

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master II option
Microbiologie Moléculaire et Médicale

Thème :

*Caractérisation de la résistance aux bêta-lactamines chez les
bacilles à Gram négatif isolés de surfaces de l'environnement
hospitalier du C.H.U de Constantine*

Présenté par

M^{lle} DERGUINI Linda

M^{lle} MESSAOUDENE Chafika

Président :	P^r TOUATI. A.	Professeur, UAMB
Promoteur :	M^{me} BELHADI. K.	MAA, UAMB
Examineurs:	M^r DJOUDI.F.	MAA, UAMB
	M^{lle} TAFOUKT. R.	MAB, UAMB

Année universitaire : 2013 /2014

Remerciements

Nous remercions chaleureusement notre promotrice M^{me} Belhadi d'avoir accepté de nous encadrer, sa disponibilité, son aide précieuse, sa patience, sa gentillesse et surtout sa confiance. Nous exprimons madame toutes notre reconnaissance.

Nous tenons également à remercier l'ensemble des membres du jury, qui ont acceptés d'évaluer notre travail.

Nos vifs remerciements s'adressent également à nos enseignants M^r Touati.A, M^rDjouidi , M^rBelmahdi.M, M^rBakour.S,. M^{me} Garout, M^{lle} Yanat.B, M^{lle} Tafoukt.R, de leur soutien et gentillesse

Nos remerciements vont aussi a Mr le directeur du C.H.U de Constantine pour nous avoir accueilli et l'ensemble de personnels soignants de nous ont permis de travailler en toute liberté.

Enfin, un grand merci à toute l'équipe du Laboratoire de Microbiologie Appliquée, pour leur, aide et gentillesse.

Dédicaces

Je dédie ce travail à mes parents.

Toute ma famille.

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

En fin à mon très cher pays l'Algérie

La beauté d'un travail de recherche réside dans le fait que c'est une expérience et parfois une aventure et un plaisir partagés avec d'autres.

Merci à tous.

chafika



DEDICACE

Je dédie ce modeste travail

A

Mes très chers parents,

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

Mon frère et sœurs

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

Linda



Liste des abréviations

AMC : Augmentin® (Amoxicilline / Acide clavulanique)

K : Kanamicine

AMK: Amikacine

AmpC: Chromosomal located cephalosporinase

ATB : Antibiotique

ATM : Aztréonam

ATCC : Américain Type Collection culture

BGN : Bacille à Gram négatif

BLSE : β -Lactamases à Spectre Elargi (ou Etendu)

BMR : Bactéries multirésistantes

C1G : Céphalosporines de première génération.

C3G : Céphalosporines de troisième génération.

C4G : Céphalosporines de quatrième génération.

CAZ : Céfotaxime

CA-SFM : Comité français de l'antibiogramme de la société française de microbiologie

CIP : Ciprofloxacine.

CHU : Centre Hospitalo Universitaire

CMY: Active on cephamycine

CTX : Cefotaxime

CTX-M: Céfotaximase-Munich

DD-Test: Double Discs Test

EDTA: Etylenediamine tetra acetic acid

ERT : Ertapénème

FEP : Céfépime

FOX : Céfoxitine

GES: Guiana extended spectrum

I : Intermédiaire.

IPM : Imipénème

Lac : Lactose

KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

NDM-1 : *New Delhi* metallo- β -lactamase-1

MβL: Métallo-β-Lactamase

MH : Mueller Hinton

OXA : Oxacillinases

PCR: Polymerase Chain Reaction

PLP : Protéines de liaison aux pénicillines.

Qnr: quinolone resistance

R : Résistante.

S: Sensible

SHV: Sulfhydryd

TDA : Tryptophane désaminase.

TOB : Tobramycine

TSI : Three Sugar Iron.

UFC/ML: Unité Formant colonie/Millilitre

VIM: Verona integron-encoded metallo- β-lactamase

VP : Voges-Proskauer

MDR: Multi Drug Resistance

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction01

Matériel & Méthodes

I. Les prélèvements04

II. Isolement et purification05

III- Identification.....05

IV. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques.....06

V.Recherche de phénotype de résistance aux β -lactamines.....07

Résultats & discussions

I. Répartition des prélèvements :.....09

II. Souches bactériennes isolées.....10

III. Répartition des souches par site de prélèvements.....11

IV. Etude de la sensibilité aux antibiotiques.....13

V. Détermination des phénotypes de résistance.....19

Conclusion.....24

Références bibliographiques

Annexe

Liste des tableaux

Tableau N° I : Sites de prélèvement au niveau du service infectieux.

Tableau N°II : Liste des antibiotiques testés.

Tableau N° III : Nombre de prélèvements et de souches isolées par sites.

Tableau N°IV : Répartition des souches isolées par site de prélèvement.

Tableau N°V: Profil de sensibilité aux antibiotiques.

Tableau N°VI: Profil de sensibilité d'*Aeromonas hydrophila* ux antibiotiques.

Tableau N° VII : Phénotypes probables de résistance au carbarbapénème (ETP/IPM).

Tableau N°VIII : Résultats d'identification biochimique des souches d'*Acinetobacter baumannii* (Annexes).

Tableau N°IX: Résultats d'identification des entérobactéries par la galerie API20E(Annexes).

Liste des figures

Figure N° 01 : Répartition des souches par espèces.

Figure N° 02 : Taux de résistance de souches d'entérobactéries aux β -lactamines.

Figure N° 03 : Taux de résistance de souches d'entérobactéries aux autres famille antibiotiques.

Figure N° 04 : Taux de résistance de souches d'*Acinetobacter baumannii* aux β -lactamines.

Figure N° 05 : Taux de résistance de souches d'*Acinétobacter baumannii* aux autres famille antibiotiques.

Figure N°06: *klebseilla oxytoka* (INF-F 54). (Présence d'image de synergie).

Figure N°07 : Résultats de test de Hodge sur Mac Conkey.

Figure N° 08 : Test a l'EDTA positif.

Introduction

Les hôpitaux offrent un écosystème propice à la diffusion d'agents infectieux, potentiellement épidémiogènes et à l'acquisition de résistances microbiennes. Les risques infectieux au sein des hôpitaux sont multiples (d'Alessandro, 2012) et la mise en place de pratiques d'hygiène rigoureuses tout autant que diverses mesures de prévention (notamment l'hygiène des mains) participent à la lutte contre ces derniers (les risques infectieux hospitaliers) (Cardoso et *al.*, 1999).

La contamination de l'environnement hospitalier par des microorganismes fait poser la question de leur responsabilité dans la genèse des infections nosocomiales. Lors d'infections nosocomiales survenant, le microorganisme responsable de l'épidémie peut être retrouvé dans l'environnement (Cavallo et *al.*, 2002). L'environnement inerte (air, eau, surface,...), peut servir de réservoirs possible de contamination des patients, visiteurs et du personnels soignants (Habzi et Benomar, 2001). Il a été démontré que l'environnement proche d'un patient porteur de bactéries multirésistantes (BMR) peut se retrouver à son tour contaminé et servir de réservoir secondaire (Barbut et Neyme, 2006).

Les surfaces sont contaminées soit par les microorganismes issus du patient lui-même (infecté ou simplement colonisé) ou par des microorganismes environnementaux (*Aspergillus*) présents dans l'air et qui sont généralement véhiculés par des supports de tailles variables : poussières, squames cutanés, gouttelettes et noyaux de condensation (troplets nuclei) (Barbut et Neyme, 2006). Le taux de contamination de l'environnement varie en fonction de l'emplacement de la source d'infection chez les patients. La contamination est plus fréquente dans les chambres des patients avec des urines ou des plaies infectées que dans les chambres des patients atteints de bactériémies seulement (Hota, 2004)

La contamination des surfaces de l'environnement avec *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, les entérocoques résistants à la vancomycine sont bien documentées et contribuer à l'augmentation des épidémies liée à ces derniers. Même avec le respect des pratiques d'hygiène des mains et des protocoles de nettoyage de l'environnement, l'élimination de ces agents pathogènes des surfaces est difficile (Rose et *al.*, 2014). Les bactéries pathogènes à Gram négatif retrouvées en milieu hospitalier appartiennent à différents groupes bactériens (entérobactéries, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Burkholderia cepacia*). Elles sont présentes dans l'environnement hospitalier, au niveau des individus (patients, personnel soignant) ou de l'environnement inanimé (surfaces,

instruments, solutés) où ils sont sélectionnés du fait de leur capacité à résister facilement aux antiseptiques (Liassine, 2000).

La survie de ces microorganismes est de durée très variable, dépendant de différents facteurs comme : la nature du germe, la température, le taux d'humidité, le type de surface, la capacité d'adhérence et à produire un biofilm (Barbut, 2006). Une partie des infections acquises en milieu hospitalier, plus ou moins importante, est liée à des bactéries hospitalières qui ont pour caractéristiques une multirésistance aux antibiotiques. L'existence de ces (BMR) pose un problème thérapeutique majeur (Cholley et *al.*, 2013), en particulier les bactéries à Gram négatif qui sont associées à un taux de mortalité élevé (O'Fallon et *al.*, 2009). Parmi les BMR qui font l'objet du programme de surveillance dans les établissements de santé les entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) et de carbapénèmase et les *Acinetobacter baumannii* (ICHC, 2009).

La résistance aux antibiotiques est devenue un problème majeur de santé publique en Algérie. En effet ces dix dernières années, une importante augmentation de la résistance aux antibiotiques en particulier chez les bacilles à Gram négatif est constatée. La résistance aux β -lactamines chez les entérobactéries est dominée par la production de BLSE de type CTX-M-3 et CTX-M-15 (Touati et *al.*, 2006 ; Messai et *al.*, 2008; Baba Ahmed-Kazi et Arlet 2014). Les souches productrices de ces enzymes sont souvent à l'origine d'infections potentiellement sévères aussi bien en milieu hospitalier que communautaire. L'isolement de souches d'entérobactéries productrices de carbapénémases reste rare en Algérie. La diffusion de carbapénémases de type OXA et NDM-1 à été rapporté chez des souches d'*A. baumannii* (Bakour et *al.*, 2012 ; Bakour et *al.*, 2013 ; Mesli et *al.*, 2013 ; Baba Ahmed-Kazi et Arlet 2014).

