

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*

Option : Microbiologie Moléculaire et Médicale

*Thème*

*Caractérisation de la résistance aux  $\beta$ -  
lactamines de souches de bacilles à Gram  
négatif isolées de l'environnement hospitalier  
au niveau de service de réanimation du  
CHU de Sétif*

Réalisé par :

M<sup>lle</sup> ZAMOUCHE Hanane  
M<sup>lle</sup> ZEBBOUDJI Hakima

Devant le jury composé de :

M<sup>r</sup> AISSAT K.  
M<sup>r</sup> DJOUDI F.  
M<sup>me</sup> OUANAS S.  
M<sup>me</sup> BELHADI K.

Président  
Examineur  
Examinatrice  
Promotrice

2012-2013

## *Remerciements*

*Nous remercions le Dieu le tout Puissant, qui nous a procuré courage et volonté pour réaliser ce modeste travail.*

*Nous tenons à remercier notre promotrice M<sup>me</sup> Belhadí K pour nous avoir encadré, pour son assistance bien matériel que morale, pour son aide, son soutien et son bon humeur au long de la réalisation de ce travail.*

*Nos remerciements s'adressent également à*

*M<sup>r</sup> Touati A., M<sup>r</sup> Bakour S., M<sup>r</sup> Belhadí D., M<sup>r</sup> Belmahdí M<sup>d</sup>., M<sup>me</sup> Gharout A., M<sup>lle</sup> Tafoukt R. et M<sup>lle</sup> Mezhoud H. pour leurs aide et leurs disponibilité au long de notre stage pratique.*

*Tout le personnel de service de réanimation du CHU de la wilaya de Sétif.*

*Finalement, nous tenons à remercier les membres de jury, c'est pour nous un grand honneur de vous avoir juges de ce travail.*

# *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A Mes très chers parents pour leur amour, leurs encouragements et soutien sans faille que dieu les garde.*

*A Mes grands parents que dieu les garde et les protège.*

*A mes chers frères Nabil, Ali et Fares.*

*A mes oncles, mes tentes, mes cousins et mes cousines.*

*A tous mes amis(es) plus particulièrement Kahina A., Kahina M., Kako, Soraya, Taous, Warda, Houda, Karima, Meriem, Sihem, et Tinhinane.*

*A ma chère binôme Hakima et sa famille.*

*Et à tous ceux qui nous ont aidés à la réalisation de ce mémoire.*

*En fin à tous ceux que je connais ou qui me connaissent que je n'ai pas pu les citer.*

*Hanane*

# *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail*

*A*

*Mes très chers parents*

*Pour leur amour, leurs encouragements et soutien.*

*Mes frères et sœurs*

*Vous êtes ce que j'ai de plus précieux dans la vie. Pour l'amour que je vous porte et en témoignage de mon éternel dévouement je vous dédie ce travail avec tous mes souhaits de réussite et de bonheur.*

*Mes amies, pour leur aide et encouragement sans cesse.*

*Tous mes camarades de promotion.*

*Pour ton aide, ton affection, ta compréhension et ton encouragement, trouve ici l'expression de mon amour et de mon éternelle reconnaissance, pour toi Saadia.*

*A toi Hanane*

*Ma chère binôme, Que la clémence d'Allah éclaire ton chemin.*

*Ma promotrice*

*Pour sa Compréhension, disponibilité, attention et soutien.*

*ZEBBOUDJI Hakima*

## *Sommaire*

**Liste des tableaux**

**Liste des figures**

**Liste des abréviations**

**Introduction**.....1

### *Synthèse bibliographique*

I. Environnement hospitalier, réservoir potentiel de microorganismes impliqués dans les infections nosocomiales.....	2
II. Surveillance de l'environnement en réanimation .....	3
III. La résistance aux antibiotiques.....	3
III .1. Résistance naturelle.....	3
III.2. Résistance acquise.....	3
III.3. Les $\beta$ -lactamases.....	4

### *Matériel et méthodes*

I. Sites de prélèvements.....	6
I.1. Prélèvement de surfaces .....	7
I.2. Prélèvement d'air.....	7
II. Isolement et purification.....	7
III. Identification.....	7
IV. Etude de la sensibilité aux antibiotiques.....	9
V. Recherche des phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines.....	10
V.1.Recherche de BLSE .....	10
V.2.Recherche de carbapénèmases .....	10
V.3. Recherche de Métallo- $\beta$ -lactamases.....	10
VI. Détermination des concentrations minimal inhibitrices.....	11

## *Résultats et discussion*

I. Répartition des prélèvements par sites .....	12
II. Souches bactériennes.....	13
II.1. Répartition des souches par espèces.....	13
II.2. Répartition des souches par sites de prélèvement.....	13
III. Sensibilité aux antibiotiques.....	15
III.1. Résistance des souches d' <i>A. baumannii</i> aux antibiotiques .....	17
III.2. Résistance des souches d'entérobactéries aux antibiotiques.....	18
IV. Détermination des phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines.....	20
IV.1. Production de BLSEs.....	20
IV.2. Production de carbapénèmases.....	22
IV.3. Production de Métallo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ Ls).....	23
V. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et la détection des oxacillinases.....	23
Conclusion.....	27

Références bibliographiques

Annexes

## Liste des tableaux

**Tableau N°I :** Relation entre la classification moléculaire d'Ambler et fonctionnelle de Buch et Jacoby.

**Tableau N°II :** Sites de prélèvement au niveau du service de réanimation.

**Tableau N°III :** Tests d'identification biochimiques.

**Tableau N°IV :** Antibiotiques testés.

**Tableau N°V :** Préparation des gammes d'antibiotiques.

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

**Tableau N°VII :** Répartition des souches isolées par sites de prélèvement.

**Tableau N°VIII :** Profil de sensibilité aux antibiotiques.

**Tableau N°IX :** Répartition de la résistance des souches d'entérobactéries par espèce

**Tableau N°X :** Résultats des CMI de l'imipénème des souches d'*A. baumannii*.

**Tableau N°XI :** Phénotypes probables de résistance à l'imipénème de souches d'*A. baumannii*.

## Liste des tableaux annexes

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

**Tableau N° II:** Diamètres des zones d'inhibitions des antibiotiques testés (mm) .

**Tableau N° III:** Résultats d'identification biochimique des souches d'*A. baumannii* par la galerie classique.

**Tableau N°IV:** Résultats d'identification des entérobactéries par galerie API20E.

## Liste des figures

**Figure N°1:** Répartition des souches isolées par espèces.

**Figure N°2 :** Taux de résistance des souches d'*A. baumannii* aux antibiotiques.

**Figure N°3 :** Nombre de souches d'entérobactéries résistantes aux antibiotiques.

**Figure N°4:** Résultats du test de synergie sur gélose MH.

**Figure N°5 :** Résultats du test de Hodge pour *A. baumannii*.

**Figure N°6 :** Résultats du test à l'EDTA.

**Figure N°7 :** Les CMI de l'imipénème pour quelques souches testées.

## Liste des figures annexes

**Figure N°1 :** Exemple de résultats d'identification par la galerie API20E (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca* et *C. freundii*).



## Liste des abréviations

**ADH** : Arginine Déshydrogénase

**AK** : Amikacine

**AMC**: Amoxicilline-Clavulanate

**AN** : Acide Nalidixique

**ATM** : Aztréonam

**BGN** : Bacilles Gram Négatif

**BLSE**: -Lactamase à Spectre Etendu

**BMR** : Bactéries Multirésistantes

**C** : Chloramphénicol

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

**CAZ** : Ceftazidime

**CHU** : Centre Hospitalier Universitaire

**CIT** : Citrate

**CTX** : Céfotaxime

**CTX-M** : Céfotaximase - Munich

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**C2G** : Céphalosporine de deuxième Génération

**C3G** : Céphalosporine de Troisième Génération

**EDTA**: Ethylène Diamine Tétra-acétique

**FOX** : Céfoxitine

**GEL** : Gélatinase

**GLU**: Glucose

**GM** : Gentamicine

**HM**: Muller Hinton

**H2S**: Hydrogène sulfuré

**I** : Intermédiaire

**IMP** : Imipenèmes

**INO**: Inositol

**LAC** : Lactose

**LDC** : Lysine Décarboxylases  
**MAN**: Mannitol  
**MBL** : Métallo- -Lactamase  
**NaCl** : Chlorure de sodium  
**NI** : Non Inclus  
**NR** : Nitrate Réductase  
**ODC** : Orthinine Décarboxylases  
**ONPG** : Orthonitrophényl -D-Galactopyranoside  
**OXA** : Oxacillinase  
**R** : Résistant  
**RHA** : Rhamnose  
**RIF** : Rifampicine  
**RM** : Rouge de Méthyle  
**S**: Sensible  
**SAC**: Saccharose  
**SHV**: Sulfhydryl Variable  
**SOR**: Sorbitol  
**TDA**: Tryptophanase Désaminase  
**TE** : Tétracycline  
**TEM** : Temoneira  
  
**TZB** : Tazobactame  
  
**TOB** : Tobramycine  
**TSI** : Triple Sugar Iron  
**UFC/ml** : Unité Formant Colonie/ Millilitre  
**URE** : Uréase  
**V** : Variable  
**VP** : Vogues-Proskauer

### Introduction

L'environnement hospitalier regroupe habituellement l'eau, l'air, les surfaces, les dispositifs médicaux et les circuits du linge, aliments et déchets des activités de soin (Hamza *et al.*, 2008).

La contamination de l'environnement hospitalier varie quantitativement et qualitativement d'un établissement à un autre, au sein d'un même établissement, en fonction des services, des patients, des soins pratiqués et la capacité de survie des microorganismes dans l'environnement (biofilm) (Hélène, 2010).

Les microorganismes de l'environnement ont un potentiel d'acquisition très rapide de résistance aux antibiotiques (Hélène, 2010) et l'accroissement du nombre d'infections provoquées par des bactéries multirésistantes (BMR) en particulier les bacilles à Gram négatif (BGN) et l'acquisition de nouveaux mécanismes de résistance chez ces derniers posent un problème de plus en plus préoccupant au niveau des hôpitaux. En effet, les infections nosocomiales ont une incidence sur le coût des soins, en allongeant la durée de séjour et en augmentant le coût du traitement (Chaplain, 1997).

Le contrôle de la diffusion de ces bactéries multirésistantes aux antibiotiques et le bon usage de ces derniers font maintenant l'objet de nombreuses recommandations afin de limiter la propagation de ces germes dans et entre les établissements de santé, mais également en milieu communautaire (Levent *et al.*, 2005). En effet, ce risque est important en réanimation où les malades peuvent être soumis à des traitements aux antibiotiques multiples modifiant leurs flores. L'environnement proche de ces malades colonisés et/ou infectés est alors souvent contaminé, ce qui peut favoriser une dissémination aux autres malades par transmission croisé (Girou et Fagon, 1998).

Notre étude a été menée dans le but d'évaluer le niveau de résistance aux  $\beta$ -lactamines et aux autres familles d'antibiotiques des bacilles à Gram négatif isolés des surfaces et de l'air de l'environnement hospitalier au niveau du service de réanimation du CHU de Sétif en adoptant la méthodologie suivante :

- Isolement et identification des souches.
- Etude de la sensibilité aux antibiotiques de ces souches.
- Caractérisation phénotypique des mécanismes de résistances au  $\beta$ -lactamines.
- Détermination des CMI.

## **I. Environnement hospitalier, réservoir potentiel de microorganismes impliqués dans les infections nosocomiales.**

L'environnement hospitalier est constitué de l'ensemble des éléments liquides, solides, gazeux qui environnent ou entrent en contact avec les patients, les visiteurs ou le personnel dans une structure hospitalière (Le Heurt et *al.*, 1995 ; Bosi, 2000).

Deux types de bactéries peuvent être retrouvés dans l'environnement des patients :

- Des bactéries d'origine humaine (peau, muqueuses) parmi lesquelles des bactéries multirésistantes aux antibiotiques comme *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline, les entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi ou les entérocoques résistants à la vancomycine.
- Des bactéries d'origine environnementale dont certaines ont de fréquentes résistances naturelles aux antibiotiques, notamment chez les bacilles à Gram négatif non fermentaire tels que *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Legionella pneumophila* ou les mycobactéries atypiques (*Mycobacterium avium*).

