, R. Sebra, A. kasarski, b. Sthapit, M. Shakya, D.Kelly,A.j. Pollard, T.E.A. Peto, D.W. Crook, P. Donnelly, S. Thorson, P. Amatya, and S. Joshi. (2014). Genome Sequencing of an Extended Series of NDM-Producing *Klebsiellapneumoniae* Isolate from neonatal infections in a Nepali hospital Characterizes the Extent of Community-versus Hospital Associated Transmission in an Endemic Setting. *Antimicrob Agentschemother.* **58** (12):7347-7357.

T

Touati, A., K. Zenati, L. Brasme, S. Benallaoua et C. De champs. Extended spectrum β -lactamase characterisation and heavy metal resistance of Enterobacteriaceae strains isolated from hospital environmental surfaces. *J Hosp Infect.* 75 :2010, 78-79.

Touati, A ; S. Benallaoua, F. Djoudi, J. Madoux, L. Brasme C. De Champs. Characterisation of CTX-M-15-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains isolated from hospital environments in Algeria. *Microb Drug Resist.* 13 :2007. 85-89.

Thomas S., Holger V., Slike K., Wolfagang K., Katja S., Bernd J. and Ursula O., (2007). Detection of antibiotic- resistant bacteria and their resistance genes in waster, surface water and drinking water biofilms, *FEMS Microbiology Ecology.* 43 (3):325-335.

W

Watkinson A.J., Micalizzi G.B., Graham G.M., Bate J.B. et Costanzo S.D. (2007). Antibioticresistant *Escherichia coli* in wastewaters, surface waters, and oysters from an urban riverine system. *Appl. Environ. Microbiol.,* 73, 5667–5670.

Z

Zenati, K., Touati, A., Bakour, S., Sahlic, F et Rolaina, J.M. (2016). Characterization of NDM-1 and OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates from inanimate surfaces in a hospital environment in Algeria. Multi-drug resisitant Gram negative bacteria. 92 : 19-26.

Kim van der Zwaluw*, Angela de Haan, Gerlinde N. Pluister, Hester J. Bootsma, Albert J. de Neeling, Leo M. Schouls. (2015). Centre for Infectious Diseases Research, Diagnostics and Screening (IDS), National Institute for Public Health and the Environment (RIVM). Bilthoven, The Netherlands. P12.

Annexes

Un ensemencement des souches pures sur milieu Chromogène a été effectué, après 24h d'incubation dans des conditions d'aérobiose à 37°C, les souches ont été identifiées selon leur apparence (**Tableau I**), (**Figure 1**).

Tableau I- Aspects des colonies sur milieu Chromogène (fiche technique).

Microorganisme	Apparence des colonies typiques
<i>E.coli</i>	Rose foncé à rougeâtre
<i>Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia</i>	Bleu métallique (+/-violet)
<i>Proteus, Morganella, Providencia</i>	Colonies plates avec un halo marron
<i>Proteus vulgaris</i>	Bleu avec halo marron
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ttranslucide (+/ pigmentation naturelle couleur crème à vert)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Colonies muqueuses blanches opaques
<i>Enterocoque</i>	Petites colonies bleus turquoises

Tableau II-Résultats d'identification des souches par la galerie biochimique.

Souche	Glucose	Lactose	Indole	Uréase	VP	RM	NR	Citrate	Gaz	H ₂ S
<i>E.coli</i>	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
<i>Citrobacter sp</i>	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>Enterobacter sp</i>	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-
<i>K.pneumoniae</i>	+	+	-	+	+	-	+	+/-	+	-
<i>Serratia sp</i>	+	-	-	-	+	+/-	-	+	-	-
<i>Proteus sp</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>Yersinia sp</i>	+	-	+/-	+	+			-		-
<i>Pseudomonas sp</i>	-	-	-	-	+	-	+	+/-	-	-
<i>Acinetobacter sp</i>	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-

Tableau III- Diamètres critiques des zones d'inhibitions édités par **EUCAST (2016)** et **CA-SFM (2013)**.

Antibiotique	Diamètre critique (mm)					
	<i>Enterobacteriaceae</i>		<i>Pseudomonas sp</i>		<i>Acinetobacter sp</i>	
	S ≥	R <	S ≥	R <	S ≥	R <
AMC	19	19	/	/	/	/
CAZ	22	19	16	16	18	15
CTX	20	17	/	/	23	15
FOX	19	19	/	/	/	/
IPM	22	16	20	17	23	17
MEM	22	16	24	18	21	15
ETP	25	22	/	/	/	/
ATM	24	21	50	16	/	/
TOB	17	14	16	16	17	17
AK	16	13	17	15	17	15
CIP	22	19	25	22	21	21
CT	15	15	15	15	15	15

Tableau IV - Profil de résistance des enréro bactéries aux β -lactamines.

