

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA-Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences biologiques
Option : Microbiologie en secteur biomédical et vétérinaire



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Etude de la résistance et la persistance des souches
de bacille à Gram négatif isolées des différentes
surfaces du service de réanimation**

Présenté par :

AISSAT Nouria et KASMI Katia

Soutenu le : 24/06/2017

Devant le jury composé de :

M^r BOUSSALAH N.	MAA	Président
Mme BELHADI K.	MAA	Encadreur
Mme GHAROUT A.	MCB	Examinatrice

Année universitaire : 2016/2017

Remerciements

Nous tenant à remercier très sincèrement notre promotrice Mme BELHADI pour nous avoir encadrées, en nous faisant bénéficier de ces connaissances, de son aide et ses conseils.

Nous tenons à exprimer notre gratitude, notre profond respect et nos remerciements aux membres de jury : Mr BOUSSALAH qui nous a fait honneur par sa présence en qualité de président de jury. Mme GHAROUT qui a accepté de faire partie de ce jury et d'examiner ce travail.

Nous remercions également tout le personnel du service de réanimation du CHU Khelil Amrane pour leur accueil et leur aide effective.

Enfin, nos remerciements et gratitudes vont aussi à tous ceux qui ont participé de près ou de loin, à l'élaboration de ce mémoire.

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail

A

Mes très chers parents

Qui n'ont pas cessé de m'encourager durant mes études

Mes frères et ma sœur

*Pour leur soutien, et qui m'ont aidé à tracer un tel chemin
de réussite*

Mes grands-parents et toute ma famille

Je dédie également ce travail à mes chers amis (es)

Et toute personne que j'aime et qui m'aime

*Ainsi qu'à tous ceux qui ont participé de loin ou de près à la
réalisation de ce travail.*

Katia

Dédicaces

En ce moment particulier dans ma vie,

Je tiens à dédier ce modeste travail :

A mes chers parents, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude pour leur amour, leur encouragement et leur soutien tout au long de mes études, que DIEU les bénisse.

A mes chers frères et mes chers sœurs, que ce travail les incite à mieux faire et qu'il soit un faible témoignage de l'affection de leur grande sœur.

A mes grands parents

A Toute ma famille

A tous mes amies et mes copines

A tous mes collègues de promotion

A tous ceux qui nous ont aidé à la réalisation de ce mémoire

A tous ceux que j'aime.

Nouria

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	

Sommaire

Introduction.....	01
--------------------------	-----------

Matériel et méthodes

I-Prélèvement

I-1-Prélèvements de surface et de linge.....	08
I-2-Prélèvements de l'air.....	08
I-3-Prélèvements de moustiques.....	08
I-4-Prélèvements détergent.....	08

II-Isolement et purification

III-Identification

III-1- Identification des Entérobactéries.....	09
III-2- Identification des bacilles à Gram négatif non fermentaire.....	09

IV-Etude de la résistance aux antibiotiques

V-Recherche des phénotypes de résistance aux β -lactamines

V-1-Recherche de la production de β -lactamase à spectre étendu (BLSE).....	12
V-2-Test de synergie avec cloxaciline	12
V-3-Recherche des carbapénèmases.....	12
V-3-a-Test de Hodge modifié.....	12
V-3-b-Méthode d'inactivation de carbapénème (CIM).....	13

VI-Evaluation de la formation de biofilm

VI-1-Méthode du Rouge Congo Agar (RCA).....	13
VI-2-La méthode de tissu en plaque (TCP).....	13

VII-Etude de l'efficacité des désinfectants à usage hospitalier sur la croissance des souches de BGN.....	14
--	-----------

Résultats

I-Répartition des prélèvements.....	16
II-Répartition des souches par espèce.....	16
III-Répartition des souches par type de prélèvement.....	17
IV-Répartition des souches par site de prélèvement.....	18
V-Etude de la résistance aux antibiotiques.....	20
VI-Détermination des phénotypes de résistance aux β -lactamines.....	21
VII-Evaluation de la formation de biofilm.....	24
VIII-Détermination de la sensibilité des souches de bacille à Gram négatif aux désinfectants utilisés au service de réanimation.....	26

Discussion

Conclusion.....	32
Références bibliographiques.....	I
Annexes.....	I

Liste des Abréviations

AMC : Amoxicilline-clavulanate

AmpC : Céphalosporinases

ATCC : American type collection culture

ATB : Antibiotique

ATM : Aztréonam

BGN : bacille à Gram négatif

BLSE : Bêta-Lactamases à Spectre Etendu

BMR : Bactéries multi résistantes

BN : Bouillon Nutritif

C1G : Céphalosporines de première génération

C2G : Céphalosporine de deuxième génération

C3G : Céphalosporines de troisième génération

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CAZ : Céfotazidime

CIP : Ciprofloxacine

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

CT : Colistine

CLOX : Cloxacilline

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CTX : Céfotaxime

EUCAST : European Commite on Antimicrobial Susceptibility Testing

EPC : Entérobactéries productrice de carbapénèmase

ERTA : Ertapénème

FEP : Céfépime

FOX : Céfoxitine

Glu : Glucose

I : Intermédiaire

IMP : Imipénème

Lac : Lactose

KPC : *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase

LPS : Lipopolysaccharide

MβL : Métallo-bêta-lactamase
MER : Méropénème
MH : Miller Hinton
NDM : New Delhi Metallo—lactamase
NR : Nitrate réductase
OXA : Oxacillinase
RCA : Gélose rouge Congo agar
PLP : Protéine de liaison aux pénicillines
EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique)
R : Résistant
RM : Rouge de méthyle
S : Sensible
SHV : Sulfhydrile Variable
TCP : Tissue culture plate.
TEM : Temoniera
TOB : Tobramycine
TPS : Tampon Phosphate Salin.
TSI : Three Sugar Iron
UFC : Unité Formant Colonie
VP : Voges-Proskauer
MDR : Multi Drug Resistance

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Sites de prélèvement	07
II	Aspect des colonies sur milieu Chromagar (CHROMagar™Orientation)	09
III	Les tests d'identification biochimique	10
IV	Liste des antibiotiques testés	11
V	Répartition des souches isolées par catégorie de prélèvement	16
VI	Répartition des souches isolées par sites de prélèvement	19
VII	Le profil de résistance aux antibiotiques des Entérobactéries.	22
VIII	Le phénotype de résistance aux carbapénèmes.	23
IX	Comparaison de la capacité des souches à former un biofilm par les deux techniques d'étude	25
X	Détermination de la dilution inhibitrice de la croissance des souches vis-à-vis du désinfectant, mains, air, instruments.	26

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Répartition des BGN isolés à partir des prélèvements	17
02	Répartition des souches par type de prélèvement	18
03	Taux de résistance des BGN non fermentaires aux antibiotique	20
04	Taux de résistance des Entérobactéries aux antibiotiques	21
05	Test de synergie avec et sans cloxacilline	22
06	Résultats de test Hodge	23
07	.Résultats de test CIM	23
08	Phénotype de production et non production de slim chez les souches BGNnF	24
09	Evaluation de la production de biofilm par la méthode TCP	25
10	Effet des désinfectants sur la croissance des BGN par la méthode des tubes	27

Liste des Annexes

Annexe I: Les milieux de cultures.

Annexe II : Nombre de prélèvements et les souches recueillies par sites.

Annexe III-IV : Aspect des colonies sur milieu chromagar

(CHRMagarTMOrientation) et Lecture de la galerie classique.

Annexe V : Résultats d'identification des souches par galerie biochimique classique.

Annexe VI : La résistance des bacilles à Gram négatif non fermentaires aux antibiotiques

Annexe VII : Résultats de test CIM.

INTRODUCTION

Les infections nosocomiales (IN) représentent aujourd'hui un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale, étant responsables d'une lourde morbidité mais également d'une létalité non négligeable, notamment dans les services de soins intensifs **(Hamza, 2010)**.

La réanimation est une discipline médicale qui s'attache à prendre en charge des patients dont le processus vital est menacé par la survenue d'une ou de plusieurs défaillances organiques telles que : la détresse respiratoire, l'insuffisance rénale aiguë, des troubles graves du rythme et des affections neurologiques. Ces défaillances sont conséquentes soit à un traumatisme, soit à une affection aiguë grave ou souvent à l'intrication de deux ou plusieurs phénomènes. L'objectif principal de la réanimation est de pallier cette menace vitale en assurant aux patients une suppléance adéquate pour un retour rapide à une autonomie suffisante **(Heddadi, 2013)**.

En réanimation, la surveillance des IN est prioritaire car les patients ont un risque infectieux plus élevé du fait de leur état critique et des dispositifs invasifs auxquels ils sont exposés. De plus, ces infections sont dues à des bactéries multi-résistantes (BMR) aux antibiotiques **(Réseau REA-RAISIN, 2013)**. La propagation des BMR et l'absence de nouveau antibiotique font courir un risque d'impasse thérapeutique de plus en plus fréquent **(Brun-buisson, 2005)**. En raison de cette fréquence élevée, de la gravité des infections dont elles sont responsables et de leur capacité à diffuser en réanimation, les bactéries multi-résistantes (BMR) font l'objet d'un programme de surveillance et de prévention de par le monde. Il s'agit principalement de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), les Entérobactéries sécrétrices de bêta-lactamase à spectre étendu (EBLSE), *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* résistant aux carbapénèmes **(Anonyme, 2009)**.

Les infections respiratoires et urinaires ainsi que les bactériémies sont les plus fréquemment rencontrées. La contamination peut se faire avec la flore du patient par voie endogène, ou exogène par des bactéries provenant d'un autre patient ou de l'environnement. Ainsi, il a été démontré que les micro-organismes excrétés par les patients peuvent contaminer l'environnement hospitalier et particulièrement les surfaces.

Les BMR peuvent survivre pendant de longues périodes, persister malgré la désinfection, et être transférés aux mains du personnel soignant (**Otter et al., 2011**). Cette contamination varie qualitativement et quantitativement dans le temps, d'un établissement à un autre et au sein d'un même établissement, en fonction des services, des patients, des soins et les techniques pratiquées (**Talon, 1999**).

Les bactéries à Gram négatif sont de plus en plus incriminées dans les infections nosocomiales, notamment l'espèce d'*A. baumannii*. En effet, les souches d'*A. baumannii* se sont inscrites ces dernières années parmi les bactéries les plus redoutées dans les services de réanimation. Elles sont considérées comme des agents d'infections nosocomiales sévères sporadique ou épidémique notamment chez les patients affaiblis (**O'Shea, 2012**).

Plusieurs études ont rapporté la contamination des surfaces proches des malades, des dispositifs médicaux ainsi que les mains du personnel soignant par des entérobactéries et des bacilles à Gram négatif non fermentaires. Ces souches sont fréquemment isolées des patients atteints d'infections nosocomiales. (**Bouguenoun et al., 2016 ; Zenati et al., 2016**).

La plupart des microorganismes dont la nature favorisent un mode de vie en communautés où se trouvent fixées sur un support plutôt que libre. L'attachement sur une surface est une « stratégie de survie » qui permet à la bactérie de s'installer et de coloniser un environnement. Après attachement, les bactéries vont se mettre en place et développer une communauté organisée à laquelle William Costerton a donné le nom de « biofilm » (**Fillox et Vallet, 2003**).

Un biofilm bactérien est une communauté hétérogène de bactéries agrégée en micro-colonies, entourée par une matrice et adhérente à une surface inerte ou biologique (**Drenkard, 2003**). La formation d'un biofilm et sa croissance ultérieure se produit souvent en même temps que la production d'un vaste réseau de polymères exo-cellulaires (exo-polysaccharide) adhésive et protectrice (**Bellifa, 2016**). Les biofilms bactériens peuvent se former sur une large variété de surfaces incluant des dispositifs médicaux insérés dans des systèmes qui transportent des fluides (type valvule cardiaque, cathéter urinaire, dispositif intra-utérin... etc.) (**Pidello, 2014**).

Les biofilms présentent une résistance aux agents antimicrobiens (désinfectants ou antibiotiques) et aux conditions de stress environnemental (déshydratation, privation nutritionnel, rayonnements ultraviolets) (**Campanac et al., 2002**).

La majorité des désinfectants exercent leur action essentiellement au niveau de la membrane cytoplasmique et doivent donc traverser la paroi. Les bactéries à Gram négatifs sont ainsi plus résistantes que les bactéries à Gram positifs (**Massicotte et al., 2009**).

Les β -lactamines représentent la principale famille d'antibiotique la plus utilisée dans le monde. Cette large utilisation est due à leur large spectre d'action, et à leur faible toxicité (**Handalet Olsen, 2000**).

Une classification proposée par Ambler en 1980 a permis de grouper les β -lactamases en quatre classes en fonction de leurs homologies structurales : La classe A, ou pénicillinases, elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines (amoxicilline, ticarcilline, pipéracilline) et sont inhibées par l'acide clavulanique. La classe B ou métallo- β -lactamase, hydrolysant toutes les β -lactamines sauf aztréonam et sont inhibées par EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique) et non inhibées par l'acide clavulanique. La classe C, ou céphalosporinases, elles hydrolysent préférentiellement les céphalosporines et ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique. Les β -lactamase de classe D ou Oxacillinase, elles sont caractérisées par une hydrolyse plus rapide de l'oxacilline et de la cloxacilline et sont peu inhibées par l'acide clavulanique (**Ambler, 1980**).

Des espèces bactériennes ou certaines souches d'une même espèce bactérienne peuvent être résistantes à l'action d'un ou de plusieurs antibiotiques. Cette résistance résulte toujours de l'incapacité de l'antibiotique à agir sur sa cible, du fait de la réaction des bactéries vis-à-vis de l'antibiotique, exprimée par divers mécanismes (**Bousseboua, 2005**).

La résistance aux β -lactamines est principalement due à la production des β -lactamases à spectre étendu (BLSE), enzymes qui hydrolysent l'ensemble des pénicillines ou céphalosporines à l'exception des céphamycines et des carbapénèmes. Les Entérobactéries productrice de β -lactamases à spectre étendu (EBLSE) ont émergé dans les années 1980. La répartition de ces enzymes est aujourd'hui mondiale. Elles sont, en général, portées par des plasmides et des transposons. L'augmentation de la fréquence relative des Entérobactéries productrices de BLSE a été observée aussi bien dans le milieu hospitalier que dans le milieu communautaire (**Mathers et al., 2015**).