La survie et la multiplication de ces bactéries conditionnent la nature, l'importance de la colonisation environnementale et la capacité de l'environnement à devenir un réservoir dans lequel les microorganismes persistent et peuvent être transmis. Cette survie dans l'environnement, favorisée par la formation de biofilms au niveau des surfaces, varie selon les bactéries et la nature des surfaces contaminées (Talon, 1999).

La contamination de l'environnement par des microorganismes fait poser la question de leur responsabilité dans la genèse des infections nosocomiales. En effet, les épidémies d'infections nosocomiales sont presque toujours associées à une transmission inter-humaine, ou à la contamination de l'environnement de proximité du malade (dispositifs médicaux), de l'environnement général de l'hôpital tel que l'air et les liquides normalement stériles (Cavallo et *al.*, 2002).

## **II. Surveillance de l'environnement en réanimation**

Les services de réanimation, « épïcentre de la résistance aux antibiotiques », sont et resteront le lieu où les infections à bactéries multirésistantes sont les plus fréquentes, malgré les mesures de prévention en vigueur (Arsalane et *al.*, 2010). Cela est lié à la grande fréquence de prescription d'antibiotiques chez cette population, pour traiter des infections communautaires ou hospitalières motivant le transfert en réanimation (Brun-Buisson et *al.*, 2005).

La surveillance de l'environnement hospitalier est un des moyens efficaces pour réduire les infections nosocomiales, particulièrement dans les services exposés (réanimation). L'épidémiologie des infections nosocomiales en réanimation est complexe, en relation avec des facteurs endogènes (âge, gravité, statut immunitaire, intervention chirurgicale, ...) et exogènes représentés essentiellement par l'exposition aux techniques invasives (intubation, cathéter, sondage urinaire) que la surveillance doit prendre en compte (Lepape et *al.*, 1999).

## **III. La résistance aux antibiotiques**

La résistance aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif en milieu hospitalier concerne de nombreuses bactéries et recouvre un ensemble hétérogène aussi bien dans ses mécanismes de résistance, ses supports génétiques, sa sélection que son potentiel de dissémination (Liassine, 2000).

### **III .1. Résistance naturelle**

La résistance naturelle ou intrinsèque est un caractère d'espèce qui touche toutes les bactéries de l'espèce considérée. Elle est stable, transmise à la descendance et elle a pour support génétique le chromosome bactérien (Lozniewski et *al.*, 2010).

### **III.2. Résistance acquise**

Il s'agit d'un caractère qui ne concerne alors que quelques (ou parfois de nombreuses) souches d'une espèce donnée. Elle est moins stable et résulte d'une modification du capital génétique de la bactérie, lui permettant de tolérer une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce (Lozniewski et *al.*, 2010).

Les gènes de résistance acquise résultent soit de l'acquisition de gènes extérieurs à la bactérie soit d'une (ou de plusieurs) mutations d'un gène endogène. La résistance liée à l'acquisition de gènes extérieurs est fréquente, sont de localisation chromosomique ou extra-chromosomique et portés par des plasmides, des transposons ou des intégrons (Liassine, 2000).

### III.3. Les $\beta$ -lactamases

#### a. Définition

Les  $\beta$ -lactamases sont un groupe hétérogène d'enzymes d'origine bactérienne capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines par ouverture du cycle  $\beta$ -lactame, structure de base commune à toutes les  $\beta$ -lactamines. Elles constituent de loin le mécanisme de résistance le plus répandu aux  $\beta$ -lactamines chez les bacilles à Gram négatif (Cavallo *et al.*, 2004).

#### b. Classification

Les classifications les plus utilisées sont la classification structurale d'après Ambler et la classification fonctionnelle par groupes en fonction des spectres de substrat d'après Bush-Jacoby-Meideros (Cavallo *et al.*, 2004).

##### ➤ La classification d'Ambler

La classification d'Ambler, qui reflète la structure fondamentale de l'enzyme, est basée sur la séquence péptidique du site enzymatique ou sur la séquence totale du gène codant la  $\beta$ -lactamase. Elle propose quatre classes : classes A, D, C (enzymes à sérine) et B (métalloenzymes) (Cavallo *et al.*, 2004).

- **La classes A** : Pénicillinases de type sérine protéases, inhibées par l'acide clavulanique (AC) et le tazobactame, comme les principales BLSEs (SHV, TEM, CTX-M...).

- **La classe B** : Métalloenzyme, dont le site actif contient au moins un ion de zinc, résistant à l'AC mais inhibées par l'EDTA, comme certaines carbapénémases (VIM, IMP, GIM...)

- **La classe C** : Céphalosporinases insensible à l'AC, mais inhibées par la cloxacilline, comme les céphalosporinases de type AmpC.

- **La classe D** : Oxacillinases hydrolysant la cloxacilline et peu inhibées par l'AC, constituant une famille extrêmement diverse en termes de spectre d'hydrolyse (Boyer *et al.*, 2011).

##### ➤ Relation entre la classification moléculaire d'Ambler et fonctionnelle de Bush et Jacoby.

La classification fonctionnelle de Bush-Jacoby-Medeiros, plus complète et plus récente, reflète le spectre d'activité de l'enzyme et répartit les  $\beta$ -lactamases en quatre groupes en fonction de leurs profils de substrat (pénicilline, oxacilline, carbénicilline, céphaloridine, céphalosporines de troisième génération et imipénème) et d'inhibition (AC et EDTA). La connaissance de la séquence en acides aminés autour du site actif pour de nombreuses enzymes permet d'effectuer une corrélation avec la classification moléculaire d'Ambler (Cavallo *et al.*, 2004) (Tableau N°I).

**Tableau N°I :** Relation entre la classification moléculaire d'Ambler et fonctionnelle (Bush et Jacoby).

Groupe de Bush -Jacoboy (2009)	Groupe de Bush -Jacoboy (1995)	Classe moléculaire	Substrat préférentiel	Inhibition par		Caractéristiques	Enzyme représentatives
				AC ou TZB	EDTA		
1	1	C	Céphalosporines	Non	Non	-Hydrolyse meilleure des céphalosporines que les benzylpénicillines ; -Hydrolyse les céphamycines.	ACT-1 CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI	C	Céphalosporines	Non	Non	-Hydrolyse accrue de la céftazidime et souvent autres oxymino- -lactamines.	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Pénicillines	Oui	Non	-Hydrolyse meilleure de la benzylpénicilline que des céphalosporines.	PC1
2b	2b	A	Pénicillines et C1G	Oui	Non	Hydrolyse similaire de la benzylpénicilline et des céphalosporines.	TEM1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Céphalosporines à spectre étendue, monobactames	Oui	Non	Hydrolyse augmentée vis-à-vis des oxymino- -lactamines.	TEM-3, SHV-2, CTX-M 15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Pénicillines	Non	Non	-Résistance au clavulanate, sulbactam et tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Céphalosporines à spectre étendue, monobactames	Non	Non	-Hydrolyse augmentée vis-à-vis des oxymino- -lactamines ; - Résistance aux inhibiteurs de - lactamases.	TEM-50
2c	2c	A	Carbénicilline	Oui	Non	- Hydrolyse meilleur pour les carbénicilline	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbénicilline, céfépime	Oui	Non	- Hydrolyse de la carbénicilline, céfipime, céfpirome	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacilline	V	Non	-Hydrolys de la Cloxacilline ou oxacilline.	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Céphalosporine à spectre étendue	V	Non	-Hydrolys de la cloxacilline ou oxacilline. mais aussi oxymino- -lactamines.	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapénèmes	V	Non	-Hydrolys de la Cloxacilline ou oxacilline et les carbapénèmes	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Céphalosporines à spectre étendue	Oui	Non	-Hydrolyse les céphalosporines ; -Inhibition par le clavulanate mais pas par l'aztréonam.	CepA
2f	2f	A	Carbapénèmes	V	Non	-Hydrolys des carbapénèmes, oxymino- -lactamines et céphamycines.	KPC-2; IMI1 ; SME-1
3a	3	B(B1)	Carbapénèmes	Non	Oui	-Hydrolyse à large spectre incluant les carbapénèmes mais pas les monobactames.	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
		B(B3)					L-1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3d	3	B(B2)	Carbapénèmes	Non	Oui	-Hydrolyse des carbapénèmes	CphA, Sfh-1
NI	4	inconnu					

**V :** Variable      **NI :** Non inclus

## Matériel et méthodes

### I. Sites de prélèvements

Des prélèvements de surfaces (inertes et vivantes) et de l'air ont été effectués au niveau du service de réanimation de CHU de la wilaya de Sétif (Tableau N°II).

**Tableau N°II : Sites de prélèvement au niveau du service de réanimation.**

Salles		Sites de prélèvements	Nombre de prélèvements
Chambres de malades	Chambre N°1	Poignée de porte, interrupteur, radiateur, chariot, respirateur, aspirateur, barboteur d'oxygène, tuyauterie d'aspiration, ballon de réanima.	60
	Chambre N°2	Bordure de lit, poignée de porte, interrupteur, chariot, respirateur, aspirateur, scope, seringue électrique, tuyauterie d'aspiration, tuyauterie respirateur, sonde urinaire.	
	Chambre N°3	Bordure de lit, drap, poignée de porte, interrupteur, chariot, respirateur, aspirateur, scope 330527, seringue électrique, sonde urinaire, éosine.	
	Chambre N°4	Bordure de lit, drap, poignée de porte, interrupteur, radiateur, chariot, respirateur, aspirateur, scope, barboteur d'Oxygène, sonde urinaire.	
	Chambre N°5	Bordure de lit, drap du lit, poignée de porte, interrupteur, buccale d'aspirateur.	
	Chambre N°6	Bordure de lit, poignée de porte, interrupteur, radiateur, chariot de malade, respirateur, aspirateur, tuyau d'aspiration, scope 330331, barboteur d'Oxygène, seringue électrique, tuyauterie respirateur, ballon de réanima.	
Couloire		Bureau, paillasse, téléphone, robinet d'eau, chariot de matériel, chariot d'appareil, lavabo, écoray, bordure de fenêtres, paillasse et lavabo inox, plateau du matériel, tambour, placard, poignée d'armoire, distributeur de savon, appareils pour filtrer l'air, télévision, drap et bordure de lit vide.	20
Personnel		Mains, blouses, stéthoscopes	17
Air		Chambre de malade N°2	8
		Chambre de malade N°4	
		Chambre de malade N°6	
		Couloire	
Total		105	



### I.1. Prélèvement de surfaces

Les prélèvements de surfaces ont été effectués en passant un écouvillon stérile préalablement humidifié avec un bouillon nutritif en stries parallèles rapprochées, en faisant tourner légèrement l'écouvillon mouillé. L'écouvillon est ensuite réintroduit dans le bouillon nutritif et incubation à 37°C pendant 48h (Quensel et *al.*, 1998).

### I.2. Prélèvement de l'air

Les prélèvements de l'air ont été effectués par sédimentation en laissant ouverte des boîtes contenant la gélose Mac Conkey additionnée de 4µg/ml de céftazidime pendant 4h puis incubation à 37°C pendant 48h (Merah, 2009).

## II. Isolement et purification

A partir des bouillons d'enrichissement positif on ensemence une gélose sélective des bactéries à Gram négatif : Mac Conkey additionné de 4 µg/ml de céftazidime. Après incubation à 37°C pendant 24h, les colonies différentes ayant poussées ont fait l'objet d'une purification selon les critères macroscopique sur le même milieu d'isolement.

## III. Identification

- **L'examen macroscopique** de l'aspect des colonies des souches isolées sur Mac Conkey permet l'orientation de l'identification: Couleur, taille, forme.
- **L'examen microscopique** des souches isolées est réalisé par le test de coloration de Gram.
- **Incubation à 44°C** pour *Acinetobacter baumannii*.
- **Galleries biochimiques** : sont effectuées par des tests biochimiques classiques (Tableau N°III) et confirmé pour les souches d'entérobactéries par une galerie API20E selon le protocole suivant :

#### ➤ Réalisation de galerie API20E

A partir d'une culture jeune sur milieu gélosé, une suspension bactérienne dense est préparée en dissociant 4 à 5 colonies dans 5 ml d'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne est introduite dans chaque tube à l'aide d'une micropipette.

Les tubes et les cupules sont remplis pour les tests CIT, VP et GEL et uniquement les tubes sont remplis pour les autres tests. Les cupules sont remplies de l'huile de vaseline stérile pour les testes ADH, LDC, ODC, URE et H<sub>2</sub>S afin de créer une anaérobiose. La

galerie est placée dans son support dont les alvéoles sont remplies d'eau, refermée par un couvercle puis incubé à 37°C pendant 24h.