Durant la dernière décennie, *Acinetobacter baumannii* a développé une résistance accrue aux antibiotiques et il est à l'origine de plusieurs épidémies nosocomiales. Le microorganisme a été isolé partout dans l'environnement inanimé, sur les lits de patients colonisés, sur les surfaces à proximité des patients a savoir les équipements de chevet, les planchers, les éviers, les comptoirs et les poignées de porte (Hota, 2004 ; Mesli et *al.*, 2013; Rosa et *al.*, 2014). Plusieurs travaux ont rapporté une propagation de bactéries à Gram positif telles que *Clostridium difficile*, entérocoques et *Satphylococcus aureus* et à Gram négatif résistants aux antibiotiques sur les surfaces inanimées de l'environnement hospitalier (Rampling et *al.*, 2001 ; French et *al.*, 2004 ; Dakic et *al.*, 2005 ; Rose et *al.*, 2014). En

Algérie, la contamination de ce dernier par des entérobactéries producteur de BLSE de type TEM, SHV, CTX-M, CMY-2 (Abid et *al.*, 2007 ; Touati et *al.*, 2007; Touati et *al.*, 2010; Sonna et *al.*, 2013) et de souches d' *Acinetobacter baumannii* producteur de carbapénemases de type OXA23, 24 et 51 (Mesli et *al.*, 2013) à été rapportée.

L'hygiène hospitalière constitue un pilier indissociable de la stratégie à mettre en œuvre dans la maîtrise de la diffusion de ces bactéries (BMR), et l'application systématique des bonnes pratiques visant à prévenir la transmission croisée est indispensable (Levent et *al.*, 2005). Les souches environnementales présentant un profil semblable aux isolats cliniques (des patients et du personnel) provenant des sites les plus exposés au contact avec les mains à savoir, les cadres de lit, poignées de portes et les claviers d'ordinateur, suggérant une transmission directe entre ces sites, les mains du personnel et les patients (Dancer et *al.*, 2006).

La surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé est un sujet qui s'intègre dans l'actualité de la prévention des infections nosocomiales avec l'impact médiatique lié aux épidémies récentes d'infections impliquant des bactéries environnementales (Cavallo et *al.*, 2002). Il est donc important d'évaluer le degré de la contamination de l'environnement hospitalier, afin de maîtriser la diffusion, et de mieux comprendre l'épidémiologie de ces souches (BMR).

L'objectif de notre étude est d'évaluer le degré de la contamination de l'environnement hospitalier et la caractérisation des phénotypes de résistance au β -lactamines des souches isolées au niveau de service infectieux de C.H.U de Constantine par les bacilles à Gram négatif multirésistantes. Pour cela nous avons adopté la méthodologie suivante :

- Prélèvement de surface et d'air au niveau de service Infectieux.
- Isolement et identification des bacilles à Gram négatif.
- Détermination des mécanismes de résistance aux β -lactamines et autres familles d'antibiotique.

I. Prélèvements

Notre étude s'est déroulée durant la période allant de mars à Mai 2014 au niveau du laboratoire de Microbiologie appliquée de l'université A. Mira de Béjaia. Des prélèvements de surfaces inertes et d'air ont été effectués au niveau du service infectieux de CHU de Constantine (Tableau N° I).

Tableaux N° I : Sites de prélèvement au niveau du service infectieux.

Pavillon Femme			
Salles	Date de prélèvements	Sites de prélèvements	Nombre de prélèvements
chambre 4	10/03/2014	Poignées de portes, interrupteur, tables, chaises, radiateurs, tables de chevet, drap, bordures, portables, perfuseurs, sondes urinaire, sondes de drainage, chaises roulante, téléphones, poignées placards, lavabos, robinets, chariots, paillasse, blouses, mains, et portables infirmières, poignées frigidaire, cuisinières.	11
chambre 3			15
chambre 5			17
salles de soins			13
sanitaire			3
couloire			3
cuisine femme			8
Air			chambre N° 4, 3, 5. salle de soin, sanitaire, couloire
Total 1			76
Pavillon Homme			
chambre 1	10/03/2014	Poignées de portes, interrupteurs, tables, chaises, radiateurs, tables de chevet, draps lit, bordures lit, portables, perfuseurs, sondes urinaire, sondes de drainage, chaises roulante, téléphones, poignées placards, lavabos, robinets, distributeurs de savon, chariots, paillasse, blouses, mains, portables de médecin, air	15
chambre 5			13
chambre 3			11
chambre 2			14
salles de soins			15
sanitaire, couloire			7
Air			5
Total 2			80
Total			156

I.1. Prélèvements de surfaces

Les prélèvements de surfaces sont effectués par la méthode d'écouvillonnage qui consiste à frotter une surface avec un écouvillon stérile préalablement humidifié dans un bouillon nutritif. L'écouvillon est immédiatement réintroduit dans le bouillon nutritif, et acheminé au laboratoire puis incubé à 37°C pendant 24 à 48 heures (French et *al.*, 2004).

I.2. Prélèvement de l'air

Selon la méthode de sédimentation rapportée par Bosi (2000), des boîtes de Pétri contenant la gélose Mac Conkey additionnées de 4µg/ml de céftazidime et de 16 µg/ml de vancomycine ont été exposées à l'air ambiant pendant 4 heures. Les boîtes sont déposées à différents endroits du service infectieux (chambre des patients, salle de soins, sanitaire, couloir) puis acheminées au laboratoire et incubées à 37°C pendant 24 heures (Bosi, 2000).

II. Isolement et purification

Les bouillons présentant un trouble après 24 heures d'incubation sont ensemencés sur une gélose de Mac Conkey déjà préparée et additionnée de 4µg/ml de céftazidime pour sélectionner les bacilles Gram négatifs résistants et de 16µg/ml de vancomycine pour éliminer les bactéries à Gram positifs. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

Après 24 heures d'incubation, les boîtes ont fait l'objet de plusieurs repiquages sur le même milieu d'isolement. Incubation à 37°C pendant 24 heures.

III. Identification

Une fois la culture est pure, l'identification des bacilles à Gram négatif est réalisée sur la base :

- Des caractères culturels (taille, aspect des colonies, formes).
- La coloration de Gram.
- Repiquage sur milieu chromogène (**Uriselect 4**) : c'est un milieu sélectif contenant deux substrats chromogènes (β -galactosidase, β -glucosides) qui permettent une identification directe, par mise en évidence d'activité enzymatique de certains germes. Chaque espèce apparaît sous forme de colonies de couleur différente. (Annexe N°II).
- Croissance à 44°C /24 heures pour *Acinetobacter baumannii*.

- Utilisation d'une galerie biochimique classique (TSI, Citrate de Simmons, Bouillon Nitraté) et une galerie API20E pour les entérobactéries.

IV. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques

La sensibilité des souches de bacilles à Gram négatif est évaluée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Muller Hinton selon les recommandations du CASFM 2012.

Les boîtes de Pétri contenant du Mueller Hinton, sont ensemencées par écouvillonnage. Par la suite, des disques d'antibiotiques appartenant à différentes familles d'antibiotiques (Tableau N°II) sont déposés sur la surface de la gélose. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures. Les bactéries sont classées selon les diamètres critiques définis par le comité de l'antibiogramme (CASFM, 2012) en l'une des 3 catégories suivantes : sensible (S), intermédiaire (I), ou résistante (R).

Tableau N° II : Liste des antibiotiques testés.

Famille	Antibiotique	Abréviation	Charge (µg)	Marque
β-lactamines	Amoxicilline + Acide clavulanique	AMC	20/10	Himedia
	Céftazidime	CAZ	30	Himedia
	Céfotaxime	CTX	30	Oxoid
	Céfoxitine	CX ou FOX	30	Himedia
	Céfépime	FEP	30	Oxoid
	Aztréoname	ATM	30	Bio-Rad et Himedia
	Imipénème	IPM	10	Oxoid
	Ertapénème	ETP	10	Oxoid
Fluorquinolone	Ciprofloxacine	CIP	5	Cypress Diagnostique
Aminosides	Tobramycine	TOB	10	Himedia
	Amikacine	AK	30	Oxoid et Himedia
	Kanamycine	k	30	Bioanalyse

V. Recherche des phénotypes de résistance aux β-lactamines

V.1 Recherche de BLSE (Test de synergie)

La production d'une β-lactamase à spectre élargi (BLSE) est détectée par le test de synergie qui consiste à placer des disques de : C3G (céftazidime et céfotaxime), C4G (céfépime) et un monobactame (aztréoname) à une distance de 20 mm (centre à centre) d'un disque d'augmentin (AMC : Amoxicilline /Acide clavulanique). L'augmentation de la zone d'inhibition entre le disque d'AMC et les disques C3G, C4G, Aztréoname indique la production d'une BLSE (Jarlier et *al.*, 2008).

V.2. Recherche des carbapénèmases

V.2.1. Test de Hodge (Hodge et al., 1978)

La production de carbapénèmases est recherchée chez les souches résistantes ou de sensibilité diminuée à l'un des 2 carbapénèmes testées (Imipénème et Ertapénème).

Le test est réalisé sur des boîtes contenant la gélose Mac Conkey additionnée de ZnSo₄ selon le CASFM (2013) est inoculée avec une souche *E.coli* ATCC 25922. Un disque de carbapénème est placé au centre de la boîte, un témoin négatif (*E.coli* ATCC 25922) et une souche productrice d'une carbapénémase (témoin positif) sont ensemencés sur la gélose sous forme de stries à partir du centre du disque jusqu'à la périphérie. Après incubation à 37°C pendant 24h, la déformation de la zone d'inhibition à l'intersection entre une strie et la culture d'*E. coli* indique la production probable d'une carbapénémase (Lee et al., 2010).

V.2.2. Test à l'EDTA (recherche de métallo-β-lactamases (MBL))

Ce test est réalisé pour la détection phénotypique des carbapénèmases de la classe B d'Ambler (MBL) qui sont inhibées par l'EDTA (agent chélateur des ions Zn²⁺)

○ Méthode des disques combinés

Deux disques de carbapénèmes (IPM ou ETP) sont déposés séparément sur la gélose MH dans la même boîte, on ajoute 4μl de la solution d'EDTA sur l'un des disques. Après 24h d'incubation à 37°C, les diamètres des zones d'inhibition autour des deux disques sont comparés. un résultat positif se traduit par une augmentation de la zone d'inhibition d'au moins 6 mm entre le disque carbapénèmes + EDTA et le disque carbapénèmes seul (Philippon et Arlet, 2006).