La situation épidémiologique est marquée par la diffusion rapide des souches de BLSE de type CTX-M depuis le début des années 2000. Bien que les BLSE soient présentes le plus souvent chez les Entérobactéries, elles sont également rapportées chez d'autres espèces bactériennes tels que *P. aeruginosa* et *A. baumannii* (VEB-1 et PER-1) (Naas *et al.*, 2008).

Les β -lactamases, avec une activité de carbapénèmases les plus répandue chez *A. baumannii* sont les β -lactamases qui hydrolysent la classe D des oxacillines. Ces enzymes sont spécifiques à cette espèce. Parmi les quelles il existe quatre groupes représentés par OXA-23, OXA-24/40, OXA141 et OXA-58 qui peuvent être codées soit par des gènes chromosomiques soit plasmidiques (Poirel et Nordmann, 2006).

La résistance chez *P. aeruginosa* aux antibiotiques peut aussi résulter non pas d'une hydrolyse enzymatique par la production d'une carbapénémase, mais d'une surproduction de la pompe MexAB-OprM et la perte de la porine OprD2. Cette porine possède un site spécifique de liaison aux carbapénèmes et permet la pénétration sélective de l'imipénème (Lahlou Amin *et al.*, 2008).

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 ou plasmidique ou une BLSE avec une diminution quantitative ou qualitative de l'expression des porines. Le second est lié à la production d'une β -lactamase à forte activité hydrolytique vis-à-vis des carbapénèmes (Nordmann et Carer, 2010).

En 2009, une nouvelle métallo- β -lactamase a été décrite à New Delhi, la métallo- β -lactamase (NDM-1) chez *K. pneumoniae* isolée à partir d'un patient rapatrié de l'Inde (Kumarasamy *et al.*, 2010). Ce gène a été identifié par la suite chez d'autres bactéries telles que *E. coli*, *A. baumannii* et *P. aeruginosa* (Kumarasamy *et al.*, 2010 ; Karthikeyan *et al.*, 2010). Récemment NDM-2 variant de NDM-1, enzyme disséminé largement chez les Entérobactéries en particulier *E. coli* et *K. pneumoniae*, a été caractérisé dans une souche d'*A. baumannii* isolée en Allemagne (Decré, 2012).

En Algérie la résistance aux antibiotiques est devenu un problème majeur de santé publique. En effet ces dix dernières années, une importante augmentation de la résistance aux antibiotiques en particuliers chez les bacilles à Gram négatif est constatée. La résistances 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 qu'en milieu communautaire (**Touati et al., 2006 ; Mesli et al., 2008 ; Baba Ahmed et Arlet, 2014 ; Gharout-Saitet et al., 2012 ; Yanat et al., 2014**).

L'isolement des souches d'Entérobactéries productrices de carbapénèmases reste rare en Algérie, la première carbapénémase de type OXA-48 a été isolée chez des patients hospitalisés à l'hôpital militaire à Constantine (**Agabou et al., 2014**), puis chez d'autres isolats de *K. pneumoniae* et *Enterobacter Cloacae* isolées de l'environnement hospitalier à hôpital de Guelma (**Bouguenoun et al., 2016**) et des cafards au niveau de l'unité des brûlés du CHU Batna (**Loucif et al., 2016**).

La diffusion des carbapénèmases de type OXA, VIM-2 et NDM-1 a été rapporté chez des souches d'*A. baumannii* et de *P. aeruginosa* d'origine clinique et environnemental (**Bakour et al., 2012 ; Bakour et al., 2013 ; Mesli et al., 2013 ; Touati et al., 2013 ; Zenati et al., 2016**). La résistance aux carbapénèmases par modification de porine a été également rapporté chez des souches de *P. aeruginosa* isolées de différentes surfaces (**Bouguenoun et al., 2016**).

La contamination de l'environnement hospitalier par des Entérobactéries productrices de β -lactamases de type TEM, SHV, CTX-M, CMY (**Abid et al., 2007 ; Touati et al., 2007 ; Touati et al., 2010 ; Sonna et al., 2013**) a été rapportée en Algérie.

Les polymyxines est l'un des antibiotique de dernier recours pour le traitement des infections graves causées par les bactéries BMR en particuliers *K. pneumoniae*, *A baumannii* et *P. aeruginosa* résistantes aux carbapénèmes (**Biswas et al., 2012**).

Les bactéries à Gram négatif peuvent utiliser plusieurs stratégies pour se protéger en apportant les modifications dans le lipopolysaccharide (LPS) par l'addition du phosphoethanolamine ou du 4-amino-4-arabinose, ou bien la perte totale du (LPS). Ceux-ci incluant des mutations dans les gènes *pmrA / pmrB*, *phoP / phoQ*, *mgrB* et *lpxCAD*. (**Olaitan et al., 2014**). La résistance plasmidique du gène *mcr-1* code une

phosphoéthanolamine transférase capable de modifier le fragment de lipide A, composant de LPS ce qui réduit l'interaction électrostatique entre la colistine et le LPS. Récemment, il a été rapporté que ce gène était le support moléculaire de la résistance à la colistine dans une souche clinique de *Shewanella algae*, à médiation chromosomique (**Telke et Rolain., 2015**).

La résistance à la colistine a été rapportée pour la première fois en Algérie au CHU Béni-Messous d'Alger chez une souche d'*A. baumannii* porté par le chromosome (**Bakour et al., 2014**). En 2016 le gène *mcr-1* a été rapporté par **Yanat et al. (2016)** chez des souches cliniques d'*E. coli* à Oran.

Aujourd'hui malgré tous les efforts qui sont entrepris pour améliorer l'hygiène hospitalière, les infections nosocomiales posent encore un risque important pour la santé des patients.

Dans cette intention, on s'est intéressé dans notre travail à étudier la résistance et la persistance des souches de bacilles à Gram négatifs, isolées de l'environnement hospitalier du service de réanimation du CHU Khelil Amrane de Bejaia.

Pour cela nous avons adopté la démarche expérimentale suivante :

- L'isolement et l'identification des bacilles Gram négatifs à partir de différentes surfaces et dispositifs médicaux, et autres.
- L'évaluation des profils de résistance des souches isolées vis-à-vis des β -lactamines, quinolone, aminoside et la colistine.
- Etudier la capacité des souches résistantes et sensibles à persister sur les surfaces par la formation de biofilm et la production de slim.
- Détermination de l'efficacité de certains désinfectants sur la croissance des souches à Gram négatif.
- Discuter le rôle de l'environnement hospitalier dans la diffusion de la résistance aux antibactériens (antibiotique, désinfectant).

Matériel et méthodes

Notre étude s'est déroulée au niveau du laboratoire de Microbiologie à l'Université A/MIRA de Bejaia durant la période allant du mois de février au mois d'avril 2017.

Durant cette période, 92 prélèvements ont été réalisés sur des surfaces (inerte et vivante), du linge (propre et sale), de l'air, des moustiques et de certains désinfectants (**Tableau I**). Les prélèvements réalisés au niveau de la buanderie ont été effectués dans le but de faire un suivi du linge de ce service, de déterminer le circuit de nettoyage et la source de contamination.

Tableau I : Sites de prélèvement.

Date	Sites de prélèvement		Nombre de prélèvements
26/02/2017	Salle N°3	Poignée de porte, scope non fonctionnel, potence, bordure de lit, table de chevet, bocal d'aspiration, eau de respirateur, scope, appareil respiratoire, linge, pochette d'urine, bordures des fenêtres.	12
	Salle N°4	Poignée de port, scope en marche, sonde urinaire, respirateur, interrupteur, table à chevet, bordure lit, bocal d'aspiration, mure tachée de liquide à proximité de bocal d'aspiration.	09
	Salle N°6	Radiateur, poignée de porte, interrupteur, scope, draps, table de chevet, bordure de lit.	07
	Couloir	Radiateur et bracelet de tension, lit vide sans literie, fiche personnel, télé-d'affichage radios, téléphone, poignée de porte principale, table des dossiers.	07
	Sanitaire	Poignée de porte, lavabo, toilette siège, porte savon, robinet, sol, cuvette toilette portatif, toilette personnel.	09
	Autres	Chambre de garde, bureau de personnel, frigo et armoire salle pharmacie, armoire et casier de bureau personnel, chaise roulante.	07
	Personnel	Infirmier, médecin, agent de garde.	05
	Moustiques	Chambre de patient et buanderie	02
07/03/2017	Air	Salle N°3, N°4 et N°5, couloir, sanitaire personnel et commune, bureau personnel, salle de soin.	12
13/03/2017	Détergents	Eau de javel, détergents, désinfectants.	05
	Buanderie	Machine à lavée (draps, couvertures, vêtements du personnels), chariot, sèche-linge, étagères, table de triage, sac (blanc, jaune).	12
	Linge	Casaque, couverture, les oreillers, linge après lavage, linge propre.	05

I-Prélèvement des échantillons

I-1- Prélèvements de surface et du linge

Les prélèvements ont été réalisés par la méthode d'écouvillonnage qui consiste à frotter une surface à l'aide d'un écouvillon préalablement humidifié dans un bouillon nutritif par des stries. L'écouvillon est réintroduit immédiatement dans le bouillon nutritif en coupant le bâtonnet. Les prélèvements ont été acheminés au laboratoire puis incubé à 37°C/24h à 48h (**French et al., 2004**).

I-2-Prélèvements de l'air

Les prélèvements de l'air ont été effectués par la méthode de sédimentation en laissant les boîtes contenant de la gélose Mac Conkey ouvertes sur différents endroits pendant 4 heures. Les boîtes ont été acheminées au laboratoire puis incubées à 37°C/24h (**Merah, 2009**).

I-3-Prélèvements des moustiques

Le prélèvement des moustiques a été réalisé par les mains (avec des gants). Les moustiques se posant sur les murs sont capturés, puis mis dans un bouillon nutritif et incubé à 37°C/24h.

I-4- Prélèvements des détergents

Les échantillons ont été prélevés à partir de la solution mère. 1ml de chaque solution est ajouté dans 4ml de bouillon nutritif puis incubé à 37°C/24-48h.

II-Isolement et purification

A partir des bouillons nutritifs positifs (présence de trouble) on ensemence une gélose Mac Conkey, additionnée de 0.5µg/ml d'ertapénème pour sélectionner les bactéries à Gram négatif résistantes aux carbapénèmes. 32µg/ml de vancomycine sont ajoutés pour éliminer les bactéries à Gram positif.

Après incubation à 37°C/24h l'aspect des colonies ayant poussés sur le milieu de culture est examinée, dans le cas où la culture est polymicrobienne, on procède à la purification des colonies bactériennes par repiquage successif sur le même milieu.

III-Identification des souches

L'identification des souches de bacilles à Gram négatif a été réalisée selon les critères macroscopiques sur gélose Mac Conkey (aspect des colonies, couleur, taille et forme) et la coloration de Gram. L'orientation de l'identification des souche isolées à été réalisée sur la base de l'aspect des colonies sur milieu chromagar (CHROMagar™ Orientation) (**Annexe III**) puis confirmer par la réalisation d'une galerie biochimique classique (**tableau II**).

Tableau II : Aspect des colonies sur milieu Chromagar (CHROMagar™ Orientation).

Espèces	Couleur de colonies
<i>Escherchia coli</i>	Colonies rose à pourpe.
KES-C (<i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Citrobacter</i>)	Colonies bleu vert à bleues avec ou sans auréole violette.
<i>Proteus mirabilis</i> , <i>morganella</i> , <i>Providencia</i> .	Colonies pales à beiges, cernées d'une auréole ambre à marron.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colonies muqueuses blanches brunâtres.
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Colonies muqueuses blanches opaque.
<i>Enterococcus Sp</i>	Petites colonies bleu turquoise.

III-1-Identification des entérobactéries

Pour l'identification des entérobactéries, une galerie biochimique classique a été réalisée (**AnnexeIV**). Les méthodes d'ensemencement ainsi que les résultats attendus sont présentés dans le **tableau III**.

III-2-Identification des souches non fermentaires

Pour l'identification des bactéries non fermentaires, le test de fermentation des sucres, utilisation du Citrate comme seul source de carbone et croissance à 44°C ont été réalisés, pour l'identification des souches d'*Acinetobacter baumannii*. En plus de ces caractères, la pigmentation en vert nous a permis l'identification des souches de *Pseudomonas aeruginosa*. (**AnnexeV**).

Tableau III: Tests d'identification biochimique (Minor et Richard., 1993).

Test	Méthodes d'ensemencement	Caractère recherchés	Résultat
TSI	A partir d'une suspension bactérienne, on ensemence par piqure centrale le culot de la gélose puis la pente par des stries. Incubation à 37°C/24h.	Fermentation des sucres	Lactose+ : virage de la pente au jaune Glucose+ : virage de culot au jaune Gaz+ : apparition des bulles ou des poches gazeuses qui décalent la gélose du fond de tube H ₂ S+ : noircissement du milieu.
Citrate de Simmons	Ensemencement par des stries sériées la gélose, puis incubé à 37°C/24h à 7jours.	Utilisation du citrate comme seule source de carbone	Un virage au bleu indique un test positif donc alcalinisation du milieu.
Bouillon nitraté	Ensemencement du milieu avec une suspension bactérienne et incubation à 37°C/24h	Production de nitrate réductase	Nitrate réductase+ : virage au rouge du milieu après l'ajout des deux réactifs NR1 et NR2 Le milieu jaune: on ajoute la poudre de zinc. NR- : virage au rouge. NR+ : le milieu reste jaune.
Clark et Lubs	Ensemencement du milieu par l'ajout de quelques gouttes de la suspension bactérienne, puis incubé à 37°C/24h	Déterminer les voies fermentaire	VP+ : virage au rouge cerise après l'ajout des réactifs VP1 et VP2 RM+ : coloration rouge après l'ajout de réactifs RM
Urée-Indole	Ensemencement du milieu avec une suspension bactérienne et incubation à 37°C/24h	Recherche de la production d'indole et de l'uréase.	Urease+ : virage du milieu au rouge /rose. Indole+ : apparition d'un anneau rouge en surface après l'ajout de quelques gouttes de réactifs de Kovacs.

IV-Etude de la résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques a été étudiée par la méthode de l'antibiogramme standard, par la technique de diffusion sur gélose Muller-Hinton, selon les recommandions de l'EUCAST (2017).