Après incubation, la révélation des résultats par adition des réactifs (TDA, VP, Kovacs) pour les tests TDA, VP, et IND respectivement et on note les résultats spontanés pour les autres tests. L'identification est ensuite obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification (Apident).

**Tableau N°III : Les tests d'identification biochimiques**

Test	Principe	Lecture
<b>Fermentation des sucres, production de gaz et de H<sub>2</sub>S sur milieu TSI</b>	Ensemencement à partir d'une suspension bactérienne de la pente par stries serrées puis le culot par piqure centrale. Incubation à 37°C/24h.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Virage au jaune du fond de tube : Fermentation de glucose (+).</li> <li>• Virage au jaune de la pente : Fermentation de lactose (+).</li> <li>• Apparition de bulles d'air : Production de gaz.</li> <li>• Noircissement de milieu : production d'H<sub>2</sub>S.</li> </ul>
<b>Utilisation du citrate comme seul source de carbone sur milieu citrate de Simmons</b>	Ensemencement par stries séries de la pente. Incubation à 37°C/ 24 h à 7 jours.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Un virage au bleu indique un test positif.</li> </ul>
<b>Réduction des nitrates sur bouillon nitraté</b>	Ensemencement du bouillon à partir de la suspension. incubation à 37°C/24h.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• On ajoute quelques gouttes des réactifs NRI et NRII, une nitrate réductase positive se traduit par l'apparition d'une coloration rouge.</li> </ul>
<b>Production d'indole sur milieu peptoné exempt d'indole</b>	Ensemencement du milieu. Incubation à 37°C/24h.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adition du réactif de Kovacs, l'apparition d'un anneau rouge en surface indique un teste positif.</li> </ul>
<b>Etude de type fermentaire</b>	Ensemencement du milieu glucosé avec quelques gouttes de la suspension bactérienne. Incubation à 37°C/24h.	<p>On divise le contenu du tube en deux</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajout des réactifs VPI puis VPII dans le premier tube.</li> <li>• Ajout de réactif rouge de méthyle (RM) dans le deuxième.</li> <li>• Virage au rouge : VP (+).</li> <li>• Coloration rouge : RM (+).</li> </ul>

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

La sensibilité aux antibiotiques est déterminée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la société Française de Microbiologie (CA-SFM 2010).

##### ➤ Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture jeune, la suspension bactérienne est préparée pour obtenir un inoculum de  $10^8$  UFC/ml puis diluée à  $1/10^{\text{ème}}$  pour avoir une charge finale de  $10^7$  UFC/ml.

##### ➤ Ensemencement

La suspension est ensemencés sur les boites de Muller-Hinton (MH) par écouvillonnage, Les disques d'antibiotiques sont déposés sur les boites, puis incubées à 37°C pendant 24h.

##### ➤ Lecture

Les diamètres d'inhibition sont mesurés directement par un pied à colis afin de déterminer le profil de sensibilité aux antibiotiques selon les valeurs critiques établies par la CA-SFM 2010.

Les antibiotiques testés sont représentés dans le tableau IV.

**Tableau IV** : Antibiotiques testés (CA-SFM 2010)

Antibiotiques		Charges (µg)	Diamètres critiques (mm)				Familles
			Bactéries fermentaires		Bactéries non fermentaires		
			(S)	(R)	(S)	(R)	
Céfoxitine	FOX	30	22	<15	22	<15	C2G
Céfotaxime	CTX	30	26	<23	26	<23	C3G
Céftazidime	CAZ	30	26	<19	21	<19	C3G
Amoxicilline - clavulanate	AMC	20+10	21	<15	21	<16	Aminopenicilline
Imipénème	IMP	10	24	<17	24	<17	Carbapénème
Aztréonam	ATM	30	27	<21	27	<21	Monobactames
Acide nalidixique	AN	30	20	<15	20	<15	Quinolones
Gentamycine	GM	15	18	<16	16	<16	Aminosides
Tobramycine	TM	10	18	<16	16	<16	Aminosides
Amikacine	AK	30	17	<15	17	<15	Aminosides
Chloranphénicol	C	30	23	<23	23	<23	Phénicol
Rifampicine	RIF	30	19	<14	19	<14	Rifamycines
Tétracycline	TE	30UI	19	<17	19	<17	Tétracyclines

### V. Recherche des phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines

#### V.1. Recherche de BLSEs

La présence de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSEs) est révélée par la méthode de Jarlier et *al.* (1988) qui consiste à appliquer sur une gélose Mueller Hinton, préalablement ensemencée par la souche testée, un disque de céftazidime (CAZ), céfotaxime (CTX), aztréonam (ATM) et un disque d'amoxicilline + acide clavulanique (AMC), distant de 1,5 cm.

La démonstration phénotypique de la présence d'une  $\beta$ -lactamase à spectre élargie consiste à mettre en évidence une image de synergie entre un disque de céphalosporine de troisième génération et /ou aztréonam et le disque d'amoxicilline + acide clavulanique (Aruna et Mobashshera, 2012).

#### V.2. Recherche de carbapénèmases

La production d'une carbapénèmase est systématiquement recherché chez toutes les souches résistante et /ou de sensibilité réduite à l'imipénème par le test de Hodge (Hodge et *al.*, 1998)

Un disque d'imipénème est appliqué au centre d'une boîte de Mac Conkey (MC) préalablement ensemencée avec la souche d'*Escherichia Coli* ATCC 25922 (sensible à tout les antibiotiques). Ensuite, les souches à tester, un témoin positif correspondant à une souche d'*A. baumannii* productrice d'une carbapénèmase, et une souche sensible à l'imipénème comme témoin négatif sont ensemencées sur la gélose sous forme de stries déposées à partir du disque d'imipénème jusqu'à la périphérie de la boîte. Après une nuit à 37°C, 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 carbapénèmase (Cuzon et *al.*, 2010).

#### V.3. Recherche de Métallo- $\beta$ -lactamases

La détection phénotypique des métallo-  $\beta$ -lactamases est fondée sur des critères habituels propres à cette classe : inhibition par l'EDTA (Philippon et Arlet, 2003).

Elle consiste à déposer 4  $\mu$ l d'une solution d'EDTA à 0,5 M ; pH : 8 sur un disque d'imipénème et de comparer le diamètre obtenu avec celui du disque d'imipénème seul (Philippon et Arlet, 2006).

Un deuxième test est réalisé pour confirmer la présence de ces enzymes qui consiste à déposer 10 µl d'EDTA à 0,5 M sur un disque vierge, placé à 20 mm centre à centre avec un disque d'imipénème.

Un résultat positif se traduit par une image de synergie entre le disque d'imipénème et celui à l'EDTA (Jeong *et al.*, 2006).

### VI. Détermination des concentrations minimales inhibitrices

La recherche des concentrations minimales inhibitrices (CMI) est réalisée pour 28 souches d'*A. baumannii* vis-à-vis de l'imipénème sur milieu gélosé MH et MH + NaCl afin d'apprécier la réduction des CMI par le NaCl, selon les recommandations du CA-SFM (2010).

#### ➤ Préparation des gammes d'antibiotiques

Une solution mère de l'imipénème à 2 µg/ml a été préparée, des volumes déterminés sont prélevés et ajoutés à un volume d'une gélose MH et MH additionné de NaCl (200 mM) en surfusion dans le but d'obtenir des concentrations croissantes de l'imipénème (Tableau N°V), le milieu est coulé sur des boîtes puis séché.

**Tableau N°V : Préparation des gammes d'antibiotiques**

Concentration Finale en IMP (µg/ml)	8	16	32	64	128
Volume de la solution d'IMP en (ml)	0,8	1,6	3,2	6,4	12,8
Volume de MH (ml)	199,2	198,4	196,8	193,6	187,2

#### ➤ Ensemencement

Une suspension bactérienne est préparée en dissociant 4 à 5 colonies dans 5 ml d'eau physiologique stérile puis diluée à 1/100<sup>ème</sup>.

L'ensemencement est effectué par spot avec 10 µl de la suspension bactérienne d'une densité de 10<sup>6</sup> UFC/ml pour obtenir une densité de 10<sup>4</sup> UFC/ml, suivi d'une incubation à 37°C pendant 24 h.

#### ➤ Lecture

La concentration minimale inhibitrice correspond à la plus faible concentration d'antibiotique capable d'inhiber toute croissance visible à l'œil nu (CA-SFM, 2010).

### Résultats et discussion

#### I. Répartition des prélèvements par sites

Au total 105 prélèvements ont été réalisés au niveau du service de réanimation du CHU de Sétif dont 97 prélèvements sont effectués au niveau des surfaces et 8 prélèvements de l'air. Le nombre de prélèvements et de souches isolées par sites est représenté dans le tableau N°VI.

**Tableau N°VI** : Nombre de prélèvements et de souches isolées par sites

Sites	Nombre de prélèvement	Nombre de souche	Sites	Nombre de prélèvement	Nombre de souche
Interrupteur	6	1	Robinet d'eau	1	1
Poignée de porte	6	2	Lavabo	1	0
Scope	4	3	Ecoray	1	1
Barboteur d'oxygène	3	2	Bordure de fenêtre	2	1
Seringue électrique	3	4	Paillasse et lavabo inox	1	0
Respirateur	5	3	Tambour	1	0
Bordeur de lit	5	3	Plateau du matériel	1	0
Aspirateur	5	3	Placard	1	0
Tuyauterie d'aspiration	3	3	Poignée d'armoire	1	0
Tuyauterie de respiration	2	0	Distributeur de savon	1	0
Télévision	1	0	Téléphone	1	0
Buccale d'aspiration	1	0	Mains	8	0
Chariot	7	4	Air	8	1
Radiateur	2	0	Appareils pour filtrer l'air	1	0
Drap de malade	5	3	Stéthoscope	1	1
Sonde urinaire	3	4	Bureau	1	0
Ballon de réanima	2	0	Paillasse	2	1
Eosine	1	0	Blouses	8	2

La présence de souches sur les surfaces en contact avec les patients (Bordeur de lit, drap de malade, aspirateur ...) suggère que leurs flore endogène peut être impliquée dans la contamination de ces surfaces inertes. En outre des souches sont également isolées des surfaces en contact avec le personnel (Poignée de porte, stéthoscope, blouses...) suggère l'implication de ce dernier dans la transmission des germes d'un patient à un autre ou de l'environnement aux patients.

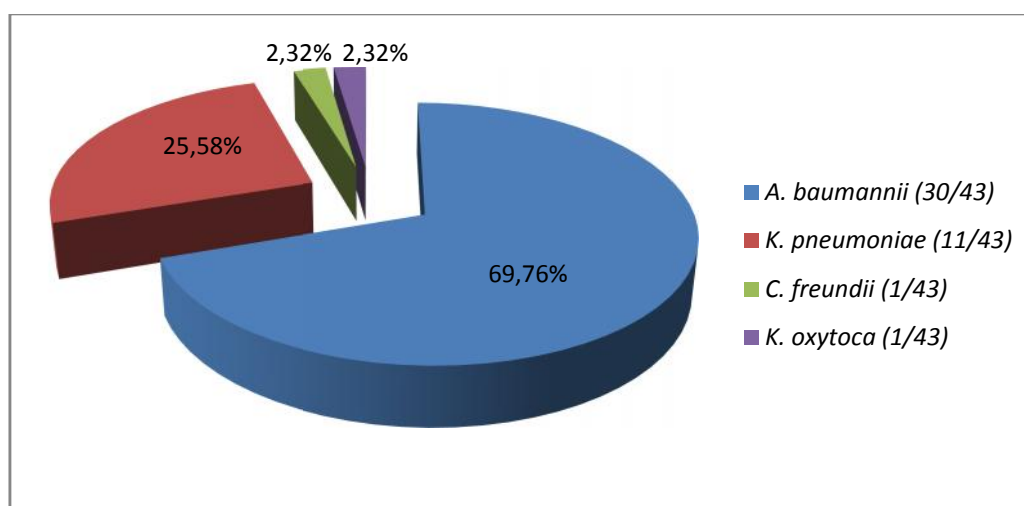
Les bactéries résistantes aux antibiotiques sont transmises entre les patients dans les hôpitaux à travers la contamination de leurs environnement inanimé ou par des vecteurs humains (Webb et *al.*, 2005).