○ Recherche de synergie

Un DD-test est réalisé avec un disque de carbapénème et un disque imbibé avec 10μl de solution d'EDTA à 0,5M distant de 15mm. La présence d'une MβL est détectée par visualisation d'une image de synergie entre le disque de carbapénème et celui de l'EDTA (Jeong et al., 2006).

I- Répartition des prélèvements :

Durant cette étude qui s'est déroulée au niveau du service infectieux du C.H.U de Constantine, 156 prélèvements de l'environnement des malades et du personnel soignant ont été effectués dont : 145 prélèvements de surfaces et 11 prélèvements d'air.

L'isolement sur milieu Mac Conkey additionné de 4µg/ml de céftazidime nous a permis d'avoir 29 souches de bacilles à Gram négatifs (BGN) résistantes. Le nombre de prélèvements et de souches isolées par sites est représenté dans le tableau N° IV.

Tableau N° III : Nombre de prélèvements et de souches isolées par sites.

Pavillon Femme				Pavillon Homme			
Sites de prélèvements		Nombre de prélèvement	Nombre de souches	Sites de prélèvements		Nombre de souches	
Chambres des patients	Poignée porte chambre	3	0	Chambre des patients	Poignée de porte chambre	4	0
	Interrupteur chambres	3	0		Interrupteur	4	0
	Poignée fenêtre	3	0		Table de traitement	2	0
	Radiateur	3	0		Chaises	2	0
	Drap lit	5	1		Radiateur	4	0
	Bordures lit	5	1		Poignée de fenêtre	3	0
	Table de chevet	5	3		Table de chevet	7	0
	Perfuseurs	4	2		Draps lit	8	2
	Potence	4	1		Bordures lit	8	0
	Portables des patients, sonde de drainage	4	0		Portable	4	0
	Chaise roulante, chaises	3	2		Perfuseurs	2	0
					Potence	2	0
					Sondes urinaire	2	0
			Télévision	1	0		
Couloire	Interrupteur, radiateur, chaises.	4	0				
Salle de soins	Poignée de porte, interrupteur, radiateur, table, téléphone, poigné placard, robinet, lavabo, chariot, pailleasse, blouses, mains, et portable infirmiers.	13	Lavabo : 2 Blouses : 1	Couloire	Poignée de porte, Interrupteur, Rideau, Radiateur	4	0
				Salle de soins	Poignée de porte, table interrupteur, chaises, téléphone, blouses, mains, portable infirmiers, lavabo, robinet, pailleasse, blouses, portable médecins, porte savon.	15	Lavabo : 2 Pailleasse : 2 Robinet : 1
Cuisine femme	Poignée de porte, interrupteur, poigné frigidaire, cuisinière, robinet, lavabo, pailleasse, poigné fenêtre.	8	Lavabo : 3 Pailleasse : 2 Robinet : 2				
Sanitaire	Poignée de porte, robinet, lavabo	3	Lavabo : 1 Robinet : 1	Sanitaire	Poignée de porte, robinet, lavabo.	3	0
Air	Chambres, salle soins, sanitaire, couloire	6	0	Air	Chambre 2 et 6, salle de soins, couloire, sanitaire.	5	0
Total	76	22	Total	80	7		
Total	156 prélèvements						

Selon le tableau N°III, on remarque que le pavillon femme héberge le nombre le plus élevé de souches (22/29) par rapport au pavillon hommes (7/29). Ainsi il apparaît que les surfaces inertes en contact avec les patients (drap lit, table de chevet, radiateur...) sont contaminées par des souches résistantes, cela montre que leur flore endogène peut être impliquée dans la contamination de ces dernières. Il est fréquent de retrouver dans l'environnement de patient le micro-organisme responsable de son infection (Bosi, 2000). En outre des souches sont également isolées à partir des salles de soins (paillasse, blouses) suggérant l'implication du personnel soignant comme vecteur dans la transmission de ces microorganismes de patient à patient ou des surfaces aux patients.

Les microorganismes de l'air sont rarement présents à l'état libre. Ils sont en générale véhiculés par un support de taille variable par exemple les poussières qui agglomèrent et absorbent ces microorganismes, mais leurs grosses tailles facilitent leur sédimentation, ce qui explique l'absence de bactéries dans l'air au niveau du service infectieux (Bertrou et *al.*, 2000 ; Bosi, 2000).

Les bactéries à Gram négatives, bien qu'elles proviennent souvent des patients eux-mêmes, peuvent survivre dans différentes niches environnementales. Elles prolifèrent mieux sur les équipements et les zones humides et mal nettoyées, désinfectées ou stérilisées (Danser, 1999).

La qualité de l'entretien des surfaces est d'une importance primordiale en milieu hospitalier. En effet, leur présence est constante et inévitable dans l'environnement du patient, soit lui-même directement, soit par les dispositifs médicaux qui lui sont destinés ou les médicaments qui vont lui être administrés. Il est également concerné par des surfaces qui ne sont pas directement en contact avec lui comme les cuisines ou la lingerie.

II- Souches bactériennes isolées

L'identification des bacilles à Gram négatif par la coloration de Gram, culture sur milieux chromogène Uriselect, galerie biochimie classique et par galerie API20E a permis la mise en évidence de 02 groupes bactériennes: les BGN fermentaires dont 23 souches d'Entérobactéries et les BGN non fermentaire représenté par 5 souches d'*Acinetobacter baumannii* et une souche *Aeromonas hydrophila*.

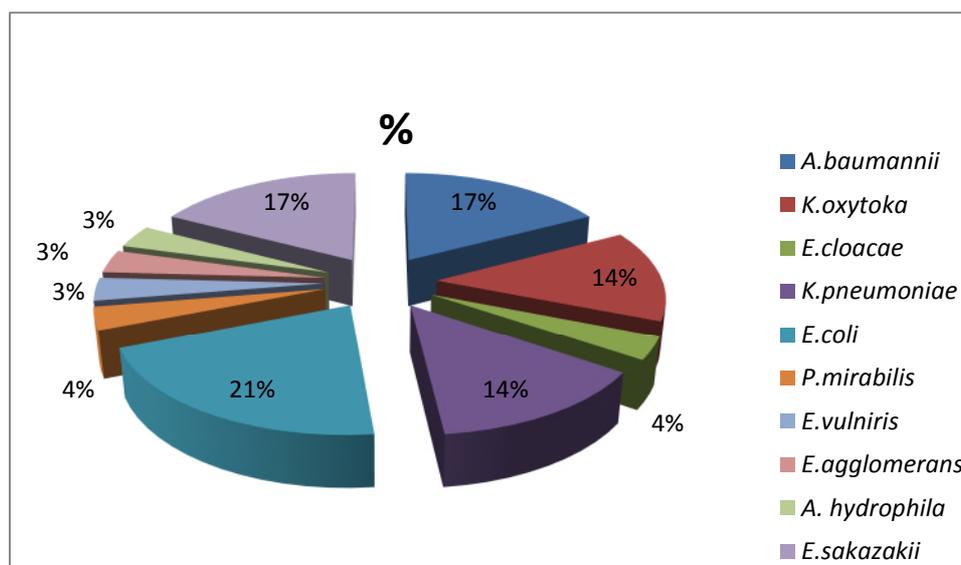


Figure N° 01 : Répartition des souches par espèces.

Les résultats obtenus, montre une prédominance des souches d'entérobactéries 79,31% (23/29), par apport aux souches d'*Acinetobacter baumannii* et *Aeromonas hydrophila* avec des taux de 17,24% (5/29) et 3,44% (1/29) respectivement. La dominance des Entérobactéries est représentée essentiellement par (8/29) souches d'*Escherichia coli*. La présence de taux élevés d'entérobactéries témoigne de contamination d'origine fécale et d'une défaillance des pratiques d'hygiène.

Le nombre de souches obtenus dans cette étude est supérieur (29 souches) à celui obtenu à Bejaia (5 souches) par Yaici et Zekar au service infectieux qui est représenté par 4 souches d'*Enterobacter cloacae* et un *Acinetobacter baumannii*.

Nos résultats sont presque similaires à ceux obtenus par Liassine (2000) qui a montré que les pathogènes à Gram négatif en milieu hospitalier appartiennent à différentes familles bactériennes représentées majoritairement par les entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, etc.).

III-Répartition des souches par site de prélèvements :

On remarque d'après le tableau N°IV cité ci-dessous, une diversité de la flore microbienne qui environne le service des maladies infectieuses. Carling et al., (2006) ont rapportés une contamination fréquente de différentes surfaces près des patients avec des pathogènes associés à l'hôpital et qui sont capables de survivre sur des surfaces inanimées pendant des semaines. La présence des *Acinetobacter baumannii* sur des surfaces (draps,

radiateurs, perfuseurs, chaises) et de *E. coli* sur (tables de chevet, perfuseurs, chaises, Potences) dans la même chambre confirme cette constatation.