Code	Espèce	AMC	FOX	CAZ	CTX	IMP	MEM	ETP	ATM
EF1	<i>E. coli</i>	R	S	S	S	R	I	I	S
EF2b	<i>Klebsiella sp</i>	R	S	S	S	S	S	I	S
EF2c	<i>E. coli</i>	R	S	R	S	S	S	I	S
EF3b	<i>Yersinia sp</i>	R	R	R	R	R	R	R	R
EF5b	<i>Enterobacter sp</i>	I	I	R	S	S	S	S	S
EF6a	<i>Yersinia sp</i>	R	S	R	S	S	R	I	S
F1a	<i>Citrobacter sp</i>	R	S	I	S	S	R	I	S
F3b	<i>Enterobacter sp</i>	R	S	I	S	S	R	I	S
F5a	<i>E. coli</i>	R	S	R	S	I	S	S	S
F5c	<i>E. coli</i>	R	R	R	S	I	R	R	R
T5b	<i>Citrobacter sp</i>	R	R	R	R	S	R	R	R
ST1b	<i>Serratia sp</i>	R	R	R	S	S	S	R	S
ST2a	<i>Proteus sp</i>	S	R	R	I	S	S	R	R
CUa	<i>E. coli</i>	R	S	R	R	S	R	R	R
CFa	<i>Citrobacter sp</i>	R	S	R	S	S	R	R	R

Tableau V- Profil de résistance des souches non fermentaires aux β -lactamines.

Code	Espèce	CAZ	IPM	MEM	ATM
EF2a	<i>Pseudomonas sp</i>	R	S	S	I
EF2d	<i>Acinetobacter sp</i>	R	S	S	R
EF3a	<i>Pseudomonas sp</i>	S	S	R	I
EF5a	<i>Pseudomonas sp</i>	S	S	R	I
EF6b	<i>Pseudomonas sp</i>	S	S	R	I
F1b	<i>Pseudomonas sp</i>	S	S	R	I
F3a	<i>Pseudomonas sp</i>	R	R	S	I
F4	<i>Pseudomonas sp</i>	S	S	R	I
F5b	<i>Pseudomonas sp</i>	S	I	R	I
Z	<i>Pseudomonas sp</i>	R	S	S	I
T1	<i>Pseudomonas sp</i>	R	R	R	I
T2	<i>Acieétobacter sp</i>	R	S	S	R
T3b	<i>Pseudomonas sp</i>	R	R	S	I
ST1a	<i>Pseudomonas sp</i>	R	S	S	I
CUc	<i>Pseudomonas sp</i>	R	S	S	I
CFb	<i>Pseudomonas sp</i>	R	S	S	I

Tableau VI- Profil de résistance des entérobactéries aux autres familles.

Code	Espèces	CT	AK	CIP	TOB
EF1	<i>E. coli</i>	R	S	S	R
EF2b	<i>Klebsiella sp</i>	R	S	S	S
EF2c	<i>E. coli</i>	R	S	S	R
EF3b	<i>Yersinia sp</i>	S	S	R	R
EF5b	<i>Enterobacter sp</i>	R	S	S	R
EF6a	<i>Yersinia sp</i>	S	S	R	S
F1a	<i>Citrobacter sp</i>	S	S	R	S
F3b	<i>Enterobacter sp</i>	S	S	R	S
F5a	<i>E. coli</i>	R	S	S	I
F5c	<i>E. coli</i>	R	S	R	R
T5b	<i>Citrobacter sp</i>	R	S	R	R
ST1b	<i>Serratia sp</i>	S	S	S	R
ST2a	<i>Proteus sp</i>	R	S	S	R
CUa	<i>E. coli</i>	S	S	R	R
CFa	<i>Citrobacter sp</i>	R	S	S	S

Tableau VII- Profil de résistance des souches non fermentaires aux autres familles.

Code	Espèce	CT	TOB	CIP
EF2a	<i>Pseudomonas sp</i>	R	I	S
EF2d	<i>Acinetobacter sp</i>	R	I	S
EF3a	<i>Pseudomonas sp</i>	S	S	S
EF5a	<i>Pseudomonas sp</i>	S	S	S
EF6c	<i>Pseudomonas sp</i>	S	S	S
F1b	<i>Pseudomonas sp</i>	S	S	S
F3a	<i>Pseudomonas sp</i>	S	S	S
F4	<i>Pseudomonas sp</i>	S	S	S
F5b	<i>Pseudomonas sp</i>	R	R	R
Z	<i>Pseudomonas sp</i>	R	S	S
T1	<i>Pseudomonas sp</i>	S	S	S
T2	<i>Acinetobacter sp</i>	R	R	S
T3b	<i>Pseudomonas sp</i>	S	S	S
ST1a	<i>Pseudomonas sp</i>	R	S	R
CUc	<i>Pseudomonas sp</i>	S	S	S
CFb	<i>Pseudomonas sp</i>	S	S	S

Tableau VIII- Diamètres critiques test CIM.