### II. Souches bactériennes

Cette étude a été effectuée sur un collectif de 43 souches de bacilles à Gram négatif isolées de l'air et de différentes surfaces analysées.

#### II.1. Répartition des souches par espèces

Parmi les souches isolées 69,76% (30/43) sont des *Acinetobacter baumannii* qui appartenant aux bacilles non fermentaires, et 30,23% (13/43) appartenant aux entérobactéries dont 25,58% (11/43) sont des *Klebsiella pneumoniae*, suivi par *Klebsiella oxytoca* et *Citrobacter freundii* présentant un taux de 2,32% (1/43) respectivement (figure N°1).



**Figure N°1:** Répartition des souches isolées par espèce

Cette figure montre une prédominance des souches d'*A. baumannii*. La diffusion de cette espèce est attribuée à la survie prolongée du germe dans l'environnement hospitalier (Lahsoune, 2007), qui est Selon Kramer et *al.* (2006) peut survivre 5 jours à 5 mois et plus sur des surfaces sèches et inanimées.

#### II.2. Répartition des souches par sites de prélèvement

Le tableau N°VII représente la répartition des souches selon leurs sites de prélèvement.

**Tableau N°VII :** Répartition des souches isolées par sites de prélèvement

Code	Sites de prélèvement		Souche identifiée
SR02	Chambre N°6	Poignée de porte	<i>Acinetobacter baumannii</i>
SR03	Chambre N°6	Scope	<i>Acinetobacter baumannii</i>
SR04	Chambre N°6	Barboteur d'oxygène	<i>Acinetobacter baumannii</i>
SR06	Chambre N°6	Bordeur de lit	<i>Acinetobacter baumannii</i>
SR07	Chambre N°6	Respirateur	<i>Acinetobacter baumannii</i>
SR08	Chambre N°6	Aspirateur	<i>Acinetobacter baumannii</i>
SR09	Chambre N°6	Tuyau d'aspiration	<i>Acinetobacter baumannii</i>
SR12	Chambre N°6	Chariot de malade	<i>Acinetobacter baumannii</i>
SR15	Chambre N°4	Bordure de lit	<i>Acinetobacter baumannii</i>
SR16	Chambre N°4	Barboteur d'oxygène	<i>Klebseilla pneumoniae</i>
SR17	Chambre N°4	Respirateur	<i>Klebseilla pneumoniae</i>
SR18	Chambre N°4	Scope	<i>Acinetobacter baumannii</i>
SR19	Chambre N°4	Aspirateur	<i>Klebseilla pneumoniae</i>
SR20	Chambre N°4	Chariot	<i>Acinetobacter baumannii</i>
SR22	Chambre N°4	Drap de malade	<i>Acinetobacter baumannii</i>
SR23	Chambre N°4	Sonde urinaire	<i>Acinetobacter baumannii</i>
SR24	Chambre N°2	Poignée de porte	<i>Acinetobacter baumannii</i>
SR26	Chambre N°2	Respirateur	<i>Acinetobacter baumannii</i>
SR29	Chambre N°2	Tuyauterie d'aspiration	<i>Klebseilla pneumoniae</i>
SR30	Chambre N°2	Drap	<i>Klebseilla pneumoniae</i>
SR32	Chambre N°2	Sonde urinaire	<i>Klebseilla pneumoniae</i>
SR34	Chambre N°2	Chariot	<i>Acinetobacter baumannii</i>
SR35B	Chambre N°2	Seringue électrique	<i>Klebseilla pneumoniae</i>
SR35A	Chambre N°5	Seringue électrique	<i>Acinetobacter baumannii</i>
SR37	Chambre N°1	Interrupteur	<i>Acinetobacter baumannii</i>
SR38	Chambre N°1	Chariot	<i>Acinetobacter baumannii</i>
sSR39	Chambre N°1	Aspirateur	<i>Acinetobacter baumannii</i>
SR40	Chambre N°1	Tuyauterie d'aspiration	<i>Klebseilla pneumoniae</i>
SR49A	Chambre N°3	Sonde urinaire.	<i>Klebseilla pneumoniae</i>
SR47B	Chambre N°3	Drap	<i>Acinetobacter baumannii</i>
SR48	Chambre N°3	Scope	<i>Acinetobacter baumannii</i>
SR49C	Chambre N°3	Sonde urinaire.	<i>Acinetobacter baumannii</i>
SR50	Chambre N°3	Bordure de lit	<i>Acinetobacter baumannii</i>
SR51B	Chambre N°3	Seringue électrique	<i>Acinetobacter baumannii</i>
SR51A	Chambre N°3	Seringue électrique	<i>Klebseilla pneumoniae</i>
SR59	Couloire	Paillasse	<i>Acinetobacter baumannii</i>
SR62	Couloire	Robinet d'eau	<i>Klebseilla oxytoca</i>
SR64	Couloire	Ecoray	<i>Acinetobacter baumannii</i>



## Résultats et discussion

SR65	Couloire	Bordure de fenêtre	<i>Acinetobacter baumannii</i>
SR88	Personnel	Blouse	<i>Citrobacter freundii</i>
SR84	Personnel	Blouse	<i>Acinetobacter baumannii</i>
SR93	Personnel	Stéthoscope	<i>Klebseilla pneumoniae</i>
E1	Air	Chambre de malade	<i>Acinetobacter baumannii</i>

Le tableau ci-dessus montre que les surfaces qui rentrent en contact direct avec les patients et le personnel (matériel médical, draps, blouses...) en réanimation présentent un réservoir de différentes espèces bactériennes représentées majoritairement par *A. baumannii*, selon Levent T et *al.*, (2011) ce germe colonise l'environnement hospitalier (système de ventilation, siphons de lavabos, robinetteries, linges humides, matériel présent dans la chambre du malade, matériel médical...) et présente une survie prolongée sur du matériel inerte ou des poussières grâce à sa résistance à la dessiccation.

La présence d'une souche d'*A. baumannii* dans l'air suggère que ce dernier est aussi impliqué dans la transmission des germes. D'après Lucet et Astagneau (1998), l'air joue un rôle important comme un vecteur des microorganismes de patient à patient.

### III. Sensibilité aux antibiotiques

Les profils de sensibilité aux antibiotiques de souches isolées sont représentés dans le tableau N°VIII est déterminés selon les valeurs critiques de la CA-SFM 2010.

Tableau N° VIII: Profil de sensibilité aux antibiotiques

Code	souche	FOX	CTX	AMC	CAZ	ATM	IPM	NA	AK	GN	RIF	TE	TOB	C
SR02	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R
SR03	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R
SR04	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R
SR06	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R
SR07	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	R	R
SR08	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	I	S	R
SR09	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R
SR12	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	S	R	R	S	I	R	S	R
SR15	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	R	R
SR18	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S	R
SR20	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S	R
SR22	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	I	R	I	S	I	S	S	R
SR23	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	I	R	I	S	R	R
SR24	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R
SR26	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	I	R	S	R	R	S	S	R
SR34	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	S	S	R
SR35A	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R
SR37	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	I	R	S	S	S	S	S	R
SR38	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	I	R	I	S	S	R
SR39	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R
SRE1	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S
SR48	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R
SR65	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S
SR50	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R
SR84	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	S	S	R
SR59	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R
SR47B	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R
SR51B	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S	R
SR49C	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R
SR64	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R
SR19	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S
SR29	<i>K. pneumoniae</i>	I	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S
SR30	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	I	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S
SR35B	<i>K. pneumoniae</i>	I	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S
SR40	<i>K. pneumoniae</i>	I	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	S
SR62	<i>K. oxytoca</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S
SR88	<i>C. freundii</i>	R	R	R	I	R	S	S	S	R	S	R	S	R

## Résultats et discussion

SR32	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	S	R	I	R	R	S	R	R
SR16	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	S	R	I	R	R	S	I	R
SR17	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	S	R	S	R	I	S	S	R
SR49A	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S
SR93	<i>K. pneumoniae</i>	I	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	S
SR51A	<i>K. pneumoniae</i>	S	R	S	R	I	S	R	S	R	R	R	I	S

S: sensible R: résistant I: intermédiaire

**FOX** : Cefoxitine, **CTX** : Céfotaxime, **AMC** : Amoxiciline acide clavulanique, **CAZ** : Céftazidime, **ATM** : Aztréonam, **IPM** : Imipenème, **NA** : Acide nalidixique, **GN** : Gentamicine, **RIF** : Rifampicine, **TE** : Tétracycline, **TOB** : Tobramycine, **C** : chloramphénicol.

On note d'après ce tableau que les 43 souches étudiées expriment une résistance vis-à-vis la majorité d'antibiotiques testés.

### III.1. Résistance des souches d'*A. baumannii* aux antibiotiques

Les taux de résistances des souches d'*A. baumannii* aux antibiotiques sont donnés dans la figure N°2.

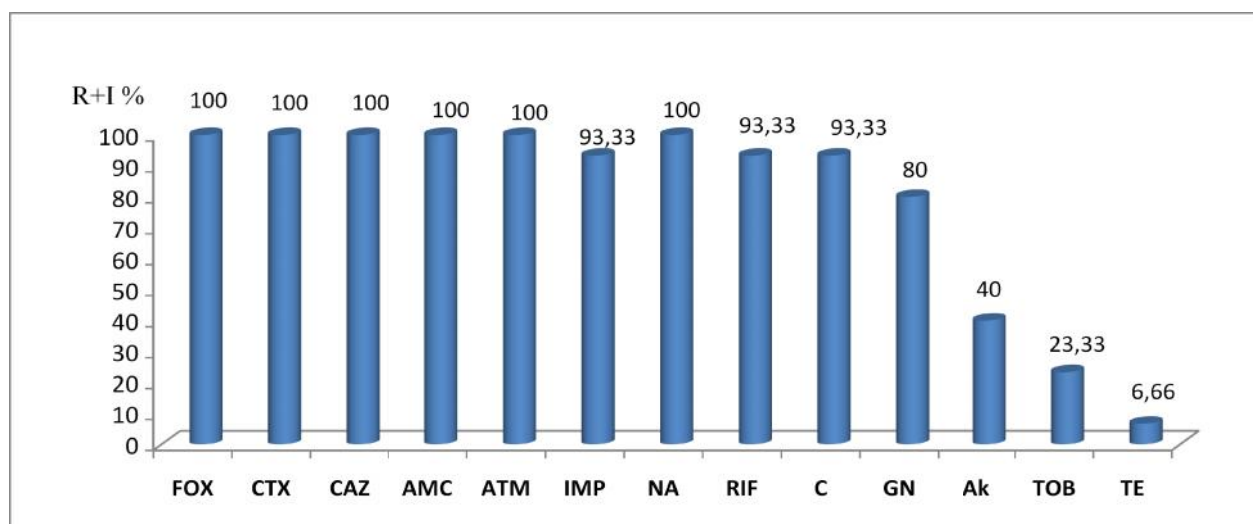


Figure N°2 : Taux de résistances des souches d'*A. baumannii* aux antibiotiques.

- Les pourcentages de résistance aux  $\beta$ -lactamines des souches d'*A. baumannii* sont les suivants : **100%(30 /30)** vis-à-vis de la ceftazidime, le céfotaxime, la céfoxitine, l'aztréonam et l'amoxicilline-acide clavulanique. Le taux de résistance à l'imipenème est de **93,33%(28 /30)**.

Aygün et *al.* (2002) ont rapporté des taux de résistance à la ceftazidime et à l'imipénème de 81,7% et 18,3% respectivement ces taux sont inférieurs à ceux que nous avons obtenus vis-à-vis ces deux antibiotiques, et des taux similaires vis-à-vis du céfotaxime ont été observés.

- La résistance des souches d'*A. baumannii* aux aminosides est variable, la gentamicine représente un pourcentage très important avec un taux de 80%(24 /30), suivi de 40%(12 /30) pour l'amikacine, et 23, 33%(7 /30) pour la tobramycine.