IV-1-Préparation de l'inoculum et ensemencement des boites

A partir d'une culture pure de 24 heures, des colonies bien isolées (5 colonies) ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine puis déchargé dans 5ml d'eau physiologique stérile (10^8 UFC/ml). Des boites contenant la gélose de Muller-Hinton ont été ensemencées par écouvillonnage, puis des disques d'antibiotiques (**Tableau IV**) ont été déposés sur la boite à l'aide d'une pince stérile.

IV-2-Lecture

Après incubation à 37°C/24h, les diamètres des zones d'inhibitions obtenues autour des disques ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse. L'interprétation en sensible (S), intermédiaire (I) ou résistant (R), a été faite selon les critères définis par CA-SFM, (2013) et EUCAST, (2017).

Tableau IV : Liste des antibiotiques testés.

Antibiotique		Charge de disque	Marque	Diamètres critiques (mm)				Familles
				Bactéries fermentaires		Bactéries non fermentaires		
				(S)	®	(S)	®	
Céfotaxime	CTX	30µg	Cypress	≥20	<19	/	/	C3G
Céftazedime	CAZ	30µg	Bioanalyse	≥22	<19	≥21	<19	C3G
Céfoxitine	FOX	10µg	Cypress	≥19	<15	/	/	C2G
Amoxyclav	AMC	50µg	Sirscan	≥19	<19	/	/	Aminopénicilline
Aztréonam	ATM	30µg	Himedia	≥24	<21	/	/	Monobactam
Ertapénème	ETP	10µg	Cypress	≥25	<22	/	/	Carbapénèmes
Impénème	IMP	10µg	Cypress	≥22	<16	≥22	<17	Carbapénèmes
Méropénème	MEM	10µg	Oxoid	≥22	<16	≥22	<15	Carbapénèmes
Gentamicine	CN	10µg	Cypress	≥17	<14	≥16	<16	Aminosides
Tobramycin	TOB	10µg	Cypress	≥17	<14	≥16	<16	Aminosides
Ciprofloxacine	CIP	5µg	Cypress	≥22	<19	≥22	<22	Quinolone
Colistine	CTX	50µg	Cypress	≥15	<15	≥15	<15	Plymexine

V-Recherche des phénotypes de résistance aux β -lactamines

V-1-Recherche de la production de β -lactamases à Spectre Etendu (BLSE)

La détection des BLSE chez les entérobactéries a été réalisée par le test de synergie. Qui repose sur la mise en évidence d'une image de synergie entre le disque d'AMC (d'amoxicilline 20 μ g + acide clavulanique 10 μ g) et les disques de céphalosporine de 3^{ème} génération (C3G) (céfotaxime (CTX, 30 μ g), céftazidime (CAZ, 30 μ g) et/ou l'aztréonam (ATM, 30 μ g).

La recherche de cette synergie a été faite dans les conditions standards de l'antibiogramme, en déposant un disque d'AMC à 20mm centre à centre d'un disque de CTX, CAZ et ATM, sur gélose Muller-Hinton. Les boîtes sont incubées à 37°C/24h (**Jarlier et al., 1988**).

V-2-Test de synergie sur gélose Mueller-Hinton additionnée de cloxacilline

Afin d'inhiber l'activité des céphalosporinases naturel ou plasmidique, le test de synergie a été refait sur gélose Muller-Hinton additionnée de 250 μ g/ml de cloxacilline. (**Drieux et al., 2008**).

V-3-Recherche de la production de carbapénèmases

a-Test de Hodge modifié

La production d'une carbapénémase est systématiquement recherchée chez toutes les souches résistantes et/ou de sensibilité réduite aux carbapénèmes par le test de Hodge.

Une boîte contenant de la gélose Mac Conkey additionnée de ZnSO₄ à 75mg/l a été ensemencée par la souche de référence sensible à tous les antibiotiques *E. coli* ATCC25922 puis, un disque d'imipénème a été déposé au centre. Les souches à tester et les souches témoins (témoin positif NDM-1 et témoin négatif *E. coli* ATCC25922) ont été ensemencées à partir du disque jusqu'au bord de la boîte de Pétri.

Après incubation à 37°C/24h, la déformation de la zone d'inhibition à l'intersection entre une strie de la souche testée et la culture d'*E. coli* indique la présence d'une carbapénémase (**Lee et al., 2010 ; CASFM 2013**).

b-Méthode d'inactivation de carbapénème (CIM).

Cette méthode permet une détection de l'activité de la carbapénémase chez les espèces d'entérobactéries mais aussi chez les bactéries non fermentaires comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*.

Dans des tubes à épendoff contenant 500µl d'eau physiologique, des oses de colonies d'une souche témoin négatif *E. coli* ATCC25922, une souche témoin positif NDM-1 et les souches à testées ont été dissoutes. Par la suite des disques de méropénème ont été introduits et incubé 3h à 37°C. Après incubation, les disques ont été retirés des suspensions par une anse de platine et placés sur une gélose Muller-Hintonensemencée préalablement par la souche *E.coli* ATCC25922 et incubé à 37°C/24h (**Van der Zwaluw K et al., 2015**).

VI-Evaluation de la formation de biofilm

III-1-La méthode Rouge Congo Agar (RCA)

La gélose à base de Rouge Congo est un milieu très convenable pour la détection des souches productrices de Slim. Sur ce milieu les souches exprimant le PIA (Polysaccharide Intercellulaire Adhésion) donnent des colonies noires avec une surface rugueuse contre des colonies de couleur rouge et à surface lisse pour les souches PIA négatives (**Ziebuhr et al., 2001**).

a- Préparation de la gélose à base de Rouge Congo: Le milieu est préparé avec 38g/l de bouillon cœur cervelle (BHIB), 20g/l de saccharose, 10 g/l d'agar et 0,8 g/l de Rouge Congo. Le milieu est autoclavé à 115°C pendant 15 minutes puis les boîtes sont coulées, séchées etensemencées avec des colonies jeunes de 24h.

b- Lecture : Après 24 heures d'incubation à 37°C, la production de slim est caractérisé par l'apparition de colonies noires à surface rugueuse contre des colonies rouges à surface lisse pour les souches non productrices (**Ziebuhr et al., 2001**). Les souches de phénotypes variables donnaient des colonies à centre noir et à contour rouge ou à centre rouge et à contour noir (**Nasr et al., 2012**).

VI-2- Méthode de culture de tissu en plaque (TCP)

Les biofilms mono-espèce ont été développées sur des supports en polystyrènes en utilisant des microplaques de 96puits. Le milieu BHIB additionné de 2% de saccharose a été utilisé afin de favoriser la croissance en phase biofilm. Après une culture de 24h, une dilution à 1/100 a été réalisée. 20ul de cette dilution ont été déposés dans chaque puits (3 répétitions pour chaque espèces) et des puits non inoculés ont été utilisés comme témoin négatif.

Après incubation à 37°C/24h, les puits ont été lavés quatre fois avec 20ul de tampon phosphate salin (TPS, pH=7,2) afin d'éliminer les bactéries flottantes planctoniques. Les biofilms formés sont fixés avec l'acétate de sodium à 2%, puis coloré avec du Crystal violet après 30min d'incubation. Les microplaques sont ensuite lavées avec de l'eau distillée stérile et séchées toute la nuit à température ambiante (**Christensen et al., 1985**).

VII-Etudes de l'efficacité d'un désinfectant à usage hospitalier sur la croissance des souches isolées

Différents échantillons de solutions désinfectantes (mains, air, instruments) utilisées au niveau du service de réanimation ont été testés.

a-Préparation des suspensions bactériennes

Les souches bactériennes ont été ensemencées sur gélose Mac Conkey et à partir d'une colonie, un bouillon nutritif de 5ml a été ensemencé puis incubé à 37°C pendant 24h. Soixante microlitres (60ul) de la culture ont été déposés dans 2 ml de bouillon nutritif neuf puis incubé à 37 °C pendant deux heures pour obtenir une culture en phase exponentielle. 200ul de cette culture sont ajoutés à 1,8 ml de bouillon nutritif pour obtenir une suspension de travail (**Rouillon et al., 2006**).

b-Préparation des dilutions du désinfectant

On prend 50 µl du désinfectant brut et on ajoute 9.95ml d'eau distillée pour avoir la dilution 1/200, puis on prend 2ml de cette dilution et on l'ajoute à 2ml d'eau distillée afin d'obtenir la dilution 1/400. On effectue la même chose pour obtenir la dilution 1/800, 1/1600, 1/3200 et 1/6400 (**Rouillon et al., 2006**).

c-Technique

Cette technique nous permet de définir la zone d'activité du désinfectant avec cinq dilutions incluant et encadrant la dilution cible du désinfectant hospitalier (**Rouillon et al., 2006**).

1,8 ml de la suspension de travail a été distribuée dans des tubes à hémolyse puis 200 µl de chaque dilution (de 1/200 à 1/6400) ont été ajoutés. Pour chaque souche deux tubes témoins de stérilité ont été préparés. Le premier tube contient 1,8ml de la suspension de travail et 200µl de bouillon nutritif et le deuxième tube contient 1.8ml de bouillon nutritif et 200 µl du désinfectant.

Les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 24 heures. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque dilution. L'absence de trouble du milieu de culture dans deux tubes permet de déterminer la dilution qui empêche le développement de la croissance des souches étudiées (**Rouillon et al., 2006**).

Résultats

I- Répartition des prélèvements

Au terme de notre étude qui s'est déroulée au niveau du service de réanimation du CHU de Khellil Amrane de Bejaia, 92 prélèvements (inerte et vivant), ont été effectués dont 68 prélèvements de surfaces, 12 prélèvements d'air, 05 prélèvements de détergents/désinfectants, 05 prélèvements de personnel et 02 prélèvements de moustiques (**AnnexeII**).

L'objectif était d'identifier les bactéries à Gram négatif (BGN) résistant aux carbapénèmes en vue de l'amélioration de la prise en charge des patients et de réduire le risque de dissémination des BMR. La répartition des souches isolées par catégorie de prélèvements et représenté dans le **Tableau V**.

Tableau V : Répartition des souches isolées par catégorie de prélèvements.

Catégorie de prélèvements	Nombre de prélèvements	Nombre de souches
Surfaces	68	29
Air	12	04
Détergents/ Désinfectants	05	01
Personnel	05	04
Moustiques	02	02
Total	92	40

II-Répartition des souches par espèce

L'identification des souches isolées a permis, sur la base des caractères morphologiques, biochimiques et sur Chromagar Orientation, de caractériser 40 souches comme étant des bacilles à Gram négatif. Ces souches sont réparties en trois groupes bactériens à savoir *A. baumannii* qui occupe la première place avec 21(52,5%) souches suivi de *P. aeruginosa* avec 13 (32,5 %) souches et enfin des entérobactéries avec 6 (15%)

souches seulement (03 *K. pneumoniae* et 03 *Enterobacter sp*). La répartition des souches selon le groupe est présentée dans la **Figure n° 01**

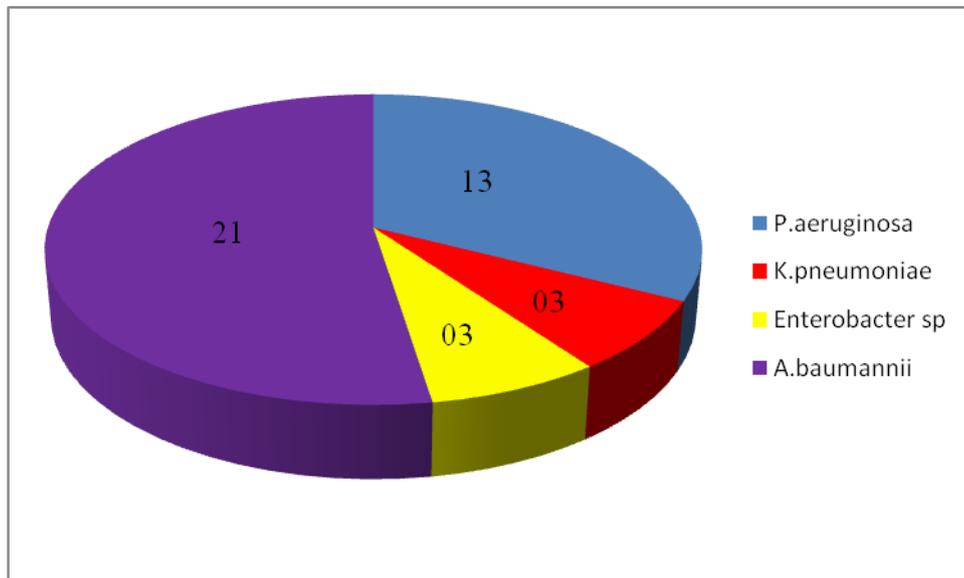


Figure n°01 : Répartition des BGN par espèce

III-Répartition des souches par type de prélèvement

La **figure 02** montre que les souches *A. baumannii* sont les plus isolées à partir des différents prélèvements à savoir des surfaces, de l'air, des moustiques et du personnel. Par contre aucune souche n'a été isolée des détergents. Les souches d'entérobactéries sont isolées principalement des surfaces et de l'air.

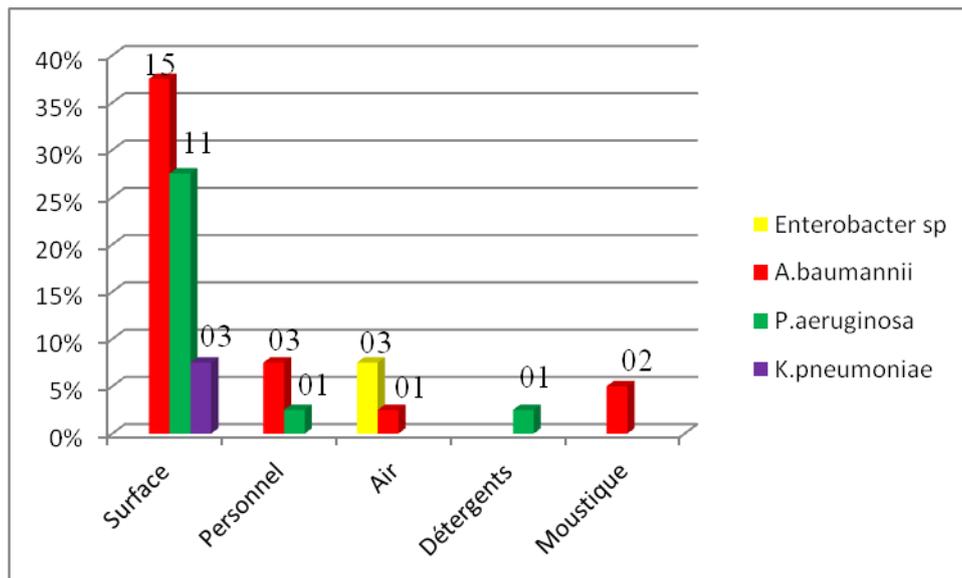


Figure 02 : Répartition des souches par type de prélèvement

IV- Répartition des souches par sites de prélèvement

Le tableau ci-dessous montre la présence des 3 groupes bactériens sur des surfaces à proximité des patients et qui sont isolées principalement à partir des draps et bordures de lits, interrupteur et table de chevet.