Code	Souche	Diamètre (mm)	Phénotype de résistance	T+	T-	Production de cabapénèmase
EF2c	<i>E. coli</i>	24	AMC, CAZ, ETP, CT, TOB	06 (R)	22 (S)	-
EF3b	<i>Yersinia sp</i>	15	AMC, FOX, CAZ, CTX, IPM, MEM, ETP, ATM, CIP, TOB	06 (R)	22 (S)	+
F1a	<i>Citrobacter sp</i>	18	AMC, CAZ, MEM, ETP, CIP	06 (R)	22 (S)	+
F1b	<i>Pseudomonas sp</i>	22	MEM, ATM	06 (R)	22 (S)	-
CUa	<i>E. coli</i>	23	AMC, CAZ, CTX, MEM, ETP, ATM, CIP	06 (R)	22 (S)	-
EF6a	<i>Yersinia sp</i>	6	AMC, CAZ, MEM, ETP, CIP	06 (R)	22 (S)	+
EF6b	<i>Pseudomonas sp</i>	6	MEM, ATM	06 (R)	22 (S)	+
F5a	<i>E. coli</i>	13	AMC, CAZ, IPM, CT, TOB	06 (R)	22 (S)	+
T5b	<i>Citrobacter sp</i>	14	AMC, FOX, CAZ, CTX, MEM, ETP, ATM, CT, CIP, TOB	06 (R)	22 (S)	+
ST1b	<i>Serratia sp</i>	16	AMC, FOX, CAZ, ETP, TOB	06 (R)	22 (S)	+

Composition des milieux de culture (g/l'eau utilisée)**Gélose Mac Conkey (pH 7.4)**

• Peptone.....	20
• Lactose.....	10
• Sels biliaires.....	0.072
• Chlorure de sodium.....	05
• Agar.....	12

Gélose Mueller Hinton (pH 7.4)

• Infusion de viande de bœuf.....	300
• Hydrolysate de caséine.....	17.5
• Amidon.....	1.5
• Agar.....	17

Gélose TSI (pH 7)

• Extrait de viande de viande de bœuf.....	03
• Extrait de levure.....	03
• Peptone trypsine.....	20
• Chlorure de sodium.....	05
• Citrate ferrique.....	0.3
• Thiosulfate de sodium.....	0.3
• Lactose.....	1
• Glucose.....	01
• Saccharose.....	10
• Rouge de phénol.....	0.05
• Agar.....	12

Milieu de citrate de Simmons (pH 7)

• Infusion de sodium.....	02
• Chlorure de sodium.....	05
• Sulfate de magnésium.....	0.2
• Phosphate mono ammoniac.....	01
• Phosphate bi potassique.....	01
• Bleu de bromothymol.....	0.08
• Agar.....	15

Milieu VRBL (pH 7)

• Peptone.....	06
• Extrait de levure.....	03
• Lactose.....	10
• Chlorure de sodium.....	03
• Mélange sel biliaire.....	1.5
• Cristal violet.....	0.002
• Rouge neutre.....	0.03
• Agar-agar.....	15

CHROMagar Orientation medium :

• Chromopeptone.....	16,1
• Mélange chromogène.....	1,3
• Gélose.....	15

Milieu Klark-lubs (pH 7) :

• Peptone trypsine de viande	05
• Phosphate bi potassique.....	05
• Glucose.....	06

Bouillon nutritif (pH 7.7) :

• Macération de viande.....	01
• Peptone trypsine.....	15

- NA Cl.....05

Bouillon nitraté (ph=7) :

- Infusion cerveau-cœur.....25
- Nitrate de potassium.....10

Réactifs utilisés

Réactifs de Kovacs

- Alcool amylique ou isoamylique.....150ml
- P. diméthylaminobenzaldéhyde..... 10ml
- Acide chlorhydrique concentré.....50ml

Réactif Rouge de méthyle

- Rouge de méthyle.....0.5g
- Alcool éthylique à 60%.....100ml

Réactif de Voges-Proskauer (VP I)

- α Naphtol.....6g
- Alcool éthylique à 90%.....100ml

Réactif de Voges-Proskauer (VP II)

- NaOH 4N

Réactif de Griess I (NR I)

- Acide paraculfanilique.....8g
- Acide acétique 5N.....11

Réactif de Griess II (NR II) :

- α Naphtylamine.....6g
- Acide acétique 5N.....11

Résumé :

Objectif : Caractérisation de la multirésistance aux antibiotiques, des bacilles à Gram négatif isolés des effluents hospitaliers de deux hôpitaux de l'est Algérien.