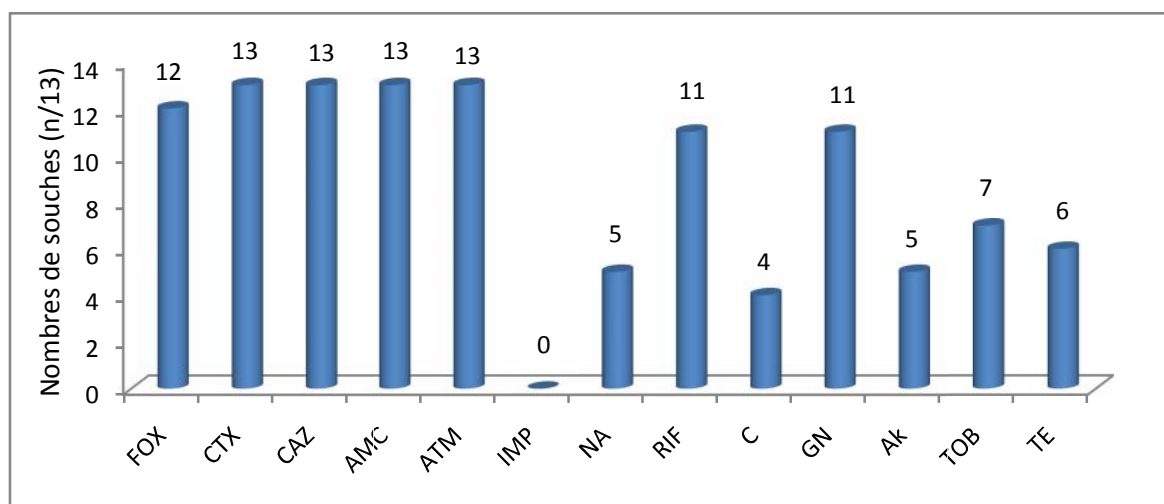
Les aminosides sont largement utilisés pour le traitement des infections à *A. baumannii*, seul ou en association avec les -lactamines. La cause la plus fréquente de la résistance d'*A. baumannii* aux aminosides est la modification de groupes hydroxyle ou amine de l'antibiotique par des enzymes. Tous les trois types d'enzymes de modification des aminoglycosides (acétylases, adénylases et phosphotransférases) ont été détectés dans des isolats cliniques d'*A. baumannii* mais avec des variations géographiques (Looveren, 2004).

- Les taux de résistance aux autres antibiotiques sont : 100%(30 /30) vis-à-vis de l'acide nalidixique, 93,33%(28/30) vis-à-vis et du chloramphénicol, la tétracycline reste l'antibiotique le plus actif contre cette bactérie avec un taux de résistance le plus faible 6,66%(2/30).

Un taux de résistance élevée est observée vis-à-vis de la rifampicine (28/30), ce taux est nettement plus important que celui obtenu par Bakour et *al.*, (2013) sur un collectifs de 42 souches d'*A. baumannii* isolées à partir de prélèvements pathologiques au niveau du même CHU où ils ont rapporté seulement une souche résistante à la rifampicine. Plusieurs études ont rapportées que *A. baumannii* peut être résistante à la rifampicine par mutation au niveau de la région RRDR de gène *rpoB* (Thapa et *al.*, 2009 ; Giannouli et *al.*, 2012 ; Bakour et *al.*, 2013).

### III.2. Résistance des souches d'entérobactéries aux antibiotiques

Les nombres de souches d'entérobactéries résistantes aux antibiotiques sont rapportés dans la figure N°3.



**Figure N°3 :** Nombre de souches d'entérobactéries résistantes aux antibiotiques.

- Cette figure montre que les 13 souches d'entérobactéries présente une résistance vis-à-vis la ceftazidime, le cefotaxime, l'amoxicilline-acide clavulanique et l'aztréonam, 12 souches sont résistantes à la céfoxitine et aucune résistance n'a été marquée pour l'imipenème.
- La résistance des souches d'entérobactéries aux aminosides est représentée par un nombre important, 11 souches sont résistantes à la gentamicine, suivie de 7 souches résistent à la tobramycine et 5 souches sont résistantes à l'amikacine.

Le mécanisme de résistance aux aminosides le plus significatif chez de souches cliniques est la modification enzymatique de l'antibiotique le profil exact de résistance dépend de l'aminoside utilisé (Georgopadakou, 2008).

- Le nombre de souches résistantes aux autres antibiotiques est de 11 pour la rifampicine, 6 pour la tétracycline, 5 pour l'acide nalidixique, 4 pour le chloramphénicol.

- **Répartition de la résistance des souches d'entérobactéries par espèce**

La répartition du nombre de souches d'entérobactéries résistantes par espèce vis-à-vis des antibiotiques testés est rapportée dans le tableau N°IX.

**Tableau N°IX:** Répartition de la résistance des souches d'entérobactéries par espèce

ATB Souche	Nombre de souches résistantes												
	FOX	CTX	AMC	CAZ	ATM	IMP	NA	AK	GN	RIF	TE	TOB	C
<i>K. pneumoniae</i>	10/11	11/11	11/11	11/11	11/11	0/11	5/11	5/11	10/11	10/11	5/11	7/11	3/11
<i>K. oxytoca</i>	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1
<i>C. freundii</i>	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	1/1

Les 11 souches de *K. pneumoniae* sont résistantes aux céfotaxime et la céftazidime, et cela est supérieur à celui rapporté par Touati et al. (2007) où 5 souches de *K. pneumoniae* étudiées sont résistantes à ces deux antibiotiques.

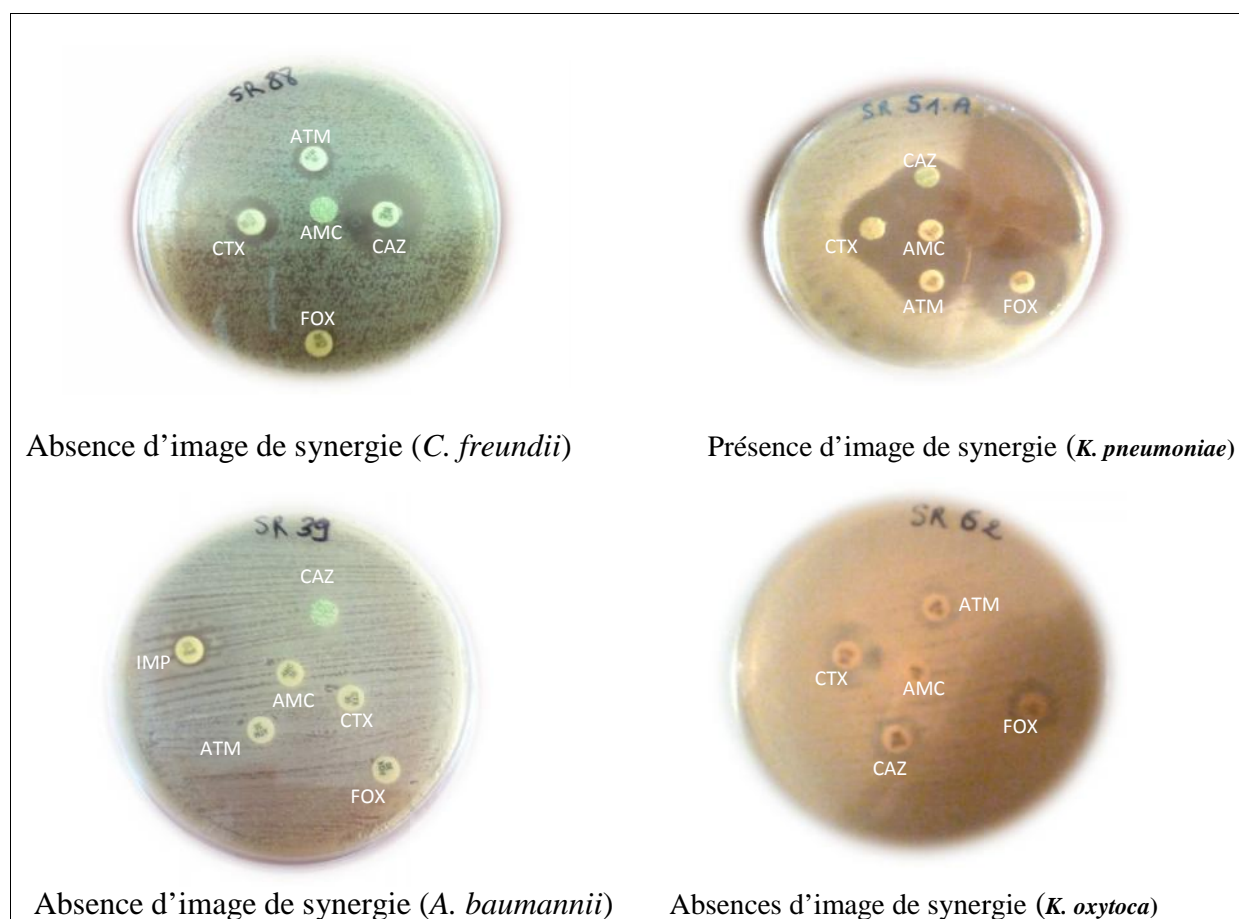
Toutes les souches de *K. pneumoniae* sont sensibles à l'imipénème, ce résultat est comparable à celui rapporté par Touati et al. (2007) où toutes les souches de *K. pneumoniae* étudiées sont sensibles à cet antibiotique.

La souche de *K. oxytoca* et la souche de *C. freundii* présentent le même profil de résistance aux -lactamines.

#### IV. Détermination des phénotypes de résistance aux -lactamines

##### IV.1. Production de BLSEs

Toutes les souches étudiées ont donné un résultat négatif avec le test de synergie sur gélose MH à l'exception d'une souche de *K. pneumoniae* (SR 51A) indiquant la production d'une BLSE.



**Figure N°4:** Résultats de test de synergie sur gélose MH

On note que toutes les souches testées ayant une synergie négative présentent une résistance à la céfoxitine (FOX) qui suggère que la résistance aux C3G et à l'aztréonam (ATM) est due probablement à une hyperproduction de céphalosporinases naturelles chez *A. baumannii* et *C. freundii* et acquises chez *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* ou bien à une association céphalosporinases plus BLSE.

Selon Poirel et Nordman, (2006) *A. baumannii* possède des mécanismes de résistances naturelles aux  $\beta$ -lactamines, correspondant principalement à la production d'une céphalosporinase (ou  $\beta$ -lactamase de type AmpC) chromosomique. Ce mécanisme de résistance enzymatique peut être hyperproduit, il s'agit dans ce cas de la conséquence de l'insertion en amont du gène codant cette AmpC naturelle d'une séquence d'insertion appelée ISAbal1 qui apporte des séquences promotrices fortes.

Selon Thabaut et *al.* (1995) l'évolution de la sensibilité aux  $\beta$ -lactamines chez les entérobactéries a été liée à l'émergence et à la diffusion de certains mécanismes de résistance, comme la production de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu chez les *Klebsiella*, l'hyperproduction

stable de céphalosporinase chez les espèces naturellement productrices de céphalosporinase inductible.

La situation épidémiologique est marquée par la diffusion rapide de souches d'entérobactéries productrice de BLSE de type CTX-M depuis le début des années 2000. Les années précédentes, d'autres BLSE de type TEM et SHV préférentiellement portées par *K. pneumoniae* et *Enterobacter spp.* diffusaient de manière épidémique au sein des structures hospitalières (Lucet et Birgand, 2011).

Ce n'est que vers 1988, que sont apparues aux États-Unis et en Europe, les premières souches cliniques de *Klebsiella* (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*) montrant un phénotype de résistance de type céphalosporinase alors qu'elles n'en produisent pas naturellement. La découverte de " céphalosporinases plasmidiques " originaires d'entérobactéries, productrices naturelles, indiquait une nouvelle et importante étape de l'évolution de la résistance acquise aux antibiotiques (C3G en particulier) par mobilisation de gènes chromosomiques (Philippon et Arlet, 2006).

### IV.2. Production de carbapénèmases

Le test de Hodge a permis la mise en évidence de l'enzyme à activité carbapénémase. Les 28 souches d'*A. baumannii* testées sont révélées positives interprétant la production probable d'une carbapénémase (Figure N°5), selon Poirel et Nordman, (2006) le mécanisme de résistance aux carbapénèmes qui semble le plus répandu correspond à l'acquisition de - lactamases à propriétés de carbapénémase ce qui est en accord avec les résultats que nous avons obtenus.