La contamination des mains et blouses du personnel soignants ainsi que les agents d'entretients par des souches *A. baumannii* et de *P. aeruginosa* est également remarqué. Par contre uniquement des souches de *P. aeruginosa* sont isolés des sanitaires et des détergents. En plus des souches isolées de l'environnement proche du malade, d'autres souches sont isolées à partir des moustiques présentent dans la chambre de malade et de la buanderie, du linge ainsi que le matériel utilisés pour son nettoyage.

Tableau VI: Répartition des souches par sites de prélèvement

Sites de prélèvement		Espèces	Sites de prélèvement		Espèces
Salle N°3	Scope non fonctionnel	<i>K.pneumoniae</i>	Salle N°4	Scope en marche	<i>K.pneumoniae</i>
	Bordure des fenêtres	<i>A.baumannii</i>		Sonde urinaire	<i>A.baumannii</i>
	Bocal d'aspiration	<i>P.aeruginosa</i>		Respirateur	<i>A.baumannii</i>
	Scope	<i>A.baumannii</i>		Table de chevet	<i>A.baumannii</i>
	Respirateur	<i>A.baumannii</i>		Bordure lit	<i>A.baumannii</i>
	Bordure lit	<i>A.baumannii</i>		Bocal d'aspiration	<i>A.baumannii</i>
Salle N°6	Interrupteur	<i>A.baumannii</i>	Sanitaire	Robinet	<i>P.aeruginosa</i>
	Scope	<i>P.aeruginosa</i>		Sol toilette	<i>P.aeruginosa</i>
	Draps	<i>A.baumannii</i>		Cuvette	<i>P.aeruginosa</i>
	Table de chevet	<i>P.aeruginosa</i>		Robinet	<i>P.aeruginosa</i>
	Moustiques	<i>A.baumannii</i>			
Autres prélèvements	Bureau de personnel	<i>A.baumannii</i>	Buanderie	Machine à lavé	<i>K.pneumoniae</i>
	Table des dossiers	<i>A.baumannii</i>		Casaque	<i>P.aeruginosa</i>
	Ecran d'affichage radios	<i>A.baumannii</i>		Poignée de chariot linge	<i>P.aeruginosa</i>
	Sac blanc	<i>P.aeruginosa</i>		Etagère à linge propre	<i>A.baumannii</i>
	Couchage propre	<i>P.aeruginosa</i>		Moustique	<i>A.baumannii</i>
	Sanibo	<i>P.aeruginosa</i>	Air	Air de la salle de soin	<i>Enterobacter sp.</i>
				Air du couloir	<i>Enterobacter sp.</i>
Personnel	Médecin	<i>A.baumannii</i>		Air sanitaire personnel	<i>Enterobacter sp.</i>
	Infirmier	<i>P.aeruginosa</i>		Air de la salle N°4	<i>A.baumannii</i>
	Agent d'entretien	<i>A.baumannii</i>			
	Agent d'entretien	<i>A.baumannii</i>			

V-Etude de la résistance aux antibiotiques

V-1- Résistance des souches non fermentaires aux antibiotiques

La figure n°03 montre que la majorité des souches d'*A. baumannii* présentent des taux de résistance très élevés aux β -lactamines (imipénème, aztréonam et céftazédime), aux fluoroquinolones (Ciprofloxacine) et aux Aminosides (Tobramycine). Cependant deux souches seulement présentent un diamètre réduit (13 mm) à la colistine.

31% des souches de *P.aeruginosa* sont résistantes à l'imipénème, 15% à la céftazédime et seulement 8 % sont résistantes à la ciprofloxacine, tobramycine et Aztréonam. Tandis qu'aucune souche n'est résistante à la Colistine (**AnnexeVI**).

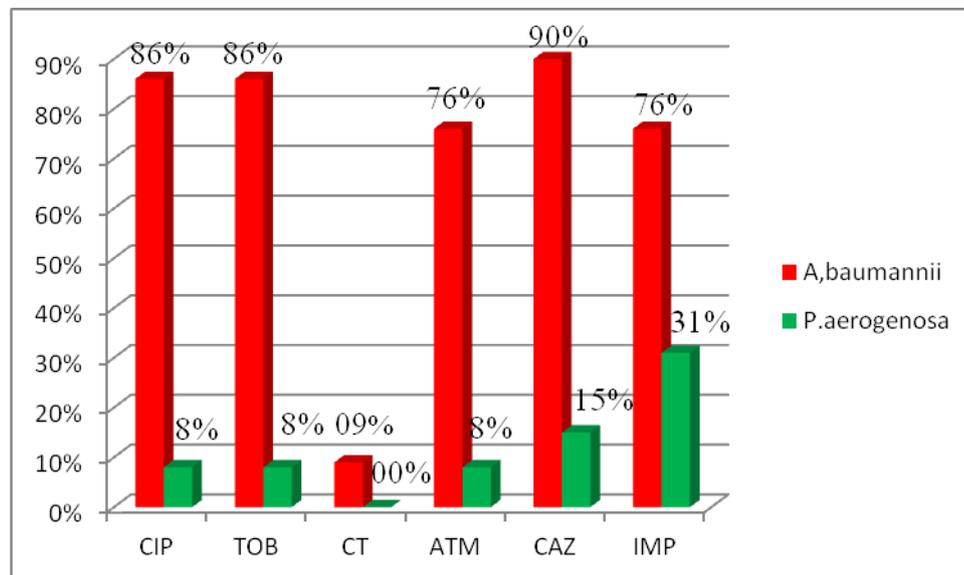


Figure n°03 : Taux de résistance des souches des BGNnF aux antibiotiques.

V-2-Résistance des souches d'entérobactéries aux antibiotiques

La figure n°04 montre que la totalité des souches de *K. pneumoniae* sont résistantes aux β -lactamines ainsi qu'aux aminosides (Tobramycine) et que 2 souches seulement sont résistantes à la Ciprofloxacine.

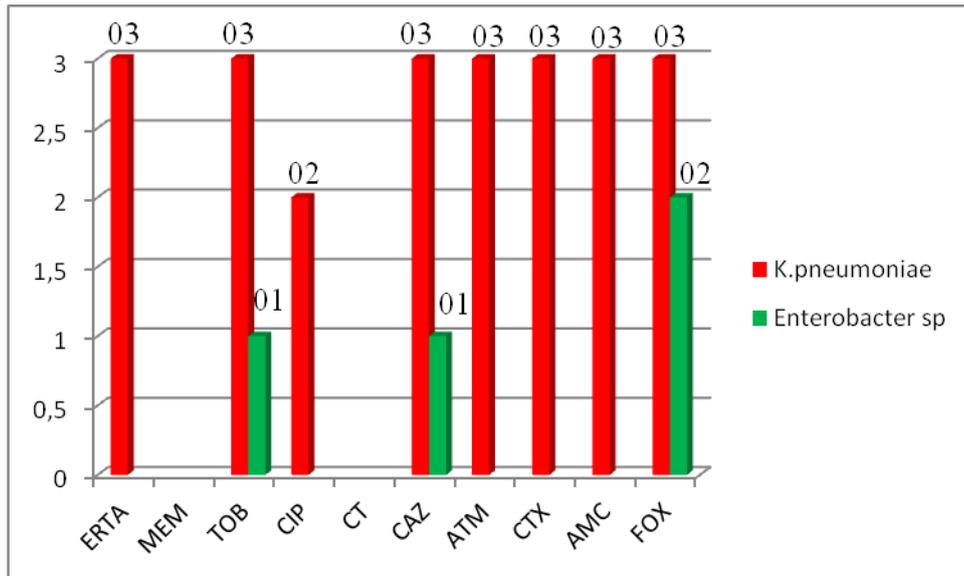


Figure n°04: Nombre des souches d'entérobactéries résistantes aux antibiotiques

VI-Détermination des phénotypes de résistance aux β -lactamines

VI-1-Recherche de la production de BLSE par le test de synergie avec et sans cloxacilline (250 μ g/ml)

Le test de synergie réalisé sur les six souches d'entérobactéries n'a révélé aucune image de synergie. Les souches résistantes à la céfoxitine (3 souches de *K. pneumoniae*) sont testées une autre fois par le test de synergie en présence de la cloxacilline à une concentration de 250 μ g/ml. Le résultat montre l'absence d'une restauration de l'image de synergie chez les souches testées (**Figure 05**).

Tableau VII : Le profil de résistance aux antibiotiques des Entérobactéries

Code	souches	ERTA	MEM	TOB	CIP	CT	CAZ	ATM	CTX	AMC	FOX	BLSE
BAR02	<i>K. pneumoniae</i>	I/ 24	S/31	R/0,6	I/20	S/18	R/0,6	R/0,6	R/0,6	R/0,6	R/0,6	-
BAR16	<i>K. pneumoniae</i>	R/16	S/26	R/11	S/29	S/19	R/0,6	R/0,6	R/0,6	R/0,6	I/16	-
LBAR01	<i>K.pneumoniae</i>	I/24	S/29	R/0,6	R/0,6	S/17	R/0,6	R/0,6	R/0,6	R/0,6	R/0,6	-
Air salle de soin	<i>Citrobacter sp</i>	S/28	S/31	I/17	S/37	S/16	S/23	S/31	S/39	S/22	I/18	-
Air sanitaire personnel	<i>Citrobacter sp</i>	S/30	S/33	S/20	S/46	S/15	S/25	S/33	S/34	S/28	S/22	-
Air couloir	<i>Citrobacter sp</i>	S/29	S/34	S/19	S/37	S/17	I/21	S/30	S/39	S/22	I/18	-

R : Résistante

I : Intermédiaire

S : Sensible



Figure n°05: Test de synergie avec et sans cloxacilline

VI-2- Recherche de la production de carbapénèmases

La recherche d'enzymes ayant une activité de carbapénèmases a été systématique chez les souches résistantes et/ou de sensibilité réduite à l'imipénème, méropénème ou à l'ertapénème, par le test CIM et le test de Hodge modifié.

Le test CIM a été réalisé sur un total de 34 bacilles à Gram négatif (**Annexe VII**). Par contre le test de Hodge a été réalisé uniquement pour les souches (16/34 testées) présentant un résultat intermédiaire ou résistant sur le test CIM afin de confirmer le résultat (**Figure n° 06 et n° 07**).

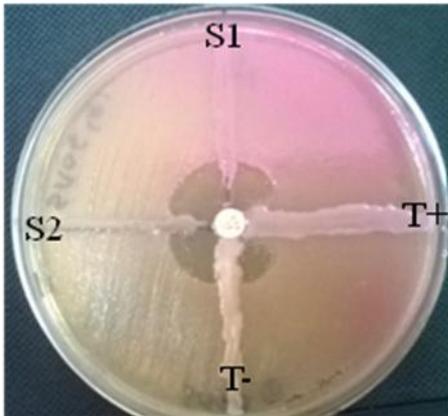


Figure n° 06 :

Image du résultat du test de Hodge

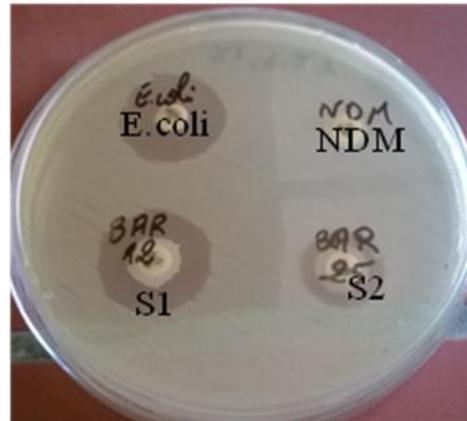


Figure n° 07 :

Image du résultat du test CIM

Le tableau ci-dessous regroupe les phénotypes de résistance des BGN non fermentaires aux carbapénèmes. Les tests utilisés ne permettent pas l'identification du type d'enzymes produites.

Tableau VIII : Phénotype de résistance aux carbapénèmes.

Code	Souche	Sites de prélèvement	Test CIM	Test de Hodge
BAR08	<i>A.baumannii</i>	Scope	Intermédiaire	+
BAR09	<i>A.baumannii</i>	Respirateur	Intermédiaire	-
BAR12	<i>A.baumannii</i>	Bordures fenêtres	Intermédiaire	-
BAR17	<i>A.baumannii</i>	Sonde urinaire	Intermédiaire	+
BAR21	<i>A.baumannii</i>	Table à chevet	Intermédiaire	+
BAR25	<i>A.baumannii</i>	Télé-d'affichage radios	Résistante	-
BAR27	<i>A.baumannii</i>	Interrupteur	Intermédiaire	+
BAR32	<i>A.baumannii</i>	Moustique	Intermédiaire	+
BAR46	<i>A.baumannii</i>	Bureau personnel	Intermédiaire	+
BAR51	<i>A.baumannii</i>	Table roulante	Intermédiaire	+
BAR54	<i>A.baumannii</i>	Personnel médecin	Intermédiaire	-
BAR56	<i>A.baumannii</i>	Agent d'entretien	Intermédiaire	+
BAR air salle 4	<i>A.baumannii</i>	Air	Intermédiaire	+
LBAR03	<i>P.aeruginosa</i>	Casaque	Intermédiaire	-
LBAR07	<i>P.aeruginosa</i>	Poignée de chariot linge	Intermédiaire	+
LBAR16	<i>A.baumannii</i>	Etagères	Résistante	-

VII-Evaluation de la formation de biofilm par les souches étudiées

VII-1- Evaluation de la production de Slim par la technique au Rouge Congo

La recherche de la production de slime sur gélose BHIB additionné de Rouge Congo est positive uniquement pour les souches d'entérobactéries. Deux phénotypes sont observés, des colonies grises et des colonies à centre noir avec surface rugueuse (**Figure 08a,08b**). Par contre des colonies de couleur rouge et lisse sont observés chez les souches de BGNnf non productrice de PIA (**Figure08c**).