Tableau N°IV : Répartition des souches isolées par site de prélèvement.

codes	salles	sites	types de souches
INF-F 06	Chambre 4 femme	Drap de lit	<i>Klebsiella pneumoniae sup pneumoniae</i>
INF-F 08A	Chambre 4 femme	Table de chevet	<i>E.coli</i>
INF-F 08B	Chambre 4 femme	Table de chevet	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
INF-F 09	Chambre 4 femme	Perfuseurs	<i>E.coli</i>
INF-F 10	Chambre 4 femme	Potence	<i>E.coli</i>
INF-F 11	Chambre 4 femme	Chaise	<i>Eschirechia vulniris</i>
INF-F 30	Chambre 5 femme	Radiateur	<i>Acinetobacter baumanii</i>
INF-F 36	Chambre 5 femme	Bordures lit	<i>Enterobacter cloacae</i>
INF-F 37	Chambre 5 femme	Perfuseurs	<i>Acinetobacter baumanii</i>
INF-F 39	Chambre 5 femme	Table de chevet	<i>Enterobacter sakazakii</i>
INF-F 43	Chambre 5 femme	Chaise	<i>Acinetobacter baumanii</i>
INF-F 51A	Salle de soins femme	Lavabo	<i>Acinetobacter baumanii</i>
INF-F 51C	Salle de soins femme	Lavabo	<i>E.coli</i>
INF-F 54	Salle de soins femme	Blouses	<i>Klebseilla oxytoka</i>
INF-F 58	Sanitaire femme	Robinet	<i>Aeromonas hydrophila</i>
INF-F 59	Sanitaire femme	Lavabo	<i>Enterobacter agglomerans</i>
INF-F D1	Cuisine femme	Paillasse	<i>Enterobacter sakazakii</i>
INF-F D4	Cuisine femme	Paillasse	<i>Klebsiella oxytoka</i>
INF-F E1	Cuisine femme	Lavabo	<i>Proteus mirabilis</i>
INF-F E2	Cuisine femme	Lavabo	<i>Enterobacter sakazakii</i>
INF-F E3	Cuisine femme	Lavabo	<i>Klebsiella oxytoka</i>
INF-F G	Cuisine femme	Robinet	<i>Klebsiella oxytoka</i>
INF-H 94	Chambre 3 homme	Drap de lit	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
INF-H 122B	Salle de soins homme	Lavabo	<i>Enterobacter sakazakii</i>
INF-H 122C	Salle de soins homme	Lavabo	<i>E.coli</i>
INF-H 125A	Salle de soins homme	Paillasse	<i>E.coli</i>
INF-H 125B	Salle de soins homme	Paillasse	<i>Enterobacter sakazakii</i>
INF-H 131	Salle de soins homme	Robinet	<i>Klebseilla pneumoniae</i>
INF-H 86	Chambre 5 homme	Drap de lit	<i>Acinetobacter baumanii</i>

Des souches sont isolées au niveau des salles de soins hommes et femmes (3 souches de *E. coli*), à partir des paillasse et des lavabos et une souche de *Klebseilla oxytoka* à partir d'une blouses d'un personnel soignant. Les mains du personnels peuvent servir de vecteur dans la contamination croisée entre l'environnement et les patients (Lashéras et al., 2006). Le

port approprié des équipements de protection individuel par l'infirmière : gants, masques, dispositifs de protection oculaire, blouses de protection, protège l'infirmière et limite le transport d'agents infectieux d'une chambre à l'autre, ainsi que du milieu de soins vers la communauté et vice versa (Durand, 2006).

La présence des microorganismes d'origine fécale (*Enterobacter* sp., *Proteus* sp., *Klebsella* sp.) sur des surfaces (palliasse, lavabo) témoigne d'une défaillance dans les mesure d'hygiène que ce soit du personnel ou des malades. La voie fécale est une des voies de contamination par des germes de la flore intestinale humaine et les personnes souffrant d'une maladie aiguë transmissible ou qui secrètent des bactéries pathogènes ne doivent pas accéder aux locaux où des denrées sont manipulées (Durand, 2006).

IV. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

Les profils de sensibilité aux antibiotiques de souches isolées sont représentés dans le tableau N°V est détermines selon les valeurs critique décrit par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de la Microbiologie (CA SFM, 2012).

Tableau N°V: Profil de sensibilité aux antibiotiques.

codes	souches	CTX		CAZ		FEP		ATM		AMC		IPM		ETP		FOX		TOB		K		AK		CIP		BLSE
		0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	
INFF D1	<i>Enterobacter sakazakii</i>	10	R	0	R	20	R	0	R	0	R	30	S	23	R	14	R	13	R	12	R	20	S	20	R	-
INFF E2	<i>Enterobacter sakazakii</i>	20	R	0	R	22	I	0	R	0	R	/	/	21	R	0	R	21	S	19	S	27	S	29	S	+
INFF E3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	R	0	R	24	I	0	R	0	R	/	/	25	R	16	I	16	I	14	R	20	S	21	R	+
INFF 36	<i>Enterobacter cloacae</i>	0	R	0	R	18	R	0	R	0	R	21	I	22	R	0	R	13	R	11	R	16	I	17	R	+
INFF 39	<i>Enterobacter sakazakii</i>	0	R	0	R	23	I	0	R	0	R	/	/	18	R	0	R	31	S	30	S	28	S	18	R	+
INFH 94	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13	R	10	R	21	I	14	R	12	R	/	/	24	R	21	I	17	R	15	I	25	S	22	I	+
INFF 10	<i>E.coli</i>	0	R	0	R	11	R	0	R	0	R	/	/	20	R	10	R	27	S	22	S	21	S	0	R	+
INFF G	<i>Klebsiella oxytoca</i>	19	R	9	R	25	S	0	R	0	R	/	/	23	R	0	R	10	R	8	R	19	S	26	S	+
INFF 09	<i>E.coli</i>	6	R	11	R	30	S	10	R	0	R	/	/	22	R	9	R	26	S	23	S	25	S	0	R	+
INFF 08A	<i>E.coli</i>	0	R	0	R	13	R	0	R	0	R	/	/	20	R	8	R	25	S	23	S	21	S	0	R	+
INFH 125A	<i>E.coli</i>	10	R	12	R	23	I	9	R	0	R	/	/	27	I	18	I	18	I	15	I	23	S	23	R	+
INFF 58	<i>Aeromonas hydrophila</i>	0	R	0	R	9	R	0	R	0	R	/	/	23	R	15	I	0	R	0	R	16	I	38	S	-
INFH 122C	<i>E.coli</i>	11	R	0	R	20	R	11	R	0	R	/	/	26	R	0	R	16	I	12	R	20	S	19	R	+
INFH 131	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	R	0	R	25	S	10	R	0	R	/	/	31	S	20	I	26	S	22	S	30	S	30	S	+
INFF 51C	<i>E.coli</i>	12	R	14	R	22	I	11	R	0	R	/	/	27	I	19	I	18	I	15	I	23	S	25	I	+
INFH 122B	<i>Enterobacter sakazakii</i>	13	R	0	R	31	S	0	R	0	R	29	S	31	S	12	R	20	S	13	R	24	S	33	S	+
INFF D4	<i>Klebsiella oxytoca</i>	17	R	8	R	20	R	11	R	8	R	/	/	30	S	21	I	17	R	15	I	19	S	25	I	+
INFF 54	<i>Klebsiella oxytoca</i>	20	R	8	R	25	S	10	S	0	R	/	/	19	R	0	R	12	R	10	R	16	I	18	I	+
INFF 06	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	R	0	R	7	R	0	R	0	R	/	/	22	R	14	R	10	R	0	R	14	R	8	R	-
INFF 08B	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13	R	7	R	20	R	11	R	0	R	/	/	24	R	19	I	23	S	19	S	21	S	28	S	-
INFF E1	<i>Proteus mirabilis</i>	13	R	7	R	23	I	0	R	0	R	24	S	22	R	28	S	28	S	25	S	26	S	29	S	-
INFF 11	<i>Escherichia vulniris</i>	13	R	11	R	25	S	20	R	S	S	/	/	25	R	0	R	15	R	9	R	19	S	30	S	+

INFF 59	<i>Enterobacter agglomerans</i>	7	R	14	R	14	R	14	R	7	R	29	S	32	S	16	I	19	S	16	I	21	S	21	R	-
INFH 125B	<i>Enterobacter sakazakii</i>	11	R	6	R	28	S	6	R	6	R	26	S	23	R	10	R	24	S	15	I	27	S	38	S	+
INFF 37	<i>Acinetobacter baumannii</i>	16	R	8	R	23	S	13	R	9	R	31	S	17	R	6	R	26	S	21	I	19	S	27	S	-
INFF 51A	<i>Acinetobacter baumannii</i>	6	R	10	R	16	R	29	S	6	R	16	R	20	R	6	R	19	S	0	R	23	S	31	S	-
INFF 30	<i>Acinetobacter baumannii</i>	6	R	6	R	15	R	6	R	6	R	29	S	/	/	6	R	18	S	19	R	24	S	32	S	-
INFH 86	<i>Acinetobacter baumannii</i>	6	R	6	R	7	R	6	R	18	I	18	I	10	R	13	R	18	S	9	R	18	S	24	S	+
INFF 43	<i>Acinetobacter baumannii</i>	6	R	11	R	9	R	9	R	6	R	26	S	/	/	6	R	10	R	12	R	16	I	25	S	-

Selon le tableau on remarque que les 29 souches étudiées exprime une résistance vis-à-vis la majorité des antibiotiques testés. Certaines souches d'*E.coli* représentent des profils de sensibilité proches qui peut être due à une dissémination clonale sur différentes surfaces dans différentes salles.

IV. 1. Etude de la sensibilité des souches d'entérobactéries aux β -lactamines

Le taux de la résistance de ces souches aux β -lactamines est représenté dans la figure N° 02

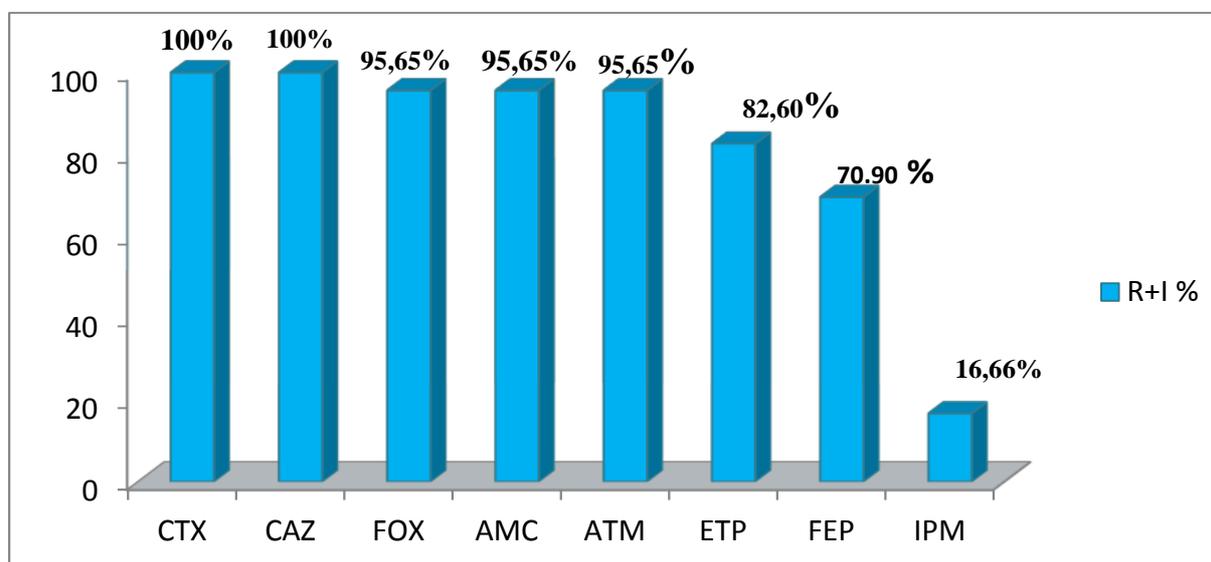


Figure N° 02 : Taux de résistance de souches d'entérobactéries aux β -lactamines.