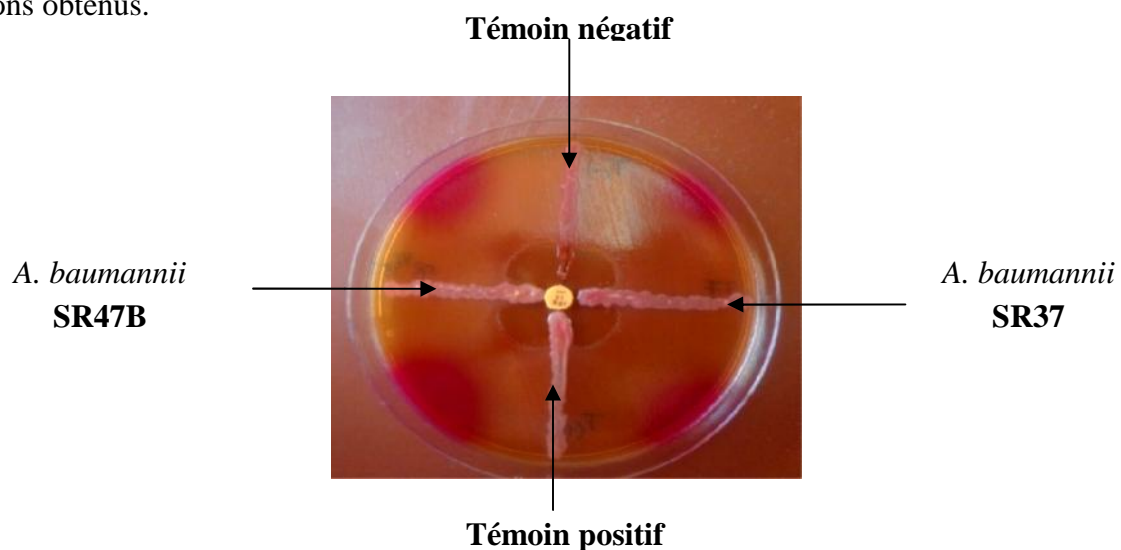


Figure N°5 : Test de Hodge positif pour *A. baumannii*



### IV.3. Production de Métallo-β-lactamases (MβLs)

Le test à l'EDTA a permis de mettre en évidence 23 souches d'*A. baumannii* productrices de MβL et 5 souches n'ont pas montré un accroissement de la zone autour du disque contenant l'IPM + EDTA, et aucune image de synergie n'a été observée indiquant probablement l'absence de production d'une MβL (Figure N°6).



**Figure N°6** : Résultats du test à l'EDTA

### V. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et détection des oxacillinases

Les concentrations minimales inhibitrices de l'imipénème et l'imipénème en présence d'inhibiteur d'oxacillinases (NaCl) des 28 souches d'*A. baumannii* ont été déterminées. Les résultats sont présentés dans le tableau N° X.

**Tableau N°X** : Résultats des CMI vis-à-vis de l'imipénème des souches d'*A. baumannii*.

Code	CMI (µg/ml)		Code	CMI (µg/ml)	
	IMP	IMP + NaCl 200 mM		IMP	IMP + NaCl 200 mM
SR02	128	128	SR34	64	64
SR03	>128	>128	SR35A	64	64
SR04	64	<8	SR37	64	32
SR06	>128	128	SR38	64	32
SR07	>128	128	SR39	>128	128
SR08	32	<8	SR47B	64	32
SR09	128	64	SR48	>128	>128
SR15	128	128	SR49C	>128	128
SR18	128	128	SR50	64	64
SR20	>128	128	SR51B	64	32

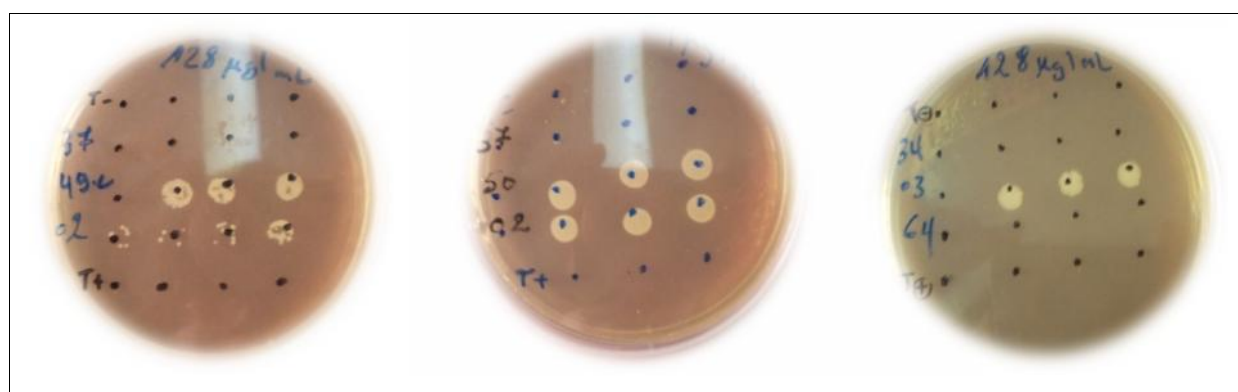
## Résultats et discussion

SR22	128	128	SR59	128	128
SR23	>128	128	SR64	64	32
SR24	>128	<8	SR65	64	<8
SR26	128	32	SR84	>128	128

Les résultats des CMI obtenus vis-à-vis de l'imipénème sur gélose MH seule sont élevés allant de 64µg/ml à >128 chez 27 souches et seulement une souche présente une CMI de 32µg/ml.

Sur la gélose MH additionnée de NaCl (200mM) on remarque une diminution des CMI vers la sensibilité chez les souches SR04, SR08, SR24, SR65, et de moitié chez les souches SR09, SR37, SR38, SR47B, SR51B, SR64, et d'un facteur de 4 pour la souche SR26 indiquant ainsi l'inhibition par le NaCl des oxacillinases conférant la résistance à ces souches. Les CMI des autres souches (SR02, SR03, SR06, SR07, SR15, SR18, SR20, SR22, SR23, SR34, SR35A, SR39, SR48, SR49C, SR50, SR59, SR84) restent élevées suggérant que la résistance est due au M L.

*A. baumannii* possède naturellement des  $\beta$ -lactamases de classe D ou oxacillinases : OXA-51 et OXA-69 qui a une action sur quelques  $\beta$ -lactamines y compris l'imipénème et le méropénème dans une moindre mesure (Mansour et al., 2008). Cela peut expliquer la diminution légère des CMI pour quelques souches. La figure N°7 : montre les CMI de quelques souches testées.



**Figure N°7 :** les CMI de l'imipénème de quelques souches testées

Les phénotypes probables de résistance à l'imipénème de souches d'*A. baumannii* sont donnés dans le tableau suivant.

**Tableau N°XI:** Phénotypes probables de résistance à l'imipénème des souches d'*A. baumannii*

Code	Hodge test	Test à l'EDTA	Test à NaCl	Phénotypes probables	Code	Hodge test	Test à l'EDTA	Test à NaCl	Phénotypes probables
SR02	+	+	-	M L	SR34	+	+	-	M L
SR03	+	+	-	M L	SR35A	+	+	-	M L
SR04	+	+	+	M L+OXA	SR37	+	-	+	OXA
SR06	+	+	+	M L+OXA	SR38	+	-	+	OXA
SR07	+	+	+	M L+OXA	SR39	+	+	+	M L+OXA
SR08	+	-	+	OXA	SR48	+	+	-	M L
SR09	+	+	+	M L+OXA	SR65	+	+	+	M L+OXA
SR15	+	+	-	M L	SR50	+	+	-	M L
SR18	+	+	-	M L	SR84	+	+	+	M L+OXA
SR20	+	+	+	M L+OXA	SR59	+	+	-	M L
SR22	+	+	-	M L	SR47B	+	-	+	OXA
SR23	+	+	+	M L+OXA	SR51B	+	-	+	OXA
SR24	+	+	+	M L+OXA	SR49C	+	+	+	M L+OXA
SR26	+	+	+	M L+OXA	SR64	+	+	+	M L+OXA

**OXA** : Oxacillinase    **M L** : Métallo-β-lactamase

Ce tableau montre que 13 souches d'*A. baumannii* sont résistantes à l'imipénème par la production de carbapénèmases de type M L associée à oxacillinases, 10 souches sont résistantes par production de M L, et 5 souches sont résistantes par oxacillinases.

La résistance à l'IPM par production de MBL a été décrite la première fois au Japon en 1991 (Ait el kadi et al., 2006). La première β-lactamase de classe D découverte chez une souche d'*A. baumannii* est OXA-23 ; depuis, d'autres oxacillinases à activité carbapénémase ont été caractérisées (Mansour, 2008).

Cette étude qui a porté sur un nombre important de souches résistantes aux antibiotiques montre que l'environnement hospitalier constitue un réservoir de souches BGN multirésistantes aux antibiotiques notamment *A. baumannii* et *K. pneumoniae*, et peut jouer un rôle dans la transmission de ces souches entre les patients. Cette voie a une importance plus grande en réanimation que dans d'autres secteurs, du fait de la densité des soins et de la fréquence des procédures, augmentant le risque d'exposition des malades à une transmission de bactéries multirésistantes (transmission croisée) (Brun-Buisson et *al.*, 2005).

La caractéristique importante des infections nosocomiales en réanimation est d'être souvent due à des bactéries plus ou moins résistantes aux antibiotiques, voire multirésistantes (BMR). Cela est lié à la grande fréquence de prescription d'antibiotiques dans cette population, pour traiter des infections communautaires ou hospitalières motivant le transfert en réanimation (Brun-Buisson et *al.*, 2005). Ces bactéries servent aussi comme un réservoir de plasmides de résistance aux antibiotiques qui sont transmises horizontalement entre les souches et les espèces de bactéries (Webb et *al.*, 2005).

Les deux déterminants de l'émergence et de la diffusion de la résistance bactérienne aux antibiotiques sont l'exposition de la population aux antibiotiques et la transmission interindividuelle et environnementale des souches résistantes. Il convient donc d'agir sur ces 2 aspects : bon usage des antibiotiques et lutte contre les transmissions croisées (Lozniewski et *al.*, 2010).

### Conclusion

Au cours de cette étude qui s'est déroulée au niveau du service de réanimation du CHU de Sétif, les résultats que nous avons obtenus montrent que l'environnement hospitalier (matériel médical, personnel, air) peut constituer un réservoir potentiel de BGN multirésistants aux antibiotiques.

Sur les 105 prélèvements effectués au niveau des surfaces et de l'air, 43 souches de bacilles à Gram négatif ont été isolées et identifiées, dont 13 souches appartenant aux entérobactéries (11 *K. pneumoniae*, une *K. oxytoca* et une *C. freundii*) et 30 souches d'*A. baumannii*.

L'étude de la sensibilité de ces souches aux  $\beta$ -lactamines a révélé que toutes les souches étudiées sont résistantes aux céfotaxime, ceftazidime, l'aztréonam et l'amoxicilline-acide clavulanique. Presque la totalité des souches d'*A. baumannii* et de *K. pneumoniae* sont résistantes à l'imipénème (28/30) et à la céfoxitine (10/11) respectivement.

En plus de la résistance aux  $\beta$ -lactamines, les souches d'*A. baumannii* présentent des taux très importants de résistances aux autres familles d'antibiotiques, sont résistantes à l'acide nalidixique (100%), à la rifampicine et au chloramphénicol (93,93%) et reste sensible à la tétracycline. Le nombre de souches d'entérobactéries résistantes aux autres antibiotiques est de 11 pour la rifampicine, 6 pour la tétracycline, 5 pour l'acide nalidixique, 4 pour le chloramphénicol.

La recherche des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines a permis de détecter la production d'une  $\beta$ -lactamase à spectre étendu chez une souche de *K. pneumoniae* ainsi que l'acquisition probable d'une AmpC plasmidique chez ces dernières. Les souches d'*A. baumannii* sont résistantes à l'imipénème par production de M L (10 souches), par production d'oxacillinases (chez 5 souches) et par l'association de ces deux enzymes chez 13 souches.

Les CMI des souches d'*A. baumannii* obtenues vis-à-vis de l'imipénème sont élevées, allant de 64 $\mu$ g/ml à >128 chez 27 souches et seulement une souche présente une CMI de 32 $\mu$ g/ml.

Les efforts déployés pour lutter contre l'infection nosocomiale à BMR doivent être maintenus voire soutenus dans nos hôpitaux, en particulier dans les services de réanimation.