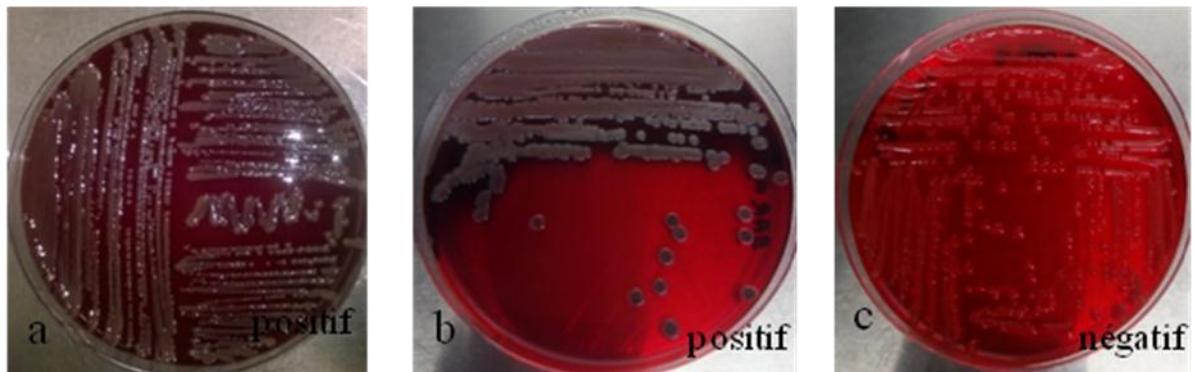


Figure n° 08: Phénotype de production et non production de slim.

VII-2-Formation de biofilm par la technique de culture de tissus sur plaque (TCP)

Selon la technique TCP et sur l'ensemble des quarante souches testées (**Figure n° 09**), 8 souches présentent une forte capacité de formation de biofilm, 11 souches sont modérément formatrices et 21 souches ne forment pas de biofilm.

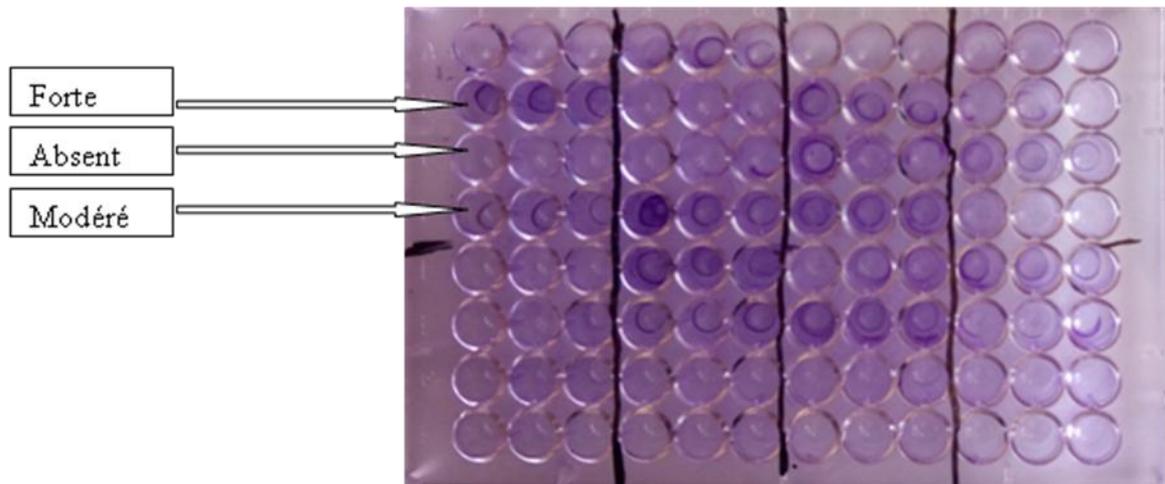


Figure n°09 : Evaluation de la production de biofilm par la méthode TCP.

VII-3-Comparaison de la capacité des souches à former un biofilm par les deux techniques étudiées.

Le tableau ci-dessous nous permet de comparer la capacité des souches isolées à former un biofilm par les deux techniques TCP et RCA.

Tableau IX: Comparaison de la capacité des souches à former un biofilm par les deux techniques d'étude.

Souches	Techniques			
	TCP			RCA
	Forte	Modéré	Absent	
<i>A. baumannii</i>	06	06	09	00
<i>P. aeruginosa</i>	02	04	07	00
Entérobactéries	00	01	05	06

X- Etude de la sensibilité des souches aux désinfectants par la méthode des tubes

Les résultats de la méthode des tubes ont montré que les désinfectants utilisés pour les mains, l'air et les instruments dans le service de réanimation sont inefficaces pour l'élimination des souches isolées de l'environnement de ce dernier.

Le résultat de la dilution 1/200 pour les différents désinfectants (mains, air, instruments) est positif pour toutes les souches testées (**Tableau IX**). Concernant les dilutions 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400 le résultat est identique.

Tableau X: Détermination de la dilution inhibitrice de la croissance des souches vis a vis du désinfectant utilisé pour les mains, air, instruments.

Code	Souche	Bouillon/ souche/ désinfectant	Bouillon/ désinfectant	Bouillon/ Souche	Dilution		
					Main s	Air	Instrumen ts
					1/200	1/200	1/200
BAR04	<i>A. baumannii</i>	+	+	+	+	+	+
BAR06	<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+
BAR08	<i>A. baumannii</i>	+	+	+	+	+	+
BAR09	<i>A. baumannii</i>	+	+	+	+	+	+
BAR12	<i>A. baumannii</i>	+	+	+	+	+	+
BAR17	<i>A. baumannii</i>	+	+	+	+	+	+
BAR23	<i>A. baumannii</i>	+	+	+	+	+	+
BAR25	<i>A. baumannii</i>	+	+	+	+	+	+
BAR30	<i>A. baumannii</i>	+	+	+	+	+	+
BAR32	<i>A. baumannii</i>	+	+	+	+	+	+
BAR39	<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+
BAR44	<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+
BAR45	<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+
BAR46	<i>A. baumannii</i>	+	+	+	+	+	+
BAR51	<i>A. baumannii</i>	+	+	+	+	+	+
BAR53	<i>A. baumannii</i>	+	+	+	+	+	+
BAR54	<i>A. baumannii</i>	+	+	+	+	+	+
BAR56	<i>A. baumannii</i>	+	+	+	+	+	+
L.BAR 01	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+

L.BAR 03	<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+
L.BAR 13	<i>A. baumannii</i>	+	+	+	+	+	+
BAR air S4	<i>A. baumannii</i>	+	+	+	+	+	+
Air sanitair e	<i>Enterobacter sp</i>	+	+	+	+	+	+

La figure ci-dessous est choisie à titre d'exemple pour montrer l'effet des désinfectants à des différentes concentrations sur la croissance des souches des BGN.

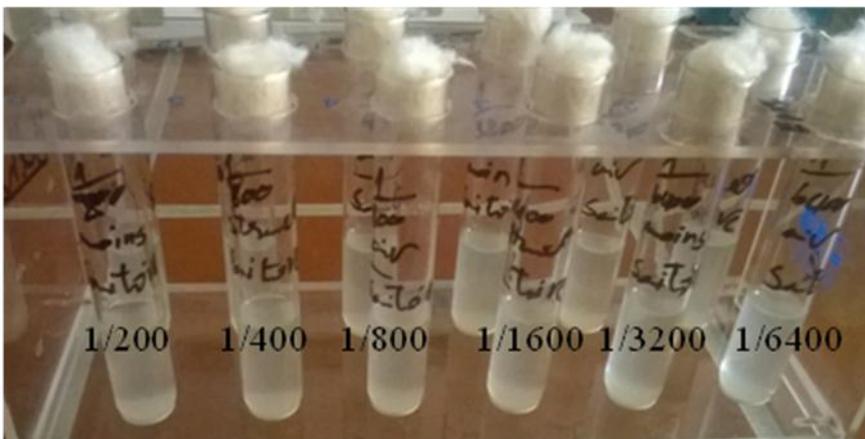


Figure n° 10 : Effet des désinfectants sur la croissance des BGN par la méthode des tubes.

Discussion

L'environnement hospitalier constitue une niche écologique importantes de microorganismes multirésistants pouvant être un réservoir à partir du quel différentes infections peuvent se développer (**Zenati et al., 2016**).

Dans la présente étude, nous avons constaté que le service de réanimation a une fréquence élevée de contamination par les souches de BGN. La présence de bacilles à Gram négatifs sur des surfaces qui entrent en contact fréquemment avec les patients (lits, tables de chevet, draps) suggère une forte probabilité de contamination de ces dernières par la flore endogène. Le tube digestif constitue un important réservoir de bacilles à Gram négatifs (Entérobactéries, *P. aeruginosa* et *A. baumannii*) (**Donskey, 2006**). La substitution d'une souche originale par une souche multi-résistante se produit généralement pendant l'hospitalisation et après une antibiothérapie à large spectre en particulier dans les services de soins intensif tel que la réanimation (**Biendo et al., 2008**).

D'après **Rutala et Weber (2001)**, le contact des patients infectés par des bactéries multi-résistantes avec des surfaces inertes rend ces dernières contaminées. Le personnel médical, les travailleurs et d'autres patients peuvent être contaminés par contact direct avec ces surfaces qui par la suite, deviendront un réservoir secondaire de transmission des germes résistants aux antibiotiques au sein de l'hôpital.

Ces souches sont également isolées des surfaces en contact avec le personnel (table des dossiers, matériels médical, bureau, casier) et suggère l'implication de ce dernier dans la transmission des germes d'un patient à un autre (**Talon, 1999**). La flore retrouvée sur les surfaces dépend de plusieurs facteurs comme l'activité humaine qui entraîne un apport de microorganismes par le patient lui-même, par les soignants et par les visiteurs en particulier en l'absence d'un bio-nettoyage efficace (**Méité et al., 2010**).

D'autres bacilles à Gram négatifs ont été isolés du linge propre et souillés retrouvés au niveau de la réanimation ainsi que le linge du même service qui ce retrouvaient en buanderie. La qualité du linge est l'une des conditions requises pour assurer confort et hygiène au patient hospitalisé. La prévention de l'infection exige un linge de qualité bactériologique et une maîtrise des mesures de protection du personnel des services et de la blanchisserie. Le rôle des oreillers de plumes a été décrit comme étant une source d'infection nosocomiale à *Acinetobacter* et deux cas de méningites post-opératoires à

Bacillus cereus ont eu pour origine l'utilisation de linge humide stocké dans des emballages plastiques (CLIN, 1999).

La transmission des bactéries de patients à patients est bien connue dans le service de réanimation (Traoré et al., 2002). Les insectes sont aussi incriminés dans cette transmission comme les moustiques. Elle s'infecte à la suite d'un repas sanguin sur un sujet infecté (Billker et al., 1998) par la suite le moustique peut infecter une personne saine par une simple pique (Tiburcio et al., 2012).

Des travaux nationaux et internationaux ont rapporté la contamination par des souches d'*A.baumannii*, *P.aeruginosa* et *K.pneumoniae* multi-résistantes de l'environnement hospitalier proche des patients tels que, les draps, bordure du lit, les couvertures et des équipements médicaux. 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 ; Obeidat et al., 2014 ; Stoesser et al., 2014 ; Zenati et al., 2016).

Dans notre travail, on s'est intéressé à l'évaluation de la contamination par les BGN des surfaces, de l'air, des moustiques et de certains détergents. Nos résultats montrent une prévalence de 43,5% dont le principal microorganisme isolé est *A. baumannii* (21/40). Ceci signifie qu'il existe un besoin urgent de comprendre l'épidémiologie de ces microorganismes pathogènes, y compris la mesure dans laquelle des surfaces contaminées contribuent à leur transmission et au développement des infections nosocomiales (Otter et al., 2011). Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Hezouat et Khane en 2016 avec un taux de 77,8% de BGNnf contre 22,2% de BGNf ainsi que par Bellache et Yous en 2013 au sein du même service avec un taux de 69,4% (25/36 souches) de BGNnf et 30,5% (11/36 souches) de BGNf.

Les BGNnf sont considérées comme des pathogènes opportunistes émergents et multi-résistants (Peleget et al., 2008). La multiplication des manœuvres invasives sur des terrains fragilisés (ventilation artificielle, sondage) et la pression de sélection des antibiotiques (Céphalosporines et imipénèmes) utilisés sont des éléments favorisant leur sélection (Benhaj et al., 2010).

La sensibilité des souches d'*A. baumannii* aux β -lactamines et aux autres familles d'antibiotiques montre que ces dernières sont multi-résistantes avec des taux très élevés à l'imipénème (62%), à la céftazidime (90%), aux aminosides et aux quinolones (86%). La colistine présente une meilleure activité contre ces souches avec seulement 10% de résistance. Toutefois, les souches de *P. aeruginosa* montrent une tendance générale à la sensibilité vis à vis des antibiotiques testés à l'exception de la tobramycine (85%) et de l'imipénème (31%).

La résistance élevée aux carbapénèmes (imipénèmes) chez les souches *A. baumannii* rapporté dans cette étude concorde avec celle rapporté par **Zenati et al.**, en (2016) avec un taux de 91,04%. Ces souches ont été isolées de deux CHU en Algérie à partir de différentes surfaces et matériels médicaux et résistent par la production d'une carbapénémase de classe D représenté par OXA-23 et de la class B représenté par NDM-1. La résistance aux C3G (CAZ, ATM) observée est peut être expliquée par la surexpression de la céphalosporinase chromosomique constitutive due à l'insertion de la séquence *Isaba1* en amont de gène *bla_{AmpC}* (**Bertrou et al.**, 2000).

La résistance acquise aux carbapénèmes (imipénème) chez *P. aeruginosa* est rapportée comme liée à un déficit de la porine OprD2. Cette résistance ne s'exprime que si la perte de la porine OprD2 est accompagnée d'une hyperproduction de la céphalosporinase chromosomique (**Philoppon et al.**, 2006). Des mutations dans le système de régulation AmpC entraînent une production stable à haut niveau d'AmpC affectant toutes les β -lactamines à l'exception des carbapénèmes (**Bertrou et al.**, 2000). Un résultat similaire a été rapporté en Algérie par **Bouguenoun et al.**, (2016) pour des souches de *P. aeruginosa* d'origine clinique et environnementale.