D'après la figure N°2 on remarque des taux de résistance élevée aux β -lactamines : 100% (23/23) vis-à-vis du céfotaxime (CTX) et céftazidime (CAZ). 95,65% (22/23) à l'amoxicilline-acide clavulanique (AMC), l'aztréonam (ATM) et céfoxitine (FOX). Nos résultats sont presque similaires à ceux rapportés par Yaici et Zekar (2012), Bellache et Yous (2013) au CHU de Béjaia, et de Zamouche et Zebboudji (2013) au CHU de Sétif qui ont trouvés des taux élevée vis-à-vis de : céfoxitine, l'aztréonam, céftazidime, céfotaxime, l'amoxicilline-acide clavulanique (AMC). Cette constatation est rapporté par Touati et *al.*, (2010) et Souna et *al.*, (2014) .

On remarque aussi un taux très élevée de souches résistantes vis-à-vis de l'ertapénème 82,60% et une souche d'*Enterobacter cloacae* (16,66%) vis-à-vis de l'imipénème. La résistance des entérobactéries à l'imipénème n'a jamais été rapportée en Algérie en particulier chez les souches isolées de l'environnement hospitalier. Selon Nordmann et Carrer (2010) et Hung et *al.*, (2013), la résistance aux carbapénèmes résulte essentiellement de deux mécanismes impliquant tous deux des bêta-lactamases. Le premier mécanisme associe à la production d'une céphalosporinase chromosomique ou plasmidique ou une BLSE à une diminution quantitative ou qualitative de l'expression des protéines transmembranaires qui sont les porines. Le deuxième mécanisme est lié à l'expression de bêta-lactamases à forte activité hydrolytique vis-à-vis des carbapénèmes, les carbapénémases.

IV. 2. Etude de la sensibilité des souches d'Entérobactéries aux autres familles d'antibiotiques

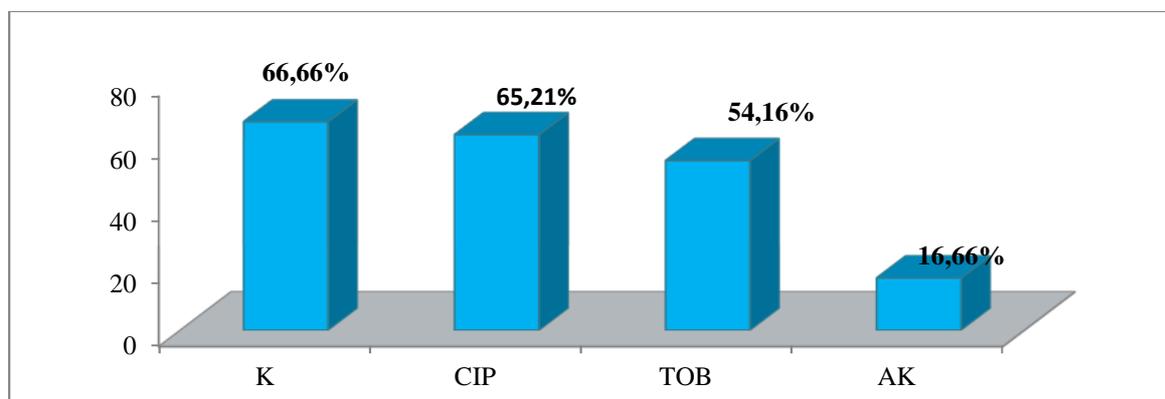


Figure N° 03 : Taux de résistance de souches d'entérobactéries aux autres familles antibiotiques

Des taux de résistances importants ont été obtenus vis-à-vis des aminosides testés: 66,66% (15/23) à la Kanamycine (k) suivi de 54,16% (12/23) à la Tobramycine (TOB) et 16,66% (3/23) à l'Amikacine (AK) et de la Ciprofloxacine (CIP) 65,21% (15/23).

Selon Meradi *et al.*, (2009) la résistance aux flooroquinolones (FQ) rapporté chez des souches d'*E.coli* est due à une inactivation de ces dernier par une acétylation de la ciprofloxacine. Le déterminant de cette résistance est un variant d'un aminoside N-acetyltransférase ACC-(6')-Ib-cr. La présence probable de cette enzyme pourrai expliquer la résistance de nos souches d' *E. coli* aux aminosides et à la ciprofloxacine. En Algérie, les gènes aac (6')-Ib et sont variant aac (6')-Ib-cr ont été rapporté à Annaba par Meradi *et al.*, (2009), chez des souches productrices de BLSE de type CTX-28 et TEM1 et les gènes *qnrB* à Béjaia par Touati *et al.*, (2006) chez des souches entérobactéries productrices de BLSE de type CTX-M-3, CTX-M-15.

IV. 2. Etude de la sensibilité des souches d'*Acinetobacter baumannii* aux antibiotiques

IV.2.1 Les β -lactamine

Le taux de la résistance de ces souches aux β -lactamines est représenté dans la figure N° 4

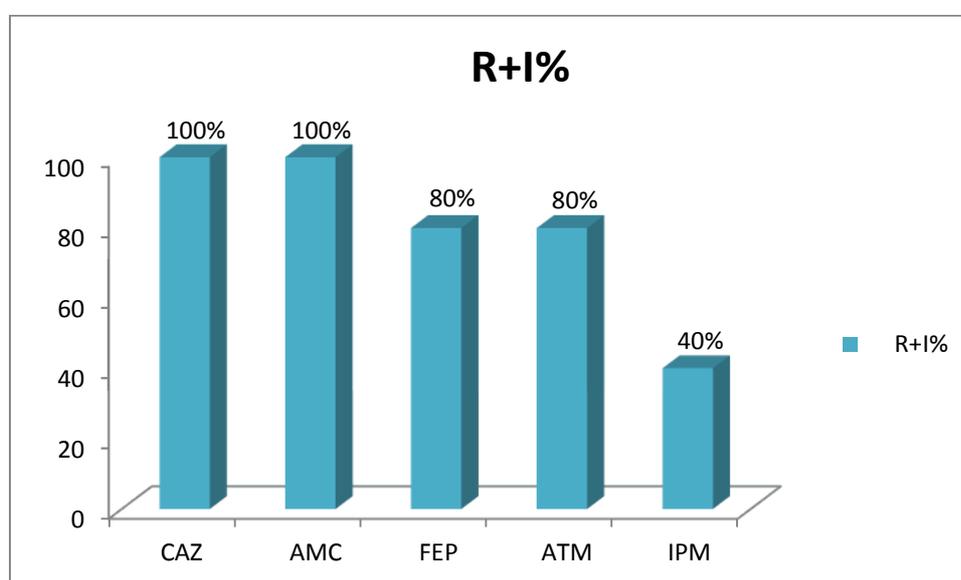


Figure N° 04 : Taux de résistance de souches d'*Acinetobacter baumannii* aux β -lactamines.

On remarque des taux de résistances importants chez les souches d'*Acinetobacter baumannii* vis à vis du CAZ, ATM, FEP avec un pourcentage de 80 à 100 % à l'exception de l'IPM avec un taux de 40 %.

L'exposition des souches d'*Acinetobacter baumannii* à la pression sélective des antibiotiques puissants dans les unités de soins intensifs a progressivement conduit à la prévalence mondiale de souches résistantes à tous les β -Lactamines, y compris les carbapénèmes et sa résistance aux antibiotiques est due à des mécanismes combinés, y compris communément l'imperméabilité de la membrane cellulaire, une expression accrue de pompes d'efflux, et la production d'enzyme β -lactamases de plusieurs types (Zarrilli et al., 2013).

Selon Poirel et Nordman., (2006) *Acinetobacter baumannii* possède des mécanismes de résistance naturels aux β -lactamines, correspondant généralement à la production d'une céphalosporinase de type AmpC chromosomique qui peut être hyperproduite, qu'il s'agit de l'insertion en amont du gène codant cette enzyme (AmpC) d'une séquence d'insertion appelée ISAbal qui porte des séquences promotrices fortes.

IV.2.2. Etude de la sensibilité des souches d'*Acinetobacter baumannii* aux autres familles d'antibiotiques

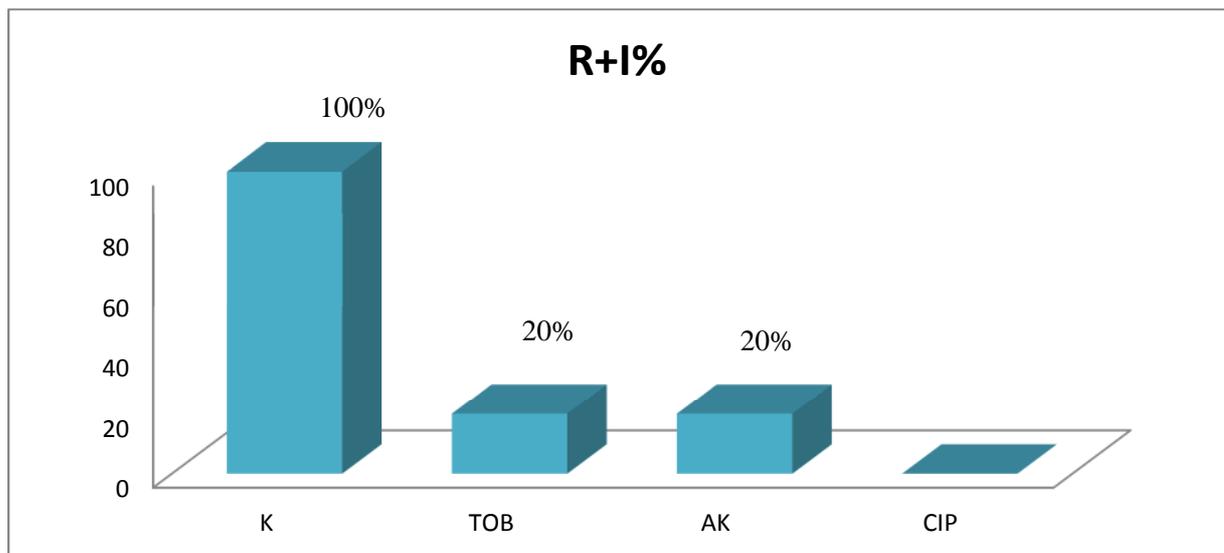


Figure N° 05 : Taux de résistance de souches d'*Acinetobacter baumannii* aux autres familles d'antibiotiques

Cette figure montre que toutes les souches d'*Acinetobacter baumannii* sont résistantes à la kanamycine (100%) et ciprofloxacine reste l'antibiotique le plus efficace contre ces dernières. Les gènes *aac(3)-Ia*, *aadA*, *ant(2'')-I*, *aph(3')*, *aac(6')-Ib* ont été identifiés chez des souches d'*A. baumannii* associés aux gènes codant pour les OXA-23,

OXA-24 et NDM-1 ont été rapporté en Algérie (sétif et Tizi Ouzou) par Bakour et al.,(2013).