Méthode : Les 18 prélèvements qui ont été effectués à partir des effluents hospitaliers, repartis en trois types ; rejets de nature domestique, rejets de nature spécifique à l'hôpital et rejets spécifiques à certains soins, durant une période de deux mois (de Février au Mai 2017). L'isolement a été fait sur une gélose de Mac Conkey, additionnée d'Ertapénème à 0.5 µg/ml et de Vancomycine à 32 µg/ml. Les souches isolées ont fait l'objet d'une identification et d'une caractérisation de la sensibilité vis-à-vis des β-lactamines et d'autres familles d'antibiotiques. Les phénotypes de résistance aux β-lactamines ont été étudiés.

Résultat : Au total, 31 souches de bacilles à Gram négatif ont été identifiées, dont 14 souches de *Pseudomonas sp.*, 02 souches d'*Acinetobacter sp* et 15 souches d'entérobactéries (05 d'*E. Coli.*, 01 de, 03 *Citrobacter sp.*, 02 *Enterobacter sp.*, 02 *Yersinia sp.*, Et une seule souche de *Proteus sp.*, *Klebsiella sp* et *Serratia sp*). L'étude de la sensibilité aux antibiotiques (08 β-lactamines et 4 appartenant aux autres familles d'antibiotiques), a révélé que 14 des BGN fermentaires sont résistantes à l'AMC, 13/15, 13/15, 09/15, 06/15, 06/15, 04/15,04/15 sont résistants respectivement à l'ETP, CAZ, MEM, ATM, FOX, CTX et IMP. La totalité des BGN non fermentaires est résistante à l'ATM, 10/16, 07/16, 04/16 sont résistants respectivement au CAZ, MEM et IMP. Les résistances marquées des entérobactéries aux autres antibiotiques sont les suivants : 10/15, 09/15, 07/15 vis-à-vis de TOB, CT, CIP, l'AK est le plus active sur ces souches ; aucune résistance n'a été marquée. Les BGN non fermentaires ont marqué 06/16, 04/16 et 02/16 souche résistante vis-à-vis de CT, TOB, CIP. Deux souches ont été productrices de BLSE. Une souche parmi elles a été productrice d'une BLSE associée à une AmpC. 21 souches productrices de céphalosporinase. 08 souches ont été considérées productrices d'une carbapénémase

Mots clés : Multirésistance, Antibiotique, Effluents hospitaliers, Bacilles à Gram négatif, BLSE.

Abstract:

Objective: Characterisation of the antibiotic-multiresistance of Gram negative bacilli isolated from hospital effluents from two hospitals of the Algerian east.

Methodology: The 18 collected samples from hospital effluents repartee in three types; domestic wastewater, hospital specific wastewater, health care specific wasrwater, during a period of two mounths (from Februray to May 2017) Isolation was done in Mac ConKey agar, supplemented with Ertapénème (0.5 µg/ml), and Vancomycine (23 µg/ml).The identification, the characterization of the sensitivity to β-lactam and other antibiotics and the resistance phenotype to β-lactam were studied.

Resultat: In total, 37 strains of Gram negative bacilli were identified including 14 strains of *Pseudomonas sp.*, 02 strains of *Acinétobacter sp* and 15 strains of enterobacteria (08 of *E. Coli.*, 03 of and *Citrobacter sp.*, 02 of *Entérobacter sp* and *Yersinia sp* ., only one, *Proteus sp.*, *Klebsiella sp* and *Serratia sp*). The study of antibiotic susceptibility (08 β-lactams and 04 belonging to other antibiotic families) reveald that 93,33% of GNB fermentative are resistant to AMC, 13/15, 13/15, 09/15, 06/15, 06/15, 04/15,04/15 are résistant to ETP respectively to the CAZ, MEM, ATM, FOX, CTX and IMP. The totality of non fermentative GNB is résistant to ATM, 10/16, 07/16, 04/16 are résistant to CAZ respectively to MEM and IMP. The resistance of enterobacteria to other antibiotics is as follows: 10/15, 09/15, 07/15 against TOB, CT, 10/15, 09/15, 07/15 CIP, the AK is the most active on this strains; no résistance was marked. Non fermentative GNB have marked the follow rates 06/16, 04/16 and 02/16 against CT, TOB, CIP. Two strains produced BLSE. One of it produced an associated AmpC to BLSE. 21 strains were considered producing cephalosporinase.08 strains were considered producing carbapénémase

Keywords: Multiresistance, Antibiotic, Hospital effluents, Gram negative bacilli, BLSE.