En ce qui concerne les Entérobactéries elles représentent une résistance élevée aux β -lactamines, qui est liée à une résistance plasmidique transférable entre les espèces. Cette résistance est associée aux β -lactamase à spectre étendu (BLSE) en particulier la famille CTX-M et les carbapénémases de classe A (KPC), classe D (OXA-48) et de classe B (VIM, IMP, NDM-1 (**Buch**, 2010). Le mécanisme de résistance peut être enzymatique lié à la production de carbapénémases (chromosomique ou plasmidique) ou non enzymatique par imperméabilité ou par système efflux (**Zahar et al.**, 2011).

Le taux de résistance aux aminosides (Tobramycine) est très élevé pour les souches d'*A. baumannii*, *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae*. Cette résistance peut être liée à la production d'enzyme qui sont de type acétylase, adénylase et phospho-transférase (Courvalin et al., 2006). Cette résistance est associée à des mécanismes d'efflux impliquant la pompe Ade ABC chez les souches d'*A. baumannii* (Decré, 2012).

Malgré les effets secondaires, notamment néphro et neurotoxique, la colistine est utilisée avec succès dans le traitement de bactériémies à *A. baumannii* et *P. aeruginosa* Multi-résistantes en association avec d'autres familles d'antibiotiques (Saidani et al., 2006). La résistance à la colistine chez les souches d'*A. baumannii* a été détectée pour la première fois en Algérie au CHU Béni-Messous d'Alger (Bakour et al., 2014). Récemment la résistance plasmidique par le gène *mcr-1* a été rapportée par Yanat et al., en (2016) chez des souches cliniques d'*E. coli*.

Les biofilms sont responsables d'un large éventail d'infections chez l'homme. Plus de 80% des infections bactériennes chroniques sont associées à la présence de biofilms (Hall-Stoodley et al., 2004). Ces derniers peuvent se former à la surface ou à l'intérieur des dispositifs médicaux implantés dans l'organisme (sondes urinaires, lentilles de contact, cathéter veineux, ...). Les microorganismes qui croissent dans un biofilm sont intrinsèquement plus résistants aux agents antimicrobiens (antibiotiques, désinfectants) que les cellules planctoniques (Amy et Kim, 2001). Ils présentent une résistance aux antibiotiques, par diverses méthodes telles que une pénétration limitée de l'antibiotique dans les biofilms, une diminution du taux de croissance des cellules bactériennes et l'expression des gènes de résistance (Afreenish et al., 2011).

La capacité des souches isolées à s'adhérer et à former des biofilms est évaluée par deux méthodes. La méthode de TCP et RCA sont utilisées comme un procédé de criblage général pour la détection de bactéries productrices de biofilm au laboratoire (Bellifa, 2016). Les résultats obtenus par la méthode de Rouge Congo Agar montre que la totalité des souches d'Entérobactéries est positive (possèdent le slime) comparé aux BGNnf. La production de biofilm détecté par la méthode TCP présente une forte formation chez 20% des souches et modéré chez 27,5% des souches testées.

Plusieurs travaux ont démontré que la technique TCP est la plus fiable pour la détection de la formation de biofilm chez des souches cliniques (Oli et al., 2012 ; Bellifa et

al., 2013 ; **Kara Terki et al.**, 2013). Elle permet une détermination quantitative pour comparer et examiner l'adhésion de différentes souches (**Racha et al.**, 2012). Cependant, elle peut être moins précise pour la détermination de la capacité de ces dernières à sécréter le slime (**Castro Melo et al.**, 2013).

Acinetobacter baumannii est une bactérie qui fait partie de la bacteriocenose. Sa présence dans les respirateurs (système de ventilation), où elle peut constituer un biofilm, facilite les pneumopathies. Ainsi, incrustée, il est difficile de l'éliminer par simples mesures d'antibiothérapie et de désinfection (**Joly-Guillou**, 2005).

Les bactéries peuvent acquérir une résistance de plus en plus importante aux désinfectants en particulier lorsqu'ils ne sont pas alternés (**Bekkari et al.**, 2016). La macro-technique en tubes utilisé nous a permis de conclure que les souches isolées de l'environnement hospitalier du service de réanimation et de la buanderie sont résistants aux désinfectants utilisés pour la désinfection de l'air, des mains et des instruments quelle que soit la dilution.

Ces résultats confirment la capacité des souches hospitalières à résister aux agents antimicrobiens utilisés en particulier lorsque ces derniers sont dilués quotidiennement avant utilisation et que les doses et le mode d'emploi ne sont pas respectés. L'ampleur des infections nosocomiales est liée à la capacité des souches bactériennes à survivre plus ou moins longtemps dans l'environnement hospitalier (surfaces, paillasse, sol, murs, tables d'opération, air, matériel médical, tissus, etc...). En effet, les souches résistantes ont une grande capacité d'adaptation aux conditions environnementales et l'utilisation d'un produit biocide à des doses sub-létales constitue un des facteurs favorisant l'émergence de souches résistantes (**Crepy**, 2005). La prévention reste le seul moyen pour limiter le risque d'infections et repose sur la maîtrise des règles d'hygiène et d'asepsie. L'utilisation des bonnes méthodes de désinfections et du nettoyage des surfaces et des matériaux médicaux contribue à la diminution de la population des bactéries multi-résistantes (**Mounier et al.**, 2009).

Conclusion

Actuellement, et après plusieurs études faites sur l'environnement hospitalier, on assiste à l'émergence des bactéries Gram négatifs multi-résistantes. Leurs disséminations dépendent d'une part des réservoirs, d'autre part de la transmission des germes. Les différents réservoirs potentiels de ces bactéries sont les patients eux même, le personnel soignant, le matériels médical, et l'environnement.

Ces agents pathogènes nosocomiaux peuvent bien survivre ou persister sur des surfaces durant des mois et peuvent ainsi être une source de transmission en continu en l'absence de désinfection régulière préventive des surfaces.

Dans cette optique, notre étude qui s'est déroulée au niveau du service de réanimation du CHU Khelil Amrane de Bejaia, a porté sur l'isolement, l'identification biochimique, l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches de bacilles Gram négatifs, ainsi que leur capacité à forme un biofilm et la persistance aux désinfectants.

Sur les 92 prélèvements effectués au niveau des surfaces, air, personnel, moustique et détergents, et après les résultats de l'identification, 40 souches ont été isolées et identifiées, dont 21 souches d'*Acinetobacter baumannii*, 13 *Pseudomonas aeruginosa*, et 6 appartenant aux Enterobacteries (3 *Klebsiela pneumoniae*, 3 *Citrobacter sp*).

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a montré que les souches de BGN isolées expriment une résistance à tous les antibiotiques testés des différentes familles, mais à des degrés variables. Les taux de résistance les plus élevés ont été marqués à l'égard des différentes β -lactamines, aminosides (Tobramycine) ainsi que les fluoroquinolones (ciprofloxacine). Cette résistance montre un profil de multi-résistance particulièrement à l'imipènème et une émergence aux antibiotiques de dernier recours (la colistine) chez *A. baumannii*.

Ces résultats confirment que l'environnement hospitalier dans le service de réanimation est fréquemment contaminé par des BMR malgré les mesures d'hygiène renforcé.

Les études d'adhésion bactérienne et de formation du biofilm réalisées par les méthodes TCP et Rouge Congo Agar, ont montré que les souches isolées étaient productrices

de biofilm et de slime. Et une méthode de macro-plaque en tube à montrée la persistance des germes aux différents désinfectants utilisés au service de réanimation.

Ces résultats nous incitent à proposer des recommandations au sein des structures de soins. Il s'agit particulièrement du renforcement de l'application des mesures générales d'hygiène, et plus précisément l'hygiène des mains et de l'environnement hospitalier (surface, air, eau,...). La sensibilisation du personnel soignant et des agents d'entretien concernant le risque de ces BMR souvent sous-estimé.

Ainsi, la maîtrise de la contamination des surfaces hospitalières passe par la réalisation des contrôles microbiologiques régulier afin de déterminer leurs degré de contaminations, l'écologie microbienne et de comprendre les mécanismes impliqué dans leurs persistance, leurs mode de transmission et leurs capacité à survivre et causé des infections dans les établissements de santé.

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

- ✓ La détermination de l'évolution de la contamination de l'environnement hospitalier dans le temps.
- ✓ 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.
- ✓ L'étude moléculaire pour déterminer les mécanismes impliqués dans la résistance aux antibiotiques.
- ✓ La détermination de l'efficacité des produits utilisés dans la désinfection des surfaces et des locaux et la capacité des souches à persister et à former des biofilms.

Bibliographie

A

Abid F., Boutefnouchet N., Dekhil M., Bouzerna N. (2007). *Klebsiella pneumoniae* productrices de Beta-lactamases à Spectre Elargi(BLSE) isolées dans les hopitaux de la ville d'Annaba, Algéri. Scientific Study et Research. : 199-214.

Afreenish H., Javaid U., Kleem F., Omair M., Khalid A., Iqbal M. (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. Brazillian journal of Infection Diseases. 15 (4):1413-8670.

Agabou A., Pantel A., Ouchenene Z., Lezzar N., Khemissi S., Satta D., Sotto A., Lavingne J-P. (2014). First description of OXA-48-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone ST131 from patients hospitalized at a military hospital in Algeria. Eur J Clin microbial Infect Dis. 33:1641-1646.

Ambler R. P. (1980). The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond (Biol)*. 289: 321-331.

Amy L., et Kim L. (2001). Biofilms and Planktonic Cells of *Pseudomonas aeruginosa* have Similar Resistance to Killing by Antimicrobial. Journal of Bacteriology. 183(23):6746-6751.

Anonyme. (2009). Recommandations nationales. Prévention de la transmission croisée. Hygiènes. Volume XVII-N° 2.

B

Baba Ahmed K., et Arlet G. (2014). News of antibiotic resistance among Gram-negative bacilli in Algeria. Pathol Biol.2014; **62**:169-78.

Bakour S., Kempf M., Touati A., et al. (2012). Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in two university hospitals in Algeria. J Med Microbiol. 61: 1341-3.

Bakour S., Touati A., Sahli F., Ait Aneur A., Haouchine D., Rolain J. M. (2013). Antibiotic resistance determinants of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Algeria. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 76: 529-531.

Bakour S., Olaitan A. O, Ammari H., Touati A., Saoudi S., Saoudi K., Rolain JM. (2014). Emergence of colistin-and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 clinical isolate in Algeria. First case report. Microb Drug Resist. 21(3):279-85.

Bellache et Yous (2013). Caractérisation des phénotypes de résistance aux b-lactamines chez les souches de bacilles à Gram négatif isolées de l'environnement hospitalier (cas de CHU de Bejaia). Mémoire fin de cycle.

Bellifa S., Hassaine H., M'hamedi I., Kara-Terki I., Lachachi M., Didi W., (2013). Formation of biofilm in microfermentor by *Klebsiella pneumoniae* isolated from medical devices at the university hospital of Tlemcen. 4th International Woekschop on Biotechnology. Tlemcen. Algeria.

Bellifa S., Hassaine H., Kara I., Terki M'hamedi I., Lachachi M., Benamar I., Morghad T., Gaouar S. (2016). Study of Biofilm Production and Antimicrobial Resistance Pattern of *Kleibseilla Pneumoniae* Isolated from Urinary Catheter at the uUniversity Hospital of Tlemcen. Tlemcen, Algeria.3(2):13-17.

Bekkari H., Touijer H., Berrada S., Ettaybi M., Benchemsi N., Maniar S., El Ouali., Lalami A. (2016). Evaluation de la contamination des eaux utilisées en milieu hospitalier : Effets d'antibiotiques et de désinfectant usuels sur les germes isolés. Maroc. Laboratoire de biotechnologie, Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Maroc. 11 :34-39.

Ben Haj K., et Khedher M. (2010). Fréquence et profil de sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées des hémocultures au chu de mahdia. Revue Tunisienne d'infectiologie. 3 : 92 – 95.

Bertrou A., Chapuis C., and Hajjar J. (2000). Relations entre contamination et environnement hospitalier. *In : Vigilance Environnementale : Contrôles microbiologiques de l'environnement hospitalier. Hygiènes.* **8** (3): 142-146.

Biendo M., Manoliu C., Laurans G., Castelain S., Canarelli B., Thomas D., Hamdad F., Rousseau F., and François E. (2008). Molecular typing and characterization of extended spectrum TEM, SHV and CTX-M β -lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *Res Microbiol.* **159**: 590-594.

Billker O., Lindo V., Panico M., Etienne A. E, Paxton T., Dell A., Rogers M., Sinden R. E, Morris H. R. (1998). Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature* 392: 289-292.

Biswas S., Brunel J-M., Dubus J-C., Reynaud-Gaubert M., and Rolain J-M. (2012). Colistin : an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Rev Anti Infect Ther.* **10**:917-34.

Bouguenoun W., Bakour S., Bentorki A., Al Bayssari C., Merad T., Rolain J-M. (2016). Molecular epidemiology of environmental and clinical carbapenemase-producing Gram-negative bacilli from hospitals in Guelma, Algeria: Multiple genetic lineages and first report of OXA-48 in *Enterobacter cloacae*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 7 135-140.

Bousseboua H. (2005). Éléments de microbiologie : programme de graduation : biologie, médecine, pharmacie, chirurgie dentaire, sciences vétérinaires, sciences alimentaires, agronomie. 2^{ème} édition. Edition Campus-Club, 304p.

Brun-Buisson C. (2005). Risques et maîtrise des infections nosocomiales en réanimation : texte d'orientation SRLF/SFAR. *Réanimation ; vol.14, p. 463-471.*

Bush K., George A., Jacoby. (2010). Updated Functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother. Rev.*54:969-976.

C

Campanac C., Pineau L., Payard A., Baziard-Mouysset G., Roques C. (2002). Interactions between Biocide Cationic Agents and Bacterial Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.*46, 1469-1474.

CA-SFM (2013). Comité français de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.

Christensen G. D, Simpson W. A, Younger J. J, Baddour L. M, Barrett F. F, Melton D. M, Beachey E. H. (1985). Adherence of coagulase negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* 22:996–1006.

Clin. (1999). Le circuit du linge a l'hôpital. Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales de l'Inter région Paris-Nord.

Courvalin P., Leclerc R., Bingen E. (2006). 2^{ème} Ed. Antibiotigramme. Paris:ESKA.349-363.

Crepy M. N. (2005). Dermatoses professionnelles aux détergents. Documents pour le Médecin du travail N°103,3^{ème}trimestre. 72 :37-84.