IV. 3. Etude de la sensibilité d'*Aeromonas hydrophila* aux antibiotiques

Une souche d'*Aeromonas hydrophila* résistante à tous les antibiotiques testés sauf à la ciprofloxacine (CIP) (Tableau N°VI).

Tableau N°VI: Profil de sensibilité aux antibiotiques.

Code	Souches	CTX	CAZ	FEP	ATM	AMC	ETP	FOX	TOB	K	AK	CIP	BLSE
INFF 58	<i>Aeromonas hydrophila</i>	R	R	R	R	R	R	I	R	R	I	S	-

Des souches *Aeromonas* spp. ont été isolés à partir de prélèvements cutané. Les taux de sensibilité à l'imipénème, aux céphalosporines de troisième génération (C3G), aux aminosides et aux fluoroquinolones étaient supérieurs ou égaux à 90 %. Cette résistance est due probablement à une dérégulation des β -lactamases chromosomiques chez les souches d'*Aeromonas* spp. qui est le mécanisme de résistance le plus fréquent (Fraisse et al., 2008).

V. Détermination des phénotypes de résistance

V.1. Production de BLSE

Toutes les souches sont testées pour la production de β -lactamases à spectre étendu en utilisant la méthode de test de synergie. L'apparition d'une image de synergie indique la production d'une BLSE. Cette image est observée chez 19 (figure N° 06) souches sur la totalité des 29 souches isolées, (18 souches d'*Entérobactéries* et 1 souche d'*Acinetobacter baumannii*), pas d'image de synergie pour *Aeromonas hydrophila*.

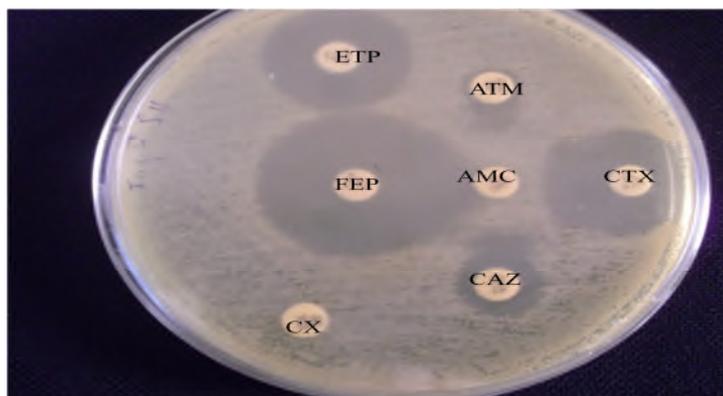


Figure N°06: *Klebsiella oxytoca* (INF-F 54)

Les souches ayant une image de synergie négative, présentant une résistance aux Céphalosporine de troisième génération (C3G), l'Astréoname (FOX), à la céfoxitine (FOX) est due probablement à une hyperproduction d'une céphalosporinase naturelles ou acquises ou bien à une association céphalosporinases au BLSE.

L'utilisation des céphalosporines de troisième génération a permis le développement de la résistance enzymatique chez les entérobactéries par production de bêta-lactamases à spectre étendue (BLSE) (Abid et *al.*, 2007).

Des études à l'échelle nationale les BLSE de type CTX-M (CTX-M-15 et CTX-M-3), de type SHV-12 et de TEM-1 sont isolées en Algérie par (Abid et *al.*, 2007 ; Touati et *al.*, 2006 ; Touati et *al* 2010 ; Souna et *al.*, 2014).

V.2. Production de carbapénèmases

V.2.1. Test de Hodge

Le test de Hodge a permis la mise en évidence de l'enzyme à activité carbapénèmase. L'image de trèfle (figure N°7) était bien visible chez 8/20 (40%) souches retrouvées (ETP-R). les 2 souches d'*Acinetobacter baumannii* et 1 souche d'Entérobactérie (IPM-R) ont présenté une image de trèfle (tableau N°VII).



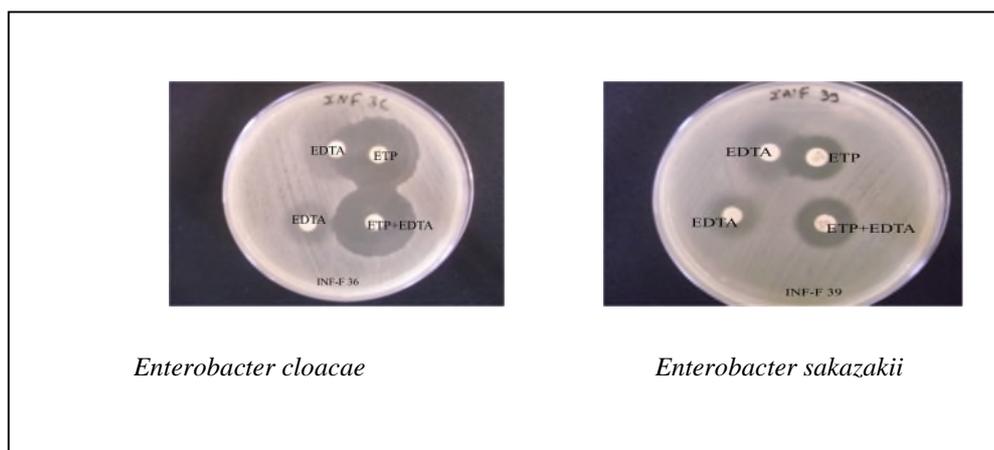
A- Présence d'image de trèfle (*A. baumannii*)

B- Présence d'image de trèfle (*Enterobacter cloacae*)

Figure N°07 : Résultats de test de Hodge sur Mac Conkey

V.2.2. Production de Métallo- β -lactamase (M β L)

Le test à l'EDTA a permis de mettre en évidence 7 souches d'*Enterobacteries* et 2 souches d'*Acinetobacter baumannii* productrices de MBL. Le principale mécanisme de résistance aux carbapénème chez *A.baumannii* et la production de carbapénémase de type OXA et rarement la production de MBL (Boulangier et *al.*, 2012). En Algérie le premier NDM-1 a été retrouvé chez un patient Algérien dans un hôpital d'Oran en 2011. (Mesli et *al.*, 2013).



Enterobacter cloacae

Enterobacter sakazakii

Figure N° 08 : Test a l'EDTA positif.

Les souches ayant acquis gènes de métallo- β -lactamase pourraient être sélectionnés par l'exposition à des agents antimicrobiens et deviennent un réservoir secondaire dans les environnements de soins de santé. (Cornaglia et al., 2011).

L'utilisation de techniques moléculaires basées sur la PCR avec des couples d'amorces spécifiques aux différents groupes de gènes de carbapénèmases permet une identification précise des carbapénèmases (Nordmann et Carre., 2010).

Tableau N° VII : Phénotypes probables de résistance au carbarbapénème (ETP/IPM).

Codes	Hodge test	Test à l'EDTA	Phénotype probable	Codes	Hodge test	Test à l'EDTA	Phénotype probable
INFF 10	-	-	ND	INFF D1	+	-	OXA
INFF 09	-	-	ND	INFF 51A	IPM ⁺	IPM ⁺	MBL
INFF 06	+	-	OXA	INFF 51C	-	-	ND
INFF 39	+	+	MBL	INFF 58	-	+	ND
INFF 8A	+	-	OXA	INFF 11	-	-	ND
INFF 8B	-	-	ND	INFF 54	-	-	ND
INFF 36	+	-	OXA	INFH125A	-	-	ND
INFF E1	+	+	MBL	INFH122C	-	-	ND
INFF E2	-	-	ND	INFH125B	-	-	ND
INFF E3	+	+	MBL	INFH 86	IPM ⁽⁺⁾	IPM ⁽⁻⁾	OXA
INFF E4	-	-	ND	INFH 94	+	+	MBL

D'après le tableau, on remarque que 12 souches sont non productrices de carbapénèmases. La résistance aux carbapénèmes chez ces dernières pourrait être due à l'acquisition d'une imperméabilité aux β -lactamines et, en particulier, aux carbapénèmes. Ce phénotype de résistance composite a été observé chez des souches hyperproductrices de céphalosporinase chromosomique comme *E. aerogenes*, *E. cloacae* ainsi que chez des souches ayant acquis une céphalosporinase plasmidique comme *E. coli* (CMY-2) et *K. pneumoniae*. Ce phénotype de résistance a également été décrit chez des souches d'*E. coli* et de *K. pneumoniae* productrices de BLSE, respectivement de type CTX-M-2 et SHV-2 (Grall et al., 2011).

Gülmez et al. (2008) ont rapportées une résistance aux carbapénèmes chez des souches *E. coli* et *K. pneumoniae* par perte de porines et non pas par production OXA-48 en Turkey. Sz-Rung et al. (2014) ont rapportées la production de BLSE et / ou AmpC combinée avec une perte de porines à Taiwan, par exemple la production de CMY-2 combiné avec une expression diminuée de OmpF et / ou OmpC chez *E. coli* et la perte de OmpK36 combinée avec une production à la fois de ESBL et AmpC chez *K. pneumoniae*.