La maîtrise de la prescription des antibiotiques, l'application des règles élémentaires d'hygiène hospitalière, le dépistage des patients porteurs de bactéries multi résistantes ainsi que le recours aux précautions standard d'isolement technique et géographique sont autant de stratégies à mettre en œuvre pour limiter la dissémination de ces souches (Arsalane et *al.*, 2010). Nos résultats montrent que les surfaces et l'air peuvent servir de réservoir de microorganismes multirésistants dont l'identification peut être utile pour la prévention de la transmission d'agents pathogènes nosocomiaux.

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

- La détermination de l'évolution de la contamination des surfaces et de l'air 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 germes ;
- L'étude moléculaire pour déterminer les mécanismes impliqués dans la résistance aux antibiotiques.

## Références bibliographiques

### A

**Ait el kadi M., Aghrouch M., Seffar M., El harti J., Bouklouze A., Cherrah Y., Souly K et Zouhdi M. (2006).** Prévalence des souches d'*Acinetobacter baumannii* et de *Pseudomonas aeruginosa* résistantes à l'imipénème par production de métallo- $\beta$ -lactamases. *Médecine et maladies infectieuses* 36 386–389.

**Arsalane L., Qamouss Y., Chafik A., Boughalem M. et Louzi L. (2010).** Epidémiologie des bactéries multi résistantes dans un service de réanimation polyvalente d'un hôpital universitaire de Marrakech entre octobre 2006 et septembre 2009. LES TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE, Volume 5, N°21.

**Aruna K. et Mobashshera T. (2012).** Prevalence of extended spectrum beta-lactamase production among uropathogene in south Mumbai and its antibiogram pattern. *EXCLI Journal* ; 11:363-372.

**Aygün G., Demirkirany O., Utkuy T., Metez B., ürkmmez S., Yilmaz M., Yasar H., Dikmen Y. and Öztürk R. (2002).** Environmental contamination during a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in an intensive care unit. *Journal of Hospital Infection* 52: 259±262.

### B

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

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

**Boyer A., Clouzeau B., Mzali F., Hilbert G. et Gruson D. (2011).** Les nouvelles résistances aux antibiotiques. JARCA P3.

**Brun-Buisson C., Bonmarchand G., Carlet J., Chastre J., Durocher A., Fagon J.-Y., Loirat P., Jars-Guinestre M.-C., Regnier B., Souweine B., Martin C., Gauzit R.,**

**Lepape A., Malledant Y., Payen D., Pettecher T. et Weber B. (2005).** Risques et maîtrise des infections nosocomiales en réanimation : texte d'orientation SRLF/SFAR. *Réanimation* 14 463–471.

**Bush K., and George A. Jacoby (2010).** Updated functional Classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* Rev. 54 : 969-976.

### C

**CA-SFM. (2010).** Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

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

**Cavallo J.-D., Fabre R., Jehl F., Rapp C., Garrabé E., (2004).** Bêtalactamines. EMC-Maladies Infectieuses 1 : 129–202

**Chaplain C., (1997).** Conduite à tenir devant une bactérie multirésistance p564.

**Cuzon G., Naas T. et Nordman p., (2010)** carbapénémases de type KPC : quel enjeu en microbiologie clinique. *Pathologie Biologie*; 58: 39–45.

### G

**Georgopapadakou N.H. (2008).** Antibiotic Resistance in Enterobacteria. In : Bacterial resistance to Antimicrobials. Ed. Taylor & Francis Group. New York. 343-362.

**Giannouli M., Di PA., Durante-Mangoni E., Bernardo M., Cuccurullo S., Amato G., et al. (2012).** Molecular epidemiology and mechanisms of rifampicin resistance in *Acinetobacter baumannii* isolates from Italy. *Int J Antimicrob Agents*; 39(1):58–63.

**Girou E. et Fagon J. Y. (1988).** Service de réanimation : impact sur la prévention des infections nosocomiales. In : infections nosocomiales et environnement hospitalier. Ed. Flammarion. Paris. 72-80.



**H**

**Hamza R., Kammoun H et Dhouadi M. (2008).** Hygiène hospitalière et lutte contre les infections associées aux soins.

**Hélène B (2010).** Rôle de l'environnement dans les infections nosocomiales.

**Hogde W., Ciak J. et Tramont EC. (1978).** Simple method for detection of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of clinical microbiology*. 7: 102- 103.

**J**

**Jarlier V.,Nicolat M.H., Fournier G. and Philipon A. (1988).** Extended-broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to new  $\beta$ -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Review infection diseases*. 10: 867-878.

**Jeong S.H., Bae I.K., Park K.O., An Y.J., Sohs S.G., Jong S.J., Sung K.H., Yang K.S., Lee K., Young D. and Lee S.H. (2006).** Outbreaks of Imipenem Resistance *A. baumannii* producing carbapenemases in Korea. *The journal of Microbiology*. 44 (4): 423-431.

**K**

**Karamer A., Schwebke I., and Kampf G. (2006).** How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? *BMC Infect Dis*. 6: 130-138.

**L**

**Lahsoune M., Boutayeb H., Zerouali K., Belabbes H. et El Mdaghri N. (2007).**Prévalence et état de sensibilité aux antibiotiques d'*Acinetobacter baumannii* dans un CHU marocain. *Médecine et maladies infectieuses* 37 828–831.

**Le Heurt M., gomila H., Guirot S., et Rafaoni M.J. (1995).** Hygiène. In. Nouveau Cahier de l'Infirmière.Ed. Massion. Paris.5:158p.

**Le Minor C. and Richard C. (1993).** Notes techniques. *In* : Méthodes de laboratoire pour l'identification des entérobactéries. Ed. Institut pasteur. Paris. 217P.

**Lepape A., Savey A., Pinzaru le G., Arich ., Aubas-parer S., Mahul P., Jonguet O., Jambou P., Carton M.J. et Fabry J. (1999).** Surveillance en réseau des infections nosocomiales en réanimation. L'expérience de réa sud est.

**Levent T ., Gauthier M., Dezorzi S., Paradis P., Alibert J., Bettoni C., Stock B.(2005).** L'hygiène hospitalière et le conseil en antibiothérapie : un duo opérationnel face au problème de la diffusion des bactéries multirésistantes aux antibiotiques. P 443–449.

**Levent T., Lambiotte F., Ourtau J., (2011).** Prévention des risques infectieux en réanimation. Gestion d'une épidémie d'ABRI: rôle de l'environnement?

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

**Looveren Van M. et Goossens H., 2004.** Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp in Europ. *Clinical Microbiology and Infection.* 10(8): 684-704.

**Lozniewski A., Rabaud C. et Nancy. (2010).** Résistance bactérienne aux antibiotiques. Infections associées aux soins. *CCLIN sud-Est.*

**Lucet J.-C, Astagneau P. (1998).** Transmission des infections nosocomiales. Principes et prévention. Ed. Flammarion. Paris. 7-10.

**Lucet J.-C. et Birgand G. (2011).** Les bacilles à Gram négatif multi-résistants : où va-t-on ? *Journal desAnti-infectieux* xxx, xxx—xxx.

## M

**Mansour W., Bouallegue O., Dahmen S., Boujaafar N. (2008).** Caractérisation des mécanismes enzymatiques de résistance aux -lactamines chez des souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées à l'hôpital universitaire Sahloul, Sousse en Tunisie (2005). *Pathologie Biologie* 56 116–120.

**Merah M. (2009).** Prévalence des infections nosocomiales à l'Hôpital Ben Amor Djilani d'El-Oued ; Mémoire de D.E.S. en Microbiologie ; Université Kasdi Merbah – Ouargla. Vol. 1 N°4.

**Metral V. et Brüker G. (1998).** Environnement microbiologique et germes multirésistants. *In : infection nosocomiales et environnement hospitalier.* Ed. Flammarion. Paris. P11-21.

### P

**Philppon A., Arlet G. (2003).** Les nouvelles  $\beta$ -lactamases à l'aube du troisième millénaire. *Revue française des laboratoires.* 352 :41-55.

**Philippon A. et Arlet G (2006).**  $\beta$  lactamase de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel. *Ann biol Clin.* 64 (1) : 37-51.

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

### Q

**Quesnel C. (1998).** Prelevement de surface. *In. Contrôle microbiologiques en hygiène hospitalier.* Conseil pratique. *CCCLIN sud-Ouest.* Version 1.Pp. 2-7

### T

**Talon D. (1999).** The role of the hospital environment in the epidemiology of multiresistant bacteria. *J Hosp Infect.* 43: 13-17.

**Thabaut A., Avril J.-L., Bébéar C., Bergogne-Bérezin E., Boucot I., Chiche D., Cluzel R., Jarlier V., Grosset J., Lemeland J.-F., Meryan M., Montell H., Morel C., Nicolas M.-H., Philippon A., Reverdy M.E. et Sirot J. (1995).** Evolution de la sensibilité des bacilles Gram négatif à la ceftazidime et à trois autres  $\beta$ -lactamines en milieu hospitalier de 1989 à 1993. *Méd Mal Infect ;* 25, Spécial : 6-19.

**Thapa B., Tribuddharat C., Rugdeekha S., Techachaiwiwat W., Srfuengfung S., Dhiraputra C.(2009).** Rifampin resistance in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Siriraj Hospital. Thailand. *Nepal Med Coll J*; 11(4):232–7.

**Touati A., Brasme L., Benallaoua S., Madoux J., Gharout A. and De Champs C. (2007).** *Entrobacter cloacae* and *Kleibseilla pneumoniae* isolat producing CTX-M-15 recovred from hospital environnemetal surfaces from Algéria. *J Hosp Infect.* 183-185.

## W

**Webb G. F., D’Agata E. M. C., Magal P. and Ruan S. (2005).** A model of antibiotic-resistant bacterial epidemics in hospitals. *Proc Natl Acad Sci.* 102 (37) : 13343-13348.

# Annexe

---

## Annexe I : Composition des milieux de culture (pour 1 l d'eau distillée)

(Le Minor et Richard, 1993)

### Gélose Mac Conkey

• Peptone	20,0 g
• Lactose	10,0 g
• Sels biliaires	1,5 g
• Cristal violet	0,001 g
• Rouge neutre	0,05 g
• Chlorure de sodium	5,0 g
• Agar	15,0 g

PH : 7,4

### Mueller-Hinton

• Infusion de viande de bœuf	300,0 ml
• Peptone de caséine	17,5 g
• Amidon	1,5 g
• Agar	17,0 g

PH : 7,4

### Gélose TSI

• Tryptone	14,0 g
• Extrait autolytique de levure	3,0 g
• Extrait de viande	3,0 g
• Glucose	1,0 g
• Lactose	10,0 g
• Saccharose	10,0 g
• Chlorure de sodium	5,0 g
• Thiosulfate de sodium	0,3 g
• Citrate ferrique ammoniacal	0,3 g
• Rouge de phénol	24,0 mg
• Agar	13,5 g

PH : 7,4

### Milieu de Citrate de Simmons

• Citrate de sodium	2g
• Chlorure de sodium	5g
• Sulfate de magnésium	0,2g
• Phosphate monoammoniaque	1g
• Phosphate bipotassique	1g
• Bleu de bromothymol	0,08g
• Agar	15g

PH 7

## Annexe

---

### Gélose de conservation

- Macération de viandes 10g
- Peptone tryptique : 05g
- NaCl ou KCl 05g
- Agar 10g

PH : 7,3

### Bouillon nutritif

- Macération de viande 10g
- Peptone tryptique 05g
- NaCl ou KCl 05

PH 7,2

### Bouillon nitraté

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

PH 7,2

### Milieu Clark-Lubs

- Peptone tryptique de viande 5g
- Phosphate bipotassique 5g
- Glucose 6g

PH 7

# Annexe

---

## Annexe II : Composition des réactifs utilisés

### Rouge de méthyle (RM)

- Rouge de méthyle 0,5 g
- Alcool éthylique à 60% 100 ml

### Réactif de VPI

- - naphthol 06 g
- Alcool à 90% 100 ml

### Réactif de VP II

- NaOH 4N

### Réactif de Griess I (NRI)

- Acide parasulfanilique 08 g
- Acide acétique 5N 01 L

### Réactif de Griess II (NR II)

- - naphtylamine 06 g
- Acide acétique 5N 01 L

### Reactif de kovacs

- Alcool amylique Isoamylique 150 ml
- P.dmethyleaminobenzaldehyde 10 g
- Acide chlohydrique concentré 50 ml