D

Decré D. (2012). *Acinetobacter baumannii* et résistance aux antibiotiques : un Modèle d'adaptation. *Revue francophone des laboratoires.* 441 : 43-52

Donskey C. J. (2006). Antibiotic Regimens and Intestinal Colonization with Antibiotic-Resistant Gram-Negative Bacilli. *Clin Infect Dis.* **43** : S62-69.

Drenkard E. (2003). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* 5(13):1213-9.

Drieux L., Brossier F., Sougakoff W., Jarlier V. (2008). Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect.* 1:90-103.

E

EUCAST (2017). EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING.

F

Filloux A., Vallet I. (2003). Biofilm: set-up and organization of a bacterial community. *Med Sci (Paris).*19(1):77-83.

French G. L, Otter J. A, Shannon K. P, Adams N. M. T, Watling D, and Parks M. J. (2004). Tackling contamination of the hospital environment by methicilline-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a comparison between conventional terminal cleaning and hydrogen peroxide vapor decontamination. *J Hosp infect.* **57**:31-37.

G

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

H

Haddadi A. (2013). Construction d'un score prédictif du risque nosocomial pour des patient de reanimation. These de doctorat d'épidémiologie, économie de la santé et prévention. Université de droit et de la santé Lille 2.

Hall-Stoodley L., Costerton J. W., Stoodley P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2(2): 95-108.

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

Handal T, Oslen I. 2000. Antimicrobial résistance with focus on oral bêta-lactamases. *Eur J Oral Sci.* 108: 163-174. **Héritier C, Poierel L, et Fournier PE. 2005)** Characterisation of the naturally –occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agent chemotherapy.* **49:**4174-9(a)

J

Jarlier V., Nicolas M. H., Fournier G., et Philippon A. (1988). Extended-broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae* : hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis.* **10:** 867-878.

Joly-Guillou M. L. (2005). Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin Microbiol Infect.* 11: p. 868-73.

K

Kara-Terki I., Hassaine H., Bellifa S., M'hamedi I., Lachachi M. (2011). Infection urinaire nosocomiale : Etude prospective dans une unité de réanimation médicale à l'ouest Algérien. *Revue de Microbiologie Industrielle Sanitaire et Environnementale* .6(1) : 118-130.

Karthikeyan K., Thirunarayan M. A, Krishnan P. (2010). Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and armA in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J Antimicrob Chemother.* 65: 2253-4.

Kumarasamy K. K, Toleman M. A, Walsh T. R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2010; 10: 597-602.

L

Lahlou Amin I., Salord H., Gille Y., Roure C., Tigaud S., Bajou T., Ratbi N., Kassmi H. L. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* et résistance isolée à l'imipénème : clone émergent en milieu hospitalier. *Les techniques de laboratoire.* 11 : 4-9.

Lee K., Kim C. K, Yong D., Jeong S. H, Yum J. H, Seo Y. H, Docquier J. D, et Chong Y. (2010). Improved performance of the modified Hodge test with Mac Conkey agar for screening carbapenemases producing Gram-negative bacilli. *Journal of Microbiological Methods* 83: 149-152.

Loucif L., Gacemi-Kirane J., Cherak Z., Chamlal N, Grainat N., Rolain J. M. (2016). First Report of German Cockroaches (*Blattella germanica*) as Reservoirs of CTX-M-15 Extended-Spectrum-β-Lactamase- and OXA-48 Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* in Batna University Hospital, Algeria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 60.10:6377-6379.

M

Mathers A. J, Peirano G., Pitout J. D. (2015). The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. Clin Microbiol Rev. 2015; **28**:565-91.

Massicotte R., Bédard S., Boudreault S., Dumont J., Marchand R. (2009). Environnement .Désinfectantset désinfection en hygiène et salubrité : principes fondamentaux.P51.

Merah M. (2011). Contribution à l'Etude qualitative de Quelques Groupes de Bacteries Isolees du Bloc Operatoire de l'Etablissement Public Mohamed Boudiaf de Ouargla : Profil et Sensibilite aux Antibiotiques. Annales de la Faculté des Sciences et Sciences de l'Ingénieur
Vol. 1 N° 4/2009.

Mesli E., Berrazeg M., Drissi M., Bekkhoucha S. N, Rolain J. M. (2013). Prevalence of Carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo- β -lactamase in *Acinetobacter species*, Algeria. (2013). Int J Infect Dis. 16: S1201-9712.

Méité S., Boni-cissé C., Monemo P., Mlan Tonoa A. P, Faye-Ketté H., Dosso H. (2010). Surveillance microbiologique des surfaces au niveau d'un établissement hospitalier de niveau Tertiaire : exemple du CHU de Yopougon, abidjan, Côte Divoire.International journal of pharmacy and biological science.11(1) :73-81.

Minor C., and Richard C. (1993). Notes techniques. In : Méthodes de laboratoire pour L'identification des entérobactéries. Ed. Institut pasteur. Paris. 217p.

Mounier M., Pestourie N., Denis F. (2009). Les détergents et les désinfectants : rôle en médecine (1^{ère} partie). 11(3) :177-184.

N

Naas T., Poirel L., Nordmann P. (2008). Minor extended-spectrum beta-lactamase. *Clinical Microbiology Infection*.14:42-52.

Nasr S. A, Abushay H. M, Hussein H. S. (2012). Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of staphylococci. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* Volume 13, Issue 3, Pages 269-274.

Nordmann P., Carrer A. (2010). Les carbapenemases des enterobacteries. *Archives de Pediatrie*. 17, 154-162.

O

Obeidat N., Jawdat F., Al-Bakri A. G, Shehabi A. A. (2014). Major biological characteristics of *Acinetobacter baumannii* isolates from hospital environmental and patients respiratory tract sources. *American Journal of Infection Control*. 42 : 401-4.

Olaitan, A. O. S. M, Diene M., Kempf M., Berrazeg S., Bakour S. K, Gupt B., Thongmalayvong K., Akkhavong S., Somphavong P., Paboriboune K., Chaisiri C., Komalamisra O. O, Adelowo O. E., Fagade O. A., Banjo A. J, Oke A., Adler M. V, Assous S., Morand D., Raoult J. M., and Rolain. (2014). "Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator mgrB: an epidemiological and molecular study." *Int J Antimicrob Agents*. **44**(6): 500-507.

O'Shea M. K. (2012). *Acinetobacter* in modern warfare. *Int J Antimicrob agents*.**39**:363-75.

Otter J. A, Yezli S., GL French. (2011). The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 32(7): 687-699.

P

Peleg AY., Seifert H., Paterson DL. (2008). *Acinetobacter baumannii* : emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*; 21:538-82.

Philipplon et Arlet. (2006). β -Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel. *Annales de Biologie Clinique*. Volume 64, Revue générale. 1 : 37-51.

Pidello A. (2014). Principes de chimie redox en écologie microbienne. Editions Quæ, Paris. P: 115.

Poirel L., Nordmann P. (2006). Résistance aux β -lactamines chez *Acinetobacter baumannii* : évolution et émergence de nouveaux mécanismes. *Antibiotiques*. Edition Masson. 8 (2) 100-107

R

Racha A. N., Abu Shady H. M., Hussein H. S. (2012). Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of staphylococci. *Egyptian Journal of Medical. Human and Genetic* .13: 269–274.

Réseau REA-RAISIN (2013). Surveillance des infections nosocomiales en réanimation adulte, France, Résultats 2012. Saint-Maurice : Institut de veille sanitaire. 38 p.

Rouillon S., Ourdanabia S., Jamart S., Hernandez C., et Meunier O. (2006). Etude de l'efficacité d'un produit détergent désinfectant pour sols et surfaces sur les souches bactériennes isolées à partir de l'environnement hospitalier. *Pathologie Biologie*. 54 .325-330.

Rutala W. A, and Weber D. J. (2001). Surface disinfection: should we do it? *J Hosp Infect*. 48 S64-S68.

S

Saidani M., Boutiba I., Ghozzi R., Kammoun A., Ben Redjeb S. (2006). Profil bactériologique des bactériémies à germes multirésistants à l'hôpital Charles-Nicolas de Tunis. *Med Mal Infect* 36:163-166.

Souna D., Amir A., Bekhoucha A., Berrazeg M., ET Drissi M. (2014). Article Molecular typing and characterization of TEM, SHV, CTX-M, and CMY-2 β -lactamases in *Enterobacter cloacae* strains isolated in patients and their hospital environment in the west of Algeria. *Medecine et maladies infectieuses* 44 : 146-152.

Stoesser A. E, Giess M., Batty A. E., Sheppard A. S., Walker D. J., Wilson X., Didelot A., Bachir R., Sebra A., Kasarskis 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. Genome Sequencing of an Extended Series of NDM-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Neonatal Infections in a Nepali Hospital Characterizes the Extent of Community-versus Hospital Associated Transmission in an Endemic Setting. *Antimicrob Agents Chemother.* **58** (12) : 2014. 7347-7357.

T

Tallon D, (1999). The role of the hospital environment in the epidemiology of multiresistant bacteria. *Journal of Hospital Infection.*43:3117.

Telke AA., Rollain JM. (2015). Functional genomics to discover antibiotic resistance genes: The paradigm of resistance to colistin mediated by ethanolamine phosphotransferase in *Shewanella algae* MARS 14. *Int J Antimicrob Agents.* 46,648-652.

Tiburcio M., Niang M., Deplaine G., Perrot S., Bischoff E., Ndour P. A, Silvestrini F., Khattab A., Milon G., David P. H., Hardeman M., Vernick K. D., Sauerwein R. W., Preiser P. R., Mercereau-Puijalon O., Buffet P., Alano P., Lavazec C 2012. A switch in infected erythrocyte deformability at the maturation and blood circulation of *Plasmodium falciparum* transmission stages. *Blood* 119: e172-180. doi: 10.1182/blood-2012-03-414557.

Touati A., Zenati K., Brasme L., Benallaoua S., Champs C. (2010). Extended-spectrum beta-lactamase characterization and heavy metal resistance of *Enterobacteriaceae* strains isolated from hospital environmental surfaces. *J. Hosp. Infect.*75:78-79.

Touati A., Benallaoua S., Djoudi F., Madoux, Brasme L., Champs C. (2007). 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.

Touati A., Benallaoua S., Forte D., Madoux J., Brasme L., and de Champs C. (2006). First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 betalactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Bejaia, Algeria. *Int J Antimicrob Agents.* 27:397-402.

Tuoati M., Diene Seydina M., Dekhil M., Djahoudi A., Racherache A., Rolain J. M. (2013). Déssimination of a class I integron carrying VIM-2carbapénèmase in *pseudomonas aeruginosa* clinical Isolates from a hospital intensive care unit in Annaba, Algeria.*Antimicrobial Agents and chemotherapy.*57 (5):242-2427.

V

Van der Zwaluw K., de Haan A., Pluister GN., Bootsma HJ., de Neeling AJ., Schouls LM. (2015). The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a simple and Low-Cost Alternative for the Carba NP Test to Asses Phenotypic Carbapenemase Activity in Gram-Negative Rods. *Plos ONE* 10 (3) : e0123690.

Y

Yanat B., Vinuesa T., Miguel V., Touati A. (2015). Determinants of quinolone resistance in *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infection in bejaia, algeria. Asian pacific journal of tropical medicine.462-467.

Yanat B., Jesus M. (2016). First report of the plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-1 in clinical *Escherichia coli* isolate in Algeria. International Journal of Antimicrobial Agents.

Z

Zahar J. R., Grall I., Kouatchet A.T. (2011). Carbapénèmes : nouvelles molécules, différents indications ? La lettre du pharmacologue.25 :16-20.

Zeibuhr W., Lobner I., Krimmer V., Hacker J. (2001). Methods to detect and analyse phenotypic variation in biofilm-forming. Methods in Enzymology. 336: 195-203.

Zenati K., Touati A., Bakeur S., Sahli F., Rolain J. M. (2016). Characterisation of NDM-1 and OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates from inanimate surface in a hospital environment in Algeria. Journal of hospital Infection 92(1):19-26.

Annexes

Annexe I

Composition des milieu de culture (g/l d'eau distillée)

(Minor et Richard, 1993)

Gélose Mac conckey

- Peptone de caséine.....17g
- Peptone de viande03g
- Lactose.....10g
- Mélange de sels biliaires.....1,5g
- Rouge neutre.....0,03g
- Chlorure de sodium.....05g
- Cristal violet.....0,001g
- Agar.....13,5g
- PH=7,1

Gélose de Miller Hinton

- Infusion de viande de bœuf.....2g
- Hydrolysate de caséine.....17,5g
- Amidon.....1,5g
- Agar.....17g
- PH=7,4

Gélose TSI

- Extrait de viande.....03g
- Extrait de levure.....03g
- Peptone tryptique.....20g
- Chlorure de sodium.....05g
- Lactose.....10g
- Sacrose.....10g

- Glucose.....01g
- Thiosulfate de sodium.....0,3g
- Rouge de phénol.....0,025g
- Sulfate ferrique.....0,2g
- Agar.....12g
- PH=7,3

Milieu Citrate de Simmons

- Phosphate d'ammonium.....01g
- Phosphate bipotassique.....01g
- Chlorure de sodium.....05g
- Citrate de sodium.....05g
- Sulfate de magnésium.....0,20g
- Bleu de bromothymol.....0,80g
- Agar.....18g
- PH=6,9

Bouillon nitraté

- Infusion de cœur cervelle.....25g
- Nitrate de sodium.....10g
- PH=7,6

Bouillon nutritif

- Macération de viande.....10g
- Peptone.....05g
- Chlorure de sodium.....05g
- PH=7,3

Milieu Clarck-lubs

- Peptone trypsine de viande05g
- Phosphate bi potassique.....05g

- Glucose.....06g
- PH=7

Milieu Urée –indole

- Urée.....02g
- L-Tryptophane.....03g
- Chlorure de sodium.....0,5g
- Dihydrogénophosphate de potassium.....0,1g
- Rouge de phénol.....0,0025g
- PH=7

Eau peptone exemple indole

- Peptone exemple d'indole.....10g
- Chlorure de sodium.....05g
- PH=7,2

Bouillon coeur-cervelle (BHIB)

- Infusion de cervelle de veau.....12.5g
- Infusion de coeur de bœuf.....05g
- Peptone.....10g
- Glucose.....02g
- Chlorure de sodium.....02g
- Phosphatase di sodique.....05g
- pH= 7.4