OXA-48, décrite pour la première fois en Turquie chez *K. pneumoniae*, a pour réservoir naturel les espèces environnementales du genre *Shewanella*. À l'inverse des autres carbapénémases de type OXA, principalement retrouvées chez *Acinetobacter* spp, le groupe OXA-48 n'a été décrit que chez les entérobactéries. Les carbapénémases de type OXA hydrolysent les aminopénicillines, les carboxypénicillines, et seulement partiellement l'imipénème malgré une grande affinité de l'enzyme pour ce substrat. Leur activité n'est pas inhibée par l'acide clavulanique ou le tazobactam. En l'absence d'autres mécanismes de résistance (autres b-lactamases de type BLSE ou AmpC plasmidique, perte de porines, ou pompes à efflux), elles n'entraînent qu'une légère diminution de la sensibilité aux carbapénèmes. De plus, l'hydrolyse des céphalosporines est quasi-inexistante (Grall et al., 2011).

La prise en charge du problème des bactéries BMR est un véritable défi. Malgré toutes les dispositions prises en matière d'hygiène hospitalière, l'environnement inanimé entourant les patients peut être contaminé par des souches de BGN multirésistantes et indiquent ainsi que les surfaces et les objets peuvent servir comme réservoir secondaire à la transmission croisée de ces souches.

Dans cette étude on peut déduire que le taux de multirésistance retrouvé est relativement élevé ce qui implique que l'émergence de BMR en milieu hospitalier est devenu problème inquiétant. Ceci est favorisé par la pression de sélection exercé par les antibiotiques et l'accumulation de divers mécanismes de résistance au sein des souches résistantes.

En perspectives, les résultats obtenus au cours de notre étude restent préliminaires et méritent d'être exploités et complétés par :

- L'étude moléculaire pour déterminer les mécanismes impliqués dans cette résistance ;
- Étude d'un plus grand nombre de souches ;
- Étude de la clonalité des souches et de leur environnement génétique ;

A

Abid F., Boutefnouchet N., Dekhil M. and Bouzerna N. (2007). *Klebseilla pneumoni* productrices de Beta-lactamases à spectre Elargi (BLSE) isolées dans les hopitaux de la ville d'Annaba, Algerie. Scientific Study & Research. 3: 199-214.

B

Baba Ahmed Z. et Alet G. (2014). Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie. Pathologie Biologie .Article in press.

Bakour S., Kempf M., Touati A., Ait Ameer A., Haouchine DJ.,Sahli F.,et Rolain J. (2012). Journal of Medical Microbiology. Carbapenemase-producing Acinetobacter baumannii in two university hospitals in Algeria.

Bakour S., Kempf M., Touati A., Ait Ameer A., Haouchine DJ.,Sahli F.,et Rolain J. (2013). Antibiotic resistance determinants of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii clinical isolates in Algeria.

Barbut F. et Neyme D. (2006). Les difficultés d'interprétation des controles microbiologiques environnementaux. Revue Francophone des laboratoires. (382).27-32.

Bellace T et Yous S. (2012). Caracterisation des phénotypes de résistance aux β -lactamines chez les souches de bacilles a gram négatif isolées de l'environnement hospitalier, cas du CHU de bejaia. Mémoire en Master.

Bertrou A., Chapuis C. et Hajjar J. (2000). Relation entre contamination et environnement hospitalier. In : Vigilance Environnementale : controles microbiologiques de l'environnement hospitalier. Hygienes. 8 (3) : 142-146.

Bosi C. (2000). Analyse Bactériologique de l'environnement Hospitalier. Précis de Bactériologie Clinique. Ed. ESKA. Paris. 408-437.

Boulangier A., Nass T., Figueiredo S., et Nordmann. P. (2012). NDM-1-Producing Acinetobacter baumannii From Algeria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2214-2215.

C

CA-SFM. (2012): Comité français de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.

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

Cardoso C. L, Pereiraa H. Zequimb J.C. Guilhermettia M .(1999).Effectiveness of hand-cleansing agents for removing *Acinetobacter baumannii* strain from contaminated hands. Vol.27, No.4.

Cavallo J. D., Antoniotti G., BAffo N. Y., Condras G S., Hajjar J., Horn C., Le Gouhir C., Le Guyader A., Le jeune B., Mounier M. and Salomon V. (2002). Surveillance Microbiologique de l'environnement dans les Etablissements de santé Air, eaux et surfaces. Ministère chargé de la santé, DGS/DHOS, CTIN. France. 70p.

Cholley P, Thouverez M , Gbaguidi-Haore H ., Bertrand X., Talon D. (2013). Application des méthodes de typage génomique Au laboratoire d'hygiène. Elsevier Masson SAS.

Cornaglia G., Giamarellou H., et Rossolini G. (2011). Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams.? *Lancet Infect Dis*; 11: 381–93.

D

D'Alessandro E., (2012).« Prévenir le risque infectieux à l'hôpital ? », Anthropologie & Santé.

Dakic I., Morrison D., Vukovic D., Savic B., shittu A., Hauschild P.J.T., and Stepanovic S. (2005). Isolation and Molecular Characterization of *Staphylococcus sciuri* in the Hospital Environment. *J Hosp Infect.* 62: 200-206.

Dancer S. J. (1999). Mopping up hospital infection. *J Hosp Infect.* 43: 85-100.

Dancer S., Coyne M., Robertson C., Thomson A., Guileri A., et Alcock S. (2006). Antibiotic use in association with resistance of environmental organisms in a teaching hospital. *J Hosp Infect.* 62 : 625-432.

Dunand S. (2006). La tenue vestimentaire des infirmières prise de position. *Ordre des infirmières et infirmiers du Québec.* 218-237.

F

Fraisse T., Lechiche C., Sotto A., et Lavigne J.-P. (2008). Infections à *Aeromonas* spp. : étude rétrospective de 1997 à 2004 au CHU de Nîmes. *Pathologie Biologie.* 56. 70–76.

Frensh G. I., Otter J.A., Shannon K.P., Adams N., Watling D., et Parks M.J. (2004). Tackling contamination of the hospital environment by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a comparison between conventional terminal cleaning and hydrogen peroxide vapour decontamination. *J Hosp Infect.* 57 : 31-37.

G

Grall H., Andremont A., et Armand-Lefèvre A. (2011). Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ? *Journal des Anti-infectieux* (Article in press).

Gülmez D., Woodford N, Marie-France I., Shazad Mushtaq P., Metan G., Yakupogullari Y., Kocagoz S., Uzun O., Hascelik G., et Livermore D. (2008). Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 31. 523–526.

H

Habzi A. et Benomar S. (2001). Les infections néonatales nosocomiales. *Journal De Pédiatrie et De Puériculture* ; 14 :419-24.

Hodge W., Ciak J., Tramont E.C. (1978). Simple method for detection of penicillinase-producing *N. gonorrhoeae*. *Journal of Clinical Microbiology.* 7, 102-103.

Hota B. (2004). Contamination, Disinfection, and Cross-Colonization : Are Hospital Surfaces Reservoirs for Nosocomial Infection? *Clin.Infect Dis.* 39: 1182-1189.

Hung K., Yan J., Lu Jang-Jih ., Chen H., Wu J.J. (2013). Characterization of the modified Hodge test positive isolates of Enterobacteriaceae in Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* .46, 35;40.

I

Iabadene H., Messai Y., Ammari H., Ramdani-Bougoussa N., Lounes S., Bakour R. and Arlet G. (2008). Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. *J Antimicrob Chemother.* 62: 133-136.

Inter Clin des Hauts Cantons de l'Hérault (ICHC). (2009). Guide Pratique de la Maîtrise des Bactéries Multirésistantes aux Antibiotiques.1-27.

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. *Infect Dis* **10**: 867-878.

Jeong S.H., Bae I.K., Park K.O., An Y.J., Sohn S.G., Jang S.J., Sung K.H., Yang K.S., Lee K., Young D. et Lee S.H. (2006). Outbreaks of Imipenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing Carbapenemases in Korea. *The Journal of Microbiology*. **44**(4), 423-431.

L

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 MacConkey agar for screening carbapenemases producing Gram-negative bacilli. *Journal of Microbiological Methods* **83**,149–152.

Le Minor, C., and C. Richard. (1993). Méthode de laboratoire pour l'identification des entérobactéries. Institut Pasteur, France.

Liassine N. (2000). Problème des pathogènes Gram négatifs résistants aux antibiotiques en milieu hospitalier. *Schweiz Med Wochenschr.* **130**: 1930-6.

M

Mesli E, Berrazag M, Drissi M, Bekkhoucha SN, Rolain JM. (2013). Prevalence of carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo- β -lactamase in *Acinetobacter* species, Algeria. *International Journal of Infectious Diseases*. xxx.e1–xxx.5.

Messai Y., Iabadene H., Benhassine T., Alouache S., Tazir M., Gautier V., Arlet G., et Bakour., R. (2008). Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria) Prévalence et caractérisation des β -lactamases à spectre élargi chez *Klebsiella pneumoniae* dans des hôpitaux d'Alger (Algérie). *Pathologie Biologie* **56** : 319–325.

Meradi L., Djahoudi A., Abdi A., Bouchakour M., J. Perrier Gros C., et Timinouni M. (2009). Résistance aux quinolones de types qnr, aac (6')-Ib-cr chez les entérobactéries isolées à Annaba en Algérie. *Pathologie Biologie* xxx xxx–xxx.

N

Nordmann P. (2010). Résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif. *Medecines/Sciences*. **26**(11), 950-959.

Nordmann P., Carrer A. (2010). Les carbapénèmases des entérobactéries. *Archives de Pédiatrie*;17:S154-S162.

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.

O'Fallon E., Schreiber R., Kandel R., et D'Agata E. (2009). Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria at a Long-Term Care Facility: Assessment of Residents, Healthcare Workers, and Inanimate Surfaces. *Infection control and hospital epidemiology*. vol. 30, no. 12

P

Philppon A., et Arlet G (2006). β -lactamase de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel français des laboratoires. *352* : 41-55.

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

R

Ramdani-Bouguessa N., Mendonça N., Leitao J., Ferreira E, Tazir., M et Caniça M. (2006). CTX-M-3 and CTX-M-15 extended spectrum β -lactamases in isolates of *Escherichia coli* from a hospital in Algiers, Algeria. *Journal of Clinical Microbiology*. 44 suppl 12 : S4584-4586.

Rampling A., Wiseman S., Davis L., Hyett A. P., Walbridge A. N., Payne G.C. and Cornaby A. J. (2001). Evidence that hospital hygiene is important in the control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect*. 49 : 109-116.