### Réactif de tryptophane désaminase (TDA)

- Soluté de perchlorure de fer  $\text{FeCl}_3$  10 ml
- Eau distillée 20 ml

## Annexe

### Annexe III : Sites de prélèvement au niveau de service de réanimation du CHU de Sétif

(Date de prélèvement : 27 Février 2013)

**Tableau N° I : Sites de prélèvement au niveau du service de réanimation**

Code	Salles	Sites de prélèvement	BN	MC	Code	Salles	Sites de prélèvement	BN	MC
SR01	N° 6	Interrupteur	-	/	SR54	N°3	Chariot	+	+
SR02	N° 6	Poignée de porte	+	+	SR55	N°3	Eosine	-	-
SR03	N° 6	Scope	+	+	SR56	Couloire	Bureau	+	+
SR04	N° 6	Barboteur d'oxygène	+	+	SR57	Couloire	Paillasse N°1	+	-
SR05	N° 6	Seringue électrique	-	/	SR58	Couloire	Téléphone	+	+
SR06	N° 6	Bordeur de lit	+	+	SR59	Couloire	Paillasse N°2	+	+
SR07	N° 6	Respirateur	+	+	SR60	Couloire	Chariot de matériel	+	+
SR08	N° 6	Aspirateur	+	+	SR61	Couloire	Chariot d'appareil	+	-
SR09	N° 6	Tuyauterie d'aspiration	+	+	SR62	Couloire	Robinet d'eau	+	+
SR10	N° 6	Tuyauterie respirateur	+	-	SR63	Couloire	Lavabo	+	-
SR11	N° 6	Ballon de réanima	+	-	SR64	Couloire	Ecoray	+	+
SR12	N° 6	Chariot de malade	+	+	SR65	Couloire	Bordure de fenêtre N°2	+	+
SR13	N°4	Poignée de porte	+	-	SR66	Couloire	Paillasse et lavabo inox	+	-
SR14	N°4	Interrupteur	+	-	SR67	Couloire	Bordure de fenêtre N°1	+	-
SR15	N°4	Bordure de lit	+	+	SR68	Couloire	Plateau du matériel	+	+
SR16	N°4	Barboteur d'oxygène	+	+	SR69	Couloire	Tambour	+	+
SR17	N°4	Respirateur	+	+	SR70	Couloire	Placard	+	-
SR18	N°4	Scope	+	+	SR71	Couloire	Poignée d'armoire	+	+
SR19	N°4	Aspirateur	+	+	SR72	Couloire	Distributeur de savon anios	+	-
SR20	N°4	Chariot	+	+	SR73	Couloire	Télévision	+	-
SR21	N°4	Radiateur	+	-	SR74	Couloire	Appareils pour filtrer l'air	+	-
SR22	N°4	Drap de malade	+	+	SR75	Couloire	Drap et bordure de lit vide	+	+
SR23	N°4	Sonde urinaire	+	+	SR76	N°5	Bordure de lit	+	-
SR24	N°2	Poignée de porte	+	+	SR77	N°5	Drap du lit	+	-
SR25	N°2	Interrupteur	+	-	SR78	N°5	Bocal d'aspiration	+	-
SR26	N°2	Respirateur	+	+	SR79	N°5	Poignée de porte	+	+
SR27	N°2	Scope	+	-	SR80	N°5	Interrupteur	+	-
SR28	N°2	Aspirateur	+	-	SR81	Personnel	Mains	+	-
SR29	N°2	Tuyauterie d'aspiration	+	+	SR82	Personnel	Blouses	+	+
SR30	N°2	Drap de malade	+	+	SR83	Personnel	Mains	+	-
SR31	N°2	Bordure de lit	+	-	SR84	Personnel	Blouses	+	+
SR32	N°2	Sonde urinaire	+	+	SR85	Personnel	Mains	+	+
SR33	N°2	Tuyauterie respirateur	+	-	SR86	Personnel	Blouses	+	+
SR34	N°2	Chariot	+	+	SR87	Personnel	Mains	+	-
SR35	N°2	Seringue électrique	+	+	SR88	Personnel	Blouses	+	+
SR36	N°1	Poignée de porte	+	-	SR89	Personnel	Mains	+	-
SR37	N°1	Interrupteur	+	+	SR90	Personnel	Blouses	+	-
SR38	N°1	Chariot	+	+	SR91	Personnel	Mains	+	+
SR39	N°1	Aspirateur	+	+	SR92	Personnel	Blouses	+	+
SR40	N°1	Tuyauterie d'aspiration	+	+	SR93	Personnel	Stéthoscopes	+	+
SR41	N°1	Respirateur	+	+	SR94	Personnel	Mains	+	+
SR42	N°1	Barboteur d'oxygène	+	-	SR95	Personnel	Blouses	+	-
SR43	N°1	Ballon de réanima	+	-	SR96	Personnel	Mains	+	-
SR44	N°1	Radiateur	+	-	SR97	Personnel	Blouses	+	+
SR45	N°3	Poignée de porte	+	+	A	Air	Chambre de malade N°6	/	+



## Annexe

---

SR46	N°3	Interrupteur	+	+	B	Air	Chambre de malade N°6	/	+
SR47	N°3	Drap	+	+	C	Air	Chambre de malade N°4	/	+
SR48	N°3	Scope	+	+	D	Air	Chambre de malade N°4	/	+
SR49	N°3	Sonde urinaire.	+	+	E	Air	Chambre de malade N°2	/	+
SR50	N°3	Bordure de lit	+	+	F	Air	Chambre de malade N°2	/	+
SR51	N°3	Seringue électrique	+	+	J	Air	Couloire	/	+
SR52	N°3	Respirateur	+	+	H	Air	Couloire	/	+
SR53	N°3	Aspirateur	+	+					

**MC** : Mac Conkey      **BN** : Bouillon nutritif

## Annexe

### Annexe N°IV : Sensibilité aux antibiotiques

**Tableau N° II:** Diamètres des zones d'inhibitions des antibiotiques testés (mm).

Code	Souche	FOX	CTX	AMC	CAZ	ATM	IMP	NA	AK	GM	RIF	TE	TOB	C
SR02	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	10	0	24	11	13	20	15	0
SR03	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	8	0	24	13	11	25	21	0
SR04	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	11	0	24	13	14	26	16	0
SR06	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	11	0	22	10	15	22	15	0
SR07	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	15	0	15	13	0	26	15	0
SR08	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	16	0	15	15	13	18	17	0
SR09	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	12	0	24	13	12	22	16	0
SR12	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	38	0	14	20	15	14	27	10
SR15	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	11	0	15	13	13	20	15	0
SR18	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	12	0	15	12	12	21	16	0
SR20	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	11	0	15	12	12	22	18	0
SR22	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	20	0	16	16	15	29	19	0
SR23	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	0	0	15	13	18	30	13	0
SR24	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	9	13	14	12	15	23	15	0
SR26	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	19	0	20	14	12	30	23	10
SR34	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	16	0	16	29	13	27	29	0
SR35A	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	10	0	14	13	12	26	16	0
SR37	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	17	0	28	16	20	27	20	0
SR38	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	15	0	15	14	15	28	17	0
SR39	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	0	0	23	13	14	32	21	0
SRE1	<i>A. baumannii</i>	10	0	0	0	0	38	0	34	32	38	30	34	26
SR48	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	11	0	14	8	13	30	18	0
SR65	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	13	0	32	24	10	25	26	30
SR50	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	12	0	25	11	12	26	17	8
SR84	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	10	0	27	15	15	19	20	12
SR59	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	8	0	23	10	11	24	15	8
SR47B	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	8	0	20	15	14	30	22	10
SR51B	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	12	0	16	12	11	24	17	0
SR49C	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	0	0	27	12	11	23	28	0
SR64	<i>A. baumannii</i>	0	0	0	0	0	15	0	18	14	13	38	20	0
SR19	<i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	0	14	31	20	23	12	0	10	20	30
SR29	<i>K. pneumoniae</i>	16	0	0	0	0	30	25	0	0	10	9	0	30
SR30	<i>K. pneumoniae</i>	0	14	17	0	0	37	21	0	0	10	0	0	30
SR35B	<i>K. pneumoniae</i>	18	0	0	0	0	30	24	0	0	8	10	0	30
SR40	<i>K. pneumoniae</i>	15	0	0	0	9	32	22	27	14	13	27	20	30
SR62	<i>K. oxytoca</i>	12	15	0	12	10	30	25	32	28	8	25	30	33
SR88	<i>C. freundii</i>	0	12	0	20	10	27	28	30	13	25	14	22	0
SR32	<i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	36	0	16	9	10	25	15	0
SR16	<i>K.pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	28	0	15	10	14	24	16	10
SR17	<i>K.pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	28	0	20	15	15	26	20	12
SR49A	<i>K. pneumoniae</i>	0	8	0	8	0	32	11	32	26	32	20	30	30
SR93	<i>K. pneumoniae</i>	20	0	0	8	0	30	25	20	9	10	20	13	30
SR51A	<i>K. pneumoniae</i>	22	12	36	12	22	28	12	26	10	0	0	17	28



## Annexe

Galerie API20E :



*K. pneumoniae* (SR16)



*K. oxytoca* (SR62)



*C. freundii* (SR88)

**Figure N°1** : Exemple de résultat d'identification par la galerie API20E

# **Introduction**

# **Matériel et méthodes**

# **Résultats et discussion**

# **Conclusion**



# **Références bibliographiques**

# **Annexes**

# **Synthèses bibliographiques**

## Résumé

**Objectif :** Caractérisation de la résistance aux  $\beta$ -lactamines des souches de bacilles à Gram négatif isolées de l'environnement hospitalier au niveau du service de réanimation du CHU de la willaya de Sétif.

**Méthode :** 105 prélèvements ont été effectués à partir de l'air et des surfaces (inertes et vivantes). L'isolement a été effectué sur gélose Mac Conkey additionnée de ceftazidime (4  $\mu$ g/ml). Les souches isolées ont fait l'objet d'une identification et d'une caractérisation de la sensibilité vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines et d'autres familles d'antibiotiques. Les phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines ont été étudiés.

**Résultats :** Au totale 43 souches de bacilles à Gram négatif ont été identifiées dont 30 souches sont des *Acinetobacter baumannii* et 13 souches d'entérobactéries incluant 11 souches de *Klebsiella pneumoniae*, une souche de *Klebsiella oxytoca* et une souche de *Citrobacter freundii*. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques de ces souches a révélé que toutes les souches sont résistantes aux céfotaxime, ceftazidime, l'aztréonam et l'amoxicilline-acide clavulanique, 42 souches résistantes à la céfoxitine et 28 souches d'*Acinetobacter baumannii* sont résistantes à l'imipénème.

Une souche de *Klebsiella pneumoniae* a été révélé productrice d'une  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE), les souches d'*Acinetobacter baumannii* sont résistantes à l'imipénème par la production des carbapénèmases de type Métallo- $\beta$ -lactamases, oxacillinases ou l'association de ces deux types enzymes.

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

## Abstract

**Objective:** Characterization of  $\beta$ -lactams resistance strains of Gram negative bacilli isolated from hospital environment at the ICU of the University Hospital of Sétif.

**Method:** 105 samples were taken from the air and surfaces (inert and live). The isolation was performed on Mac Conkey agar supplemented with ceftazidime (4 mg / ml). The strains isolated were subjected to identification and characterization of the sensitivity to a  $\beta$ -lactams and other antibiotics. The phenotypes of resistance to  $\beta$ -lactams antibiotics have been studied.

**Results:** In total 43 strains of Gram-negative bacilli were identified, including 30 strains of *Acinetobacter baumannii* and 13 strains of Enterobacteriaceae, including 11 strains of *Klebsiella pneumoniae*, a strain of *Klebsiella oxytoca* and strain of *Citrobacter freundii*. The study of the antibiotic susceptibility of these strains showed that all strains were resistant to cefotaxime, ceftazidime, aztreonam, and amoxicillin-clavulanic acid, 42 strains resistant to cefoxitin and 28 strains of *Acinetobacter baumannii* are resistant to imipenem.

One strain of *Klebsiella pneumoniae* was revealed producing of extended spectrum  $\beta$ -lactamases. *Acinetobacter baumannii* strains are resistant to imipenem by carbapenemases production of metallo- $\beta$ -lactamases type oxacillinases or association these two types of enzymes.

**Keywords:** Hospital environment, Gram-negative bacilli, resistance, ESBL, carbapenemase