Préparation : 37g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C, 20min

Rouge Congo Agar

- Cœur cervelle.....37g
- Saccharose.....50g
- Rouge Congo.....0.8g

- Agar10g
- Eau distillée.....1L
- pH= 7

Composition des réactifs utilisés

NRI

- Acide sulfanique.....0,8ml
- Acide acétique5N100ml

NRII

- Diméthylamine.....0,6g
- Acide acétique 5N.....100ml

Réactif de Kovac

- Alcoolamylique ou isoamylique..... 150ml
- P.diméthylaminobenzadehyde.....10ml
- Acide chlorhydrique concentré.....50ml

Rouge de méthyl(RM)

- Rouge de méthyl.....0,5ml
- Alcool éthylique à 60 %..... 100ml

Réactifs de voges-proskauer

VPI

- α -naphtol.....06g
- Alcool à 90°..... 100ml

VPII

- NaOH 4N

Tampon phosphate salin (TPS) (Hamilton, 2003)

- NaCl.....137mM
- KCl.....2,7 mM
- Na₂HPO₄10 mM
- KH₂PO₄.....1,76mM
- Eau distillée.....1000 ml
- pH = 7,4

Annexe II

Nombre de prélèvement et les souches recueillies par sites

Sites de prélèvements		Nombre de prélèvements	Nombre de souches	Sites de prélèvements		Nombre de prélèvements	Nombre de souches
Chambres des patients	Poignée de porte	03	00	couloir	Fiche personnel	01	00
	scope	03	03		Table des dossiers	01	01
	Bordure de lit	03	02		Lit vide	01	00
	Table de chevet	03	02		radios	01	01
	respirateur	02	02		téléphone	01	00
	Bocal d'aspiration	02	02		Poignée de porte	01	00
	interrupteur	02	01		radiateur	01	00
	Scope non fonctionnel	01	01	Sanitaire	Poignée de porte	01	00
	Eau de respirateur	01	00		lavabo	01	00
	potence	01	00		Siège toilette	01	00
	draps	02	01		Porte savon	01	00
	Bordures des fenêtres	01	01		Robinet	01	02
	Sonde urinaire	01	01		Cuvette toilette portative	01	00
	Pochette d'urine	01	00		sol	01	01
	Radiateur	01	00		Cuvette toilette personnel	01	01
	Radiateur	01	00				

Air	Couloir	01	01	Air	Salle des patients	06	01	
	Sanitaire	02	01		Bureau personnel	02	00	
	Salle de soin	01	01		Moustiques	02	02	
Personnel	Médecin	01	01	Insectes	Chaise roulante	01	00	
	Infirmier	01	01		Chambre de garde	03	00	
	Agent de garde	03	02		Bureau personnel	01	01	
Buanderies	Machine à lavé	05	01	Autre	Frigo et armoire de salle pharmacie	02	00	
	Chariot linge propre	01	00		Armoire, casier de bureau personnel	02	00	
	Sèche-linge	01	00		Linge	Casaque	01	01
	Sac	02	01			Couverture	01	00
	Table de triage	01	00			Les oreillers	01	00
	Pognée de chariot	01	01			Couchage propre	01	01
	Étagère	01	01			Linge après lavage	01	00
Détergents	Sanibo	01	01	Total	39	12		
	Désinfectants	01	00	Total prélevements	92			
	Eau de javel	03	00	Total souches	40			

Annexe III-IV

Aspect des colonies sur milieu Chromagar (CHRMagar™Orientation).

Espèce	Couleur des colonies
K.pneumoniae	Colonies bleu vert à bleues avec ou sans auréole violette
Enterobacter sp	Colonies bleu vert à bleues avec ou sans auréole violette.
A.baumannii	Colonies muqueuses Blanche opaque
P.aeruginosa	Colonies muqueuses blanches brunatre

Lecture de la galerie classique.

Sites de prélèvements	Souche	Glucose	Lactose	Gaz	H2S	Urease	nitrate riductase	Eau peptonée	RM	Citrate
Salle 03(02)	K.pneumoniae	+	+	+	-	+	+	-	-	+
Salle04(16)	K.pneumoniae	+	+	+	-	+	+	-	-	+
Air salle de soin	Enterobacter sp	+	+	+	-	-	+	-	+	+
Air sanitaire personnel	Enterobacter sp	+	+	+	-	-	+	-	+	+
Air couloir	Enterobacter sp	+	+	+	-	-	+	-	+	+
Buanderie	K.pneumoniae	+	+	+	-	+	+	-	+	+

Annexe V

Résultats d'identification des souches par galerie biochimique classique.

Sites de prélèvements		Citrate	TSI				44°C
			Glucose	Lactose	Gaz	H2S	
Bordure de lit	<i>A.baumannii</i>	+	-	-	-	-	+
Bocal d'aspiration	<i>P.aeruginosa</i>	+	-	-	-	-	/
Scope	<i>A.baumannii</i>	+	-	-	-	-	+
Appariel respiratoire	<i>A.baumannii</i>	+	-	-	-	-	+
Bordure des fenetres	<i>A.baumannii</i>	+	-	-	-	-	+
Sonde urinaire	<i>A.baumannii</i>	+	-	-	-	-	+
Réspirateur	<i>A.baumannii</i>	+	-	-	-	-	+
Table à chevet	<i>A.baumannii</i>	+	-	-	-	-	+
Bordure lit	<i>A.baumannii</i>	+	-	-	-	-	+
Bocal d'aspiration	<i>A.baumannii</i>	+	-	-	-	-	+
Télé-d'affichage radiaux	<i>A.baumannii</i>	+	-	-	-	-	+
Interrupteur	<i>A.baumannii</i>	+	-	-	-	-	+
Scope	<i>P.aeruginosa</i>	+	-	-	-	-	/
Draps	<i>A.baumannii</i>	+	-	-	-	-	+
Table de chevet	<i>P.aeruginosa</i>	+	-	-	-	-	/
Moustique	<i>A.baumannii</i>	+	-	-	-	-	+
Robinet	<i>P.aeruginosa</i>	+	-	-	-	-	/
Sol de toilette	<i>P.aeruginosa</i>	+	-	-	-	-	/
Cuvette toilette personnel	<i>P.aeruginosa</i>	+	-	-	-	-	/
Robinet	<i>P.aeruginosa</i>	+	-	-	-	-	/
Bureau personnel	<i>A.baumannii</i>	+	-	-	-	-	+
Personnel infirmier	<i>P.aeruginosa</i>	+	-	-	-	-	/
Personnel médecin	<i>A.baumannii</i>	+	-	-	-	-	+
Personnel agent	<i>A.baumannii</i>	+	-	-	-	-	+
Personnel agent	<i>A.baumannii</i>	+	-	-	-	-	+
Air salle 04à	<i>A.baumannii</i>	+	-	-	-	-	+
Casaque	<i>P.aeruginosa</i>	+	-	-	-	-	/
Poignée de chariot linge	<i>P.aeruginosa</i>	+	-	-	-	-	/
Sanibo	<i>P.aeruginosa</i>	+	-	-	-	-	/
Moustique à la buanderie	<i>A.baumannii</i>	+	-	-	-	-	+
Sac blanc	<i>P.aeruginosa</i>	+	-	-	-	-	/
Linge propre	<i>P.aeruginosa</i>	+	-	-	-	-	/
Etagères dans la buanderie	<i>A.baumannii</i>	+	-	-	-	-	+

Annexe VI

Résistance des BGN non fermentaire aux antibiotiques

Résistante

Intermédiaire

Sensible

Code	Souches	CT	IPM	ATM	TOB	CIP	CAZ
BAR04	<i>A.baumannii</i>	19	26	0,6	17	26	0,6
BAR06	<i>P.aerogenosa</i>	18	24	24	24	37	20
BAR08	<i>A.baumannii</i>	18	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
BAR09	<i>A.baumannii</i>	19	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
BAR12	<i>A.baumannii</i>	18	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
BAR17	<i>A.baumannii</i>	18	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
BAR18	<i>A.baumannii</i>	18	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
BAR21	<i>A.baumannii</i>	20	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
BAR22	<i>A.baumannii</i>	17	23	15	0,6	0,6	0,6
BAR23	<i>A.baumannii</i>	18	23	21	19	37	18
BAR25	<i>A.baumannii</i>	17	22	0,6	0,6	0,6	0,6
BAR27	<i>A.baumannii</i>	18	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
BAR28	<i>P.aerogenosa</i>	17	22	22	20	33	19
BAR30	<i>A.baumannii</i>	16	17	0,6	0,6	0,6	0,6
BAR31	<i>P.aerogenosa</i>	18	24	24	20	31	19
BAR32	<i>A.baumannii</i>	13	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
BAR38	<i>P.aerogenosa</i>	20	23	25	23	33	18
BAR39	<i>P.aerogenosa</i>	20	24	29	27	35	20
BAR44	<i>P.aerogenosa</i>	21	29	23	25	37	20
BAR45	<i>P.aerogenosa</i>	20	23	26	25	36	21
BAR46	<i>P.aerogenosa</i>	18	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
BAR51	<i>A.baumannii</i>	18	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
BAR53	<i>P.aerogenosa</i>	19	23	24	21	38	16
BAR54	<i>A.baumannii</i>	18	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
BAR55	<i>A.baumannii</i>	17	25	19	0,6	0,6	0,6
BAR56	<i>A.baumannii</i>	13.5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
BAR air salle04	<i>A.baumannii</i>	17	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
LBAR03	<i>P.aerogenosa</i>	17	0,6	0,6	0,6	16	0,6
LBAR07	<i>P.aerogenosa</i>	19	0,6	26	20	33	21
LBAR11	<i>P.aerogenosa</i>	20	18	27	20	42	29
LBAR16	<i>A.baumannii</i>	16	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
LBAR18	<i>A.baumannii</i>	15	27	18	19	28	16
LBAR23	<i>P.aerogenosa</i>	22	21	28	23	50	22
LBAR24	<i>P.aerogenosa</i>	21	18	22	19	38	0,6

Annexe VII

Résultats de test CIM.

Code	Souche	Test CIM
BAR02	K.pneumoniae	Intermédiaire
BAR04	A.baumannii	Intermédiaire
BAR06	P.aeruginosa	Intermédiaire
BAR08	A.baumannii	Intermédiaire
BAR09	A.baumannii	Sensible
BAR12	A.baumannii	Intermédiaire
BAR16	K.pneumoniae	Intermédiaire
BAR17	A.baumannii	Intermédiaire
BAR18	A.baumannii	Intermédiaire
BAR21	A.baumannii	Intermédiaire
BAR22	A.baumannii	Intermédiaire
BAR23	A.baumannii	Intermédiaire
BAR25	A.baumannii	Résistante
BAR27	A.baumannii	Sensible
BAR28	P.aeruginosa	Intermédiaire
BAR30	A.baumannii	Intermédiaire
BAR31	P.aeruginosa	Intermédiaire
BAR32	A.baumannii	Intermédiaire
BAR38	P.aeruginosa	Intermédiaire
BAR39	P.aeruginosa	Sensible
BAR45	P.aeruginosa	Intermédiaire
BAR46	A.baumannii	Sensible
BAR51	A.baumannii	Intermédiaire
BAR53	P.aeruginosa	Intermédiaire
BAR54	A.baumannii	Intermédiaire
BAR55	A.baumannii	Intermédiaire
BAR56	A.baumannii	Intermédiaire
BAR air salle 4	A.baumannii	Intermédiaire
LBAR01	K.pneumoniae	Sensible
LBAR03	P.aeruginosa	Intermédiaire
LBAR07	P.aeruginosa	Intermédiaire
LBAR11	P.aeruginosa	Intermédiaire
LBAR16	A.baumannii	Résistante
LBAR18	A.baumannii	Intermédiaire
LBAR24	P.aeruginosa	Intermédiaire

Résumé :

L'objectif de cette étude est d'évaluer la résistance et la persistance des Bacilles Gram négatif isolés à partir de l'environnement hospitalier au niveau du service de réanimation du CHU Khelil Amrane de Bejaia.

Sur un total de 92 prélèvements, 40 souches ont été isolées sur gélose Mac Conkey additionnée d'értapénème et de vancomycine. Après identification, 21 souches d'*Acinetobacter baumannii*, 13 souches de *Pseudomonas aeruginosa*, et 06 souches d'Enterobacteries ont été sélectionnées. Après un test d'antibiogramme, les souches d'*Acinetobacter baumannii* et de *Klebsiella pneumoniae* ont révélé une résistance importante aux 3 familles d'antibiotiques, les β -lactamines, les fluoroquinolones et les aminosides, alors qu'une résistance modérée a été détectée chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter sp.* Sur les 40 souches isolées, 21 souches ont montré une capacité à former un biofilm. Sur les souches testées pour leur capacité à résister à 3 désinfectants, réalisés par la méthode en tube, la totalité a montré une résistance à la dilution la plus concentrée 1/200. Ces bactéries considérées comme étant multi-résistantes constituent une menace pour les patients et l'environnement hospitalier de par leur résistance ainsi que leur persistance. Et pour cela des mesures d'hygiène ainsi que des contrôles microbiologiques sont recommandés afin d'éviter leur dissémination.

Mots-clés: Bacilles Gram négatif, environnement hospitalier, résistance aux antibiotiques, persistance.

Abstract:

The objective of this study is to evaluate the resistance and persistence of Gram-negative bacilli isolated from the hospital environment at the level of resuscitation department of the Khelil Amrane University Hospital in Bejaia. Out of a total of 92 levies, 40 strains were isolated on Mac Conkey agar supplemented with ertapenem and vancomycin. After identification, 21 strains of *Acinetobacter baumannii*, 13 strains of *Pseudomonas aeruginosa*, and 06 strains of Enterobacteria have been selected. After an antibiogram test, the strains of *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* revealed a considerable resistance to the 3 families of antibiotics, β -lactams, fluoroquinolones and aminoglycosides, whereas moderate resistance was detected in *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter sp.* Of the 40 strains isolated, 21 strains showed an ability to form a biofilm. On the strains tested for their ability to resist to 3 disinfectants, performed by the tube method, all showed a resistance at the most concentrated dilution 1/200. These bacteria considered as being multi-resistant constitute a threat to patients in the hospital environment by their resistance as well as their persistence, and that's why hygiene measures as well as microbiological controls are recommended in order to avoid their dissemination.

Keywords: Gram-negative bacilli, hospital environment, antibiotic resistance, persistence.