Rose MD.M, Landman MD.D, Quale MD.J. (2014). Are community environmental surfaces near hospitals reservoirs for gram-negative nosocomial pathogens. *American Journal of Infection Control* 42 ; 346-8.

S

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. *Médecine et maladies infectieuses* 44 :146–152.

T

Touati A., Benallaoua S., Djoudi F., Madoux J., Brasme L., et De Champs Ch. (2007). Characterization of CTX-M-15-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Strains Isolated from Hospital Environments in Algeria. *Microbial Drug Resistance* Volume 13, Number 2, © Mary Ann Liebert, Inc. Doi: 10.1089/Mdr.715.

Touati A., Benallaoua S., Forte D., Madoux J., Brasme L., et de Champs Christophe. (2006). First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 β -lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in B'ejaja, Algeria. *International Journal of Antimicrobial Agents* 27, 397–402.

Touati A., Brasme L., Benallaoua S., Gharout A., Madoux J., De Champs Ch.(2008). First report of qnrB-producing *Enterobacter cloacae* and qnrA-producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 60, 287–290.

Touati M, Diene SM, Racherache A, Dekhil M et Djahoudi A. (2012). Emergence of bla OXA-23 and blaOXA-58 carbapenemase-encoding genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from University Hospital of Annaba, Algeria. *Int J Antimicrob Ag.* 40, 84,84-93.

Touati A., Zenati K., Brasme L., Benallaoua S., de Champs C. (2010). Extended spectrum β -lactamase characterisation and heavy metal resistance of Enterobacteriaceae strains isolated from hospital environmental surfaces. *Journal of Hospital Infection* (Article in press)1–2.

Y

Yaici L et Zekar F. (2012). Caractérisation des phénotypes de résistance aux β -lactamines de souches de bacilles a gram négatif isolées des surfaces de l'environnement hospitalier. Mémoire en Master.

Annexe I

Composition des milieux de culture (pour 1 litre d'eau distillée)

(Le Minor et Richard, 1993)

Gélose Mac Conkey

Peptone de caséine.....	17g
Peptone de viande.....	03g
Lactose.....	10g
Mélange de sels biliaires.....	1,50g
Rouge neutre.....	0,03g
Chlorure de sodium	05g
Cristal violet	0,001g
Agar	10g

pH 7,4

Gélose BCP

Peptone	05g
Extrait de viande.....	03g
Lactose.....	10g
Pourpre de bromocrésol.....	10g
Agar	15g

pH 7

Milieu Uré Silect4 (Bio-RAD)

Base nutritive contenant 4peptone

2substras chromogènes : β -galactosidase et β -glucosidase

Tryptophane

Gélose nutritive

Peptone	10g
Extrait de viande.....	05g

Annexe

Chlorure de sodium	05g
Gélose	15g

pH : 7

Gélose EMB

Peptone	10 g
Lactose	10 g
Phosphate bipotassique.....	2 g
Eosine	0,4 g
Bleu de méthylène	65 mg
Agar	15 g

Gélose Mueller-Hinton

Infusion de viande de bœuf	300g
Hydrolysate de caséine.....	17,5g
Amidon	1,5g
Agar	17g

pH : 7,4

Gélose TSI

Extrait de viande de bœuf.....	03g
Extrait de levure.....	03g
Peptone tryptique	20g
Chlorure de sodium	05g
Citrate ferrique.....	0, 3g
Lactose.....	10g
Glucose	01g
Saccharose	10g
Rouge de phénol	0, 05g
Agar	12g

pH 7,4

Milieu de Citrate de Simmons

Citrate de sodium.....	02g
Chlorure de sodium	05g

Annexe

Sulfate de magnésium.....	0,2g
Phosphate monoammoniaque.....	0,1g
Phosphate bipotassique.....	0,1g
Bleu de bromothymol.....	0,08g
Agar.....	15g

pH : 7 - 7,2

Bouillon nitraté

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

pH : 7,2

Bouillon nutritif

Macération de viande.....	10g
Peptone trypsique.....	05g
NaCl ou KCl.....	05g

pH 7,3

Annexe II : Composition des réactifs des réactifs utilisés

Réactif de VPI

α -naphthol	6g
Alcool à 90%	100 ml

Réactif VPPII

NaOH 4N

Réactif de Griess I (NRI)

Acide parasulfanilique	8g
Acide acétique 5N	1l

Réactif de Griess II (NRII)

α -naphtylamine.....	6g
Acide acétique 5N	1l

Réactif de Kovacs

Alcool amylique ou isoamylique	150 ml
p.Diméthylaminobenzaldehyde	10 g
Acide chlorhydrique concentré	50 ml

Réactif de Tryptophane désaminase (TDA)

Soluté de perchlorure de fer $FeCl_3$	10ml
Eau distillée	20ml

Annexe III : Résultats d'identification biochimique

Tableau N°VIII : Résultats d'identification biochimique des souches d'*Acinetobacter baumannii*

codes	souches	Glu	Lac	Gaz	H2S	Cit	BN	44°C	Uriselect
INFF 37	<i>A.baumannii</i>	-	-	-	-	+	-	+	Blanc laiteux
INFF 51A	<i>A.baumannii</i>	-	-	-	-	+	-	+	Blanc laiteux
INFF 30	<i>A.baumannii</i>	-	-	-	-	+	-	+	Blanc laiteux
INFF 43	<i>A.baumannii</i>	-	-	-	-	+	-	+	Blanc laiteux
INFH 86	<i>A.baumannii</i>	-	-	-		+	-	+	Blanc laiteux

Légende : GLU : glucose, Lac : lactose, Cit : citrate, BN : bouillon nitraté.

Tableau N°IX: Résultats d'identification des entérobactéries par la galerie API20E.

Codes	Souches	%	Uriselect
INFF D1	<i>Enterobacter sakazakii</i>	75,3	Bleu
INFF E2	<i>Enterobacter sakazakii</i>	75	Bleu avec contour rose
INFF E3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4	Bleu
INFF 36	<i>Enterobacter cloacae</i>	87,4	Bleu avec contour rose
INFF 39	<i>Enterobacter sakazakii</i>	75	Bleu avec contour rose
INFH 94	<i>klebsiella pneumoniae</i>	98,8	Bleu
INFF 10	<i>E.coli</i>	100	Rose claire
INFF G	<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,4	Bleu
INFF 09	<i>E.coli</i>	100	Rose claire
INFF 08A	<i>E.coli</i>	100	Rose claire
INFH 125A	<i>E.coli</i>	100	Rose claire
INFF 58	<i>Aeromonas hydrophila</i>	99,8	Bleu
INFH 122C	<i>E.coli</i>	100	Rose claire
INFH 131	<i>klebseilla pneumoniae</i>	98,8	bleu
INFF 51C	<i>E.coli</i>	100	Rose claire
INFH 122B	<i>Enterobacter sakazakii</i>	93,2	Bleu avec contour rose
INFF D4	<i>Klebsiella oxytoca</i>	78,6	Bleu
INFF 54	<i>Klebsiella oxytoca</i>	78,6	Bleu
INFF 06	<i>Klebsiella pneumoniae sup pneumoniae</i>	73,6	Bleu
INFF 08B	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	98,8	Bleu
INFF E1	<i>Proteus mirabilis</i>	31	Marron
INFF 11	<i>Escherichia vulniris</i>	89,2	Bleu
INFF 59	<i>Enterobacter agglomerans</i>	97,7	Bleu
INFH 125B	<i>Enterobacter sakazakii</i>	99,3	Bleu avec contour rose

Résumé

Objectif : Caractérisation de la résistances aux β -lactamines chez les bacilles à Gram négatif isolés des surfaces de l'environnement hospitalier du C.H.U de Constantine.

Méthode : 156 prélèvements ont été effectués à partir de l'environnement hospitalier (Air, surfaces inertes et vivantes). L'isolement a été fait sur gélose Mac Conkey additionnée de ceftazidime (4 μ g/ml) et de vancomycine (8 μ g/ml). Les souches isolées ont fait l'objet d'une identification et d'une caractérisation de la sensibilité vis-à-vis des β -lactamines et d'autres familles d'antibiotiques. Les phénotypes de résistance aux β -lactamines ont été étudiés.

Resultats : Au totale de 29 souches de bacilles à Gram négatif ont été identifiées dont 23 souches sont des Entérobacteries, 5 souches d'*Acinetobacter baumannii* et une souche de *Aeromonas hydrophila*. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a révélé que toutes les souches sont résistantes aux céfotaxime, ceftazidime, l'aztréonam et l'amoxicilline-acide clavulanique, 29 souches résistantes à la céfoxitine et 2 souches d'*Acinetobacter baumannii* sont résistantes à l'imipénème.

19 souches ont été révélées productrice d'une β -lactamase à spectre étendu (BLSE) et 22 souches sont résistantes à l'ertapénème par la production des carbapénèmases de type Métallo- β -lactamases ou de type oxacilinasés.

Mots clés : Environnement hospitalier, bacilles à Gram négatif, résistance, BLSE, carbapénémase.

Summary

Objective: Characterization of β -lactam resistance in Gram-negative bacilli isolated from the surfaces of Constantine Hospital Teaching.

Method: 156 samples were taken from the hospital environment (air, inert and living surfaces). The isolation was done on MacConkey agar supplemented with ceftazidime (4 μ g/ml) and vancomycin (8 μ g/ml). The isolates were subjected to identification and characterization of the sensitivity to β -lactams and other antibiotics. Phenotypes of resistance to β -lactam antibiotics were studied.

Results: A total 29 strains of Gram negative bacilli were identified of which 23 strains are Enterobacteria 5 strains of *A. baumannii* and one strain of *Aeromonas hydrophila*. The study of antibiotic susceptibility showed that all strains are resistant to cefotaxim, ceftazidim, aztreonam and clavulanic acid, amoxicillin, 29 strains resistant to cefoxitin and 2 strains of *Acinetobacter baumannii* are resistant to imipenem.

19 strains were found to producing of extended spectrum β -lactamase (ESBL) and 22 strains were resistant to ertapenem by carbapenemase production of metallo- β -lactamase type oxacilinasés or combination of these two types of enzyme and impermeability and / or efflux system.

Keywords: Environment hospital, Gram negative bacilli, resistance, ESBL, carbapenemase