

*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 Appliquée au génie biologique

Thème

**Caractérisation des phénotypes de résistance
aux β -lactamines de souches de bacilles à
Gram négatif isolées des surfaces de
l'environnement hospitalier**

Présenté par :

M^{lle} YAICI Lydia

M^{lle} ZEKAR Ferielle née MESBAH

Devant le jury composé de :

M^{me} BEJOU F.

Présidente

M^{me} MESSAOUDI K.

Examineur

M^r BENDJEDOU K.

Examineur

M^r TOUATI A.

Promoteur

M^{me} BELHADI K.

Co-promoteur

2011 - 2012

REMERCIEMENTS

Au Dr TOUATI A., nous vous sommes reconnaissantes pour avoir accepté de diriger ce travail. Vos conseils, vos encouragements nous ont permis de surmonter les difficultés rencontrées au cours de la réalisation de ce travail.

Madame BELHADI K., nous tenons à vous exprimer notre reconnaissance pour vos conseils apportés tout au long de ce parcours.

Au Pr NOUASRIA qui nous a accueillis dans son centre et pour tous ces conseils et aide précieuse.

Messieurs les membres du jury, recevez nos plus vifs remerciements pour avoir accepté de juger ce travail.

Toute l'équipe de M^r TOUATI pour leur disponibilité et leurs conseils qui ont été d'un apport scientifique indéniable dans la réalisation de ce travail.

DEDICACE

A mes parents, pour leur tendresse qui m'ont permis de braver les vicissitudes inhérentes à la vie et pour tous les sacrifices consentis à mon égard ;

A mon époux pour son affection, les sacrifices consentis et pour son soutien sans faille ;

A mes sœurs Massila et Celina et à ma fille Danyah, que ce travail soit pour vous un exemple à suivre ;

A mes amis pour leur soutien, leur aide et pour l'ambiance studieuse, fraternelle et sympathique qui a toujours règne entre nous.

Ferielle

DEDICACE

A mes chers parents pour toute leur affection, les sacrifices consentis à mon égard, leur soutien et leurs encouragements, qui m'ont permis d'aller de l'avant et de toujours donner le meilleur de moi-même.

A mes sœurs Sara, Mounia, Lisa et mon adorable petit frère Reda pour leurs présence à mes côtés.

A toute ma famille, mes grands parents en particulier.

A Abdelghani qui m'a soutenu tout au long de ce travail, je ne saurais jamais lui exprimer mes sincères et profondes reconnaissances pour son aide.

A Fatima, une amie très spéciale, qui m'a énormément fait rire, soutenu dès le début et m'a aidé dans les périodes de doute.

Lydia

Liste des tableaux

Tableau N°I : Exemple de réservoirs environnementaux et le degré d'implication dans les infections nosocomiales.

Tableau N° II : Relation entre la classification moléculaire d'Amblar et fonctionnelle de Bush et Jacoby.

Tableau N°III : Sites de prélèvements au niveau du service infectieux.

Tableau N°IV : Sites de prélèvements au niveau du service pneumo-phtisiologie.

Tableau N°V : Antibiotiques testés

Tableau N°VI : Préparation de la gamme d'antibiotiques.

Tableau N°VII : Nombre de prélèvement et de souches isolés au niveau du service infectieux et pneumo-phtisiologie.

Tableau N°VIII : Différents sites de prélèvement.

Tableau N°IX : Sensibilité des souches aux antibiotiques (Diamètres en mm).

Tableau N°X : Sensibilité des souches aux antibiotiques (Interprétation en catégories cliniques selon le CA-SFM).

Tableau N°XI : Phénotypes de résistance aux Aminosides.

Tableau N°XII : Indice de multi-résistance des souches étudiées.

Tableau N°XIII : Phénotypes de résistance aux β -lactamines.

Tableau N°XIV : Concentrations minimales inhibitrices des entérobactéries BLSE.

Tableau N°XV: Concentrations minimales inhibitrices des *Acinetobacter baumannii*.

Tableau N°XVI : Résultat des tests biochimiques d'identification (service pneumo-phtisiologie) (Annexe 3).

Tableau N°XVII : Résultat des tests biochimiques d'identification (service infectieux) (Annexe 3).

Tableau N°XVIII : Résultats de la galerie API20E (Annexe 3).

Liste des figures

Figure 1 : Disposition des disques d'antibiotiques pour le DD-test.

Figure 2 : Hodge test

Figure 3: Taux de résistance des souches aux β -lactamines.

Figure 4 : Taux de résistance des souches aux aminosides.

Figure 5 : Taux de résistance des souches aux autres antibiotiques.

Figure 6 : Hyperproduction de céphalosporinase sur Muller Hinton plus cloxacilline.

Figure 7 : Résultats du test de Hodge sur Mac Conkey.

Figure 8: Détermination des concentrations minimales inhibitrices.

Figure 9 : Galerie API20E correspondant à *Enterobactercloacae*.

Figure 10 : Lecture et interprétation des résultats de galerie API20E.

Liste des abréviations

AC: acide clavulanique

AMK: Amikacine

AMC: Amoxicilline-clavulanate

ATM: Aztréonam

BGN: Bacilles à Gram négatif

BMR: bactéries multirésistantes

BEL-1: Belgium extended-spectrum β -lactamase

BES-1: Brazilian extended-spectrum β -lactamase

BLSE: β -lactamases a spectreétendu

C: Chloramphenicol

CAZ: Céftazidime

CCAZ: Céftazidime- clavulanate

CCTX: Céfotaxime-clavulanate

CFEP: Céfépime-clavulanate

CHU: Centre Hospitalier Universitaire

CPO: Céfpirome

Cs: Colistine

CTX: Céfotaxime

CTX-M: Céfotaximase –Munich

EDTA : Ethylène Diamine Tetre-acétiqueAcide

FEP: Céfépime

R : Résistance

RIF: Rifampicine

FOX: Céfoxitine

GES: Guyana Extended-Spectrum Beta-lactamase

GM: Gentamicine

I : Intermédiaire

IβL: Inhibiteurs de β-lactamases

IPM: Imipeneme

Mβ L: Metallo-β-lactamase

MH : Muller Hinton

MRSA : *Staphylococcus aureus* résistant à la meticilline

NI: Non Inclus

OXA: oxacillinases

PER: *Pseudomonas* extended resistance

S: Sensible

SHV: Sulfhydryl variable

SFO-1: *Serratiafonticola*

TCC: Ticarcilline-clavulanate

TEM: Temoneira

TET: Tetracycline

TIC: Ticarcilline

TLA-1: Tlahuicas - tribuindienne

TZB: tazobactam

VEB: Vietnam Extended-spectrum Beta-lactamase

VRE: *Enterococcus* résistant à la vancomycine

SOMMAIRE

Introduction

Synthèse bibliographique

I-Environnement hospitalier

- I-1 Risques infectieux liés à l'environnement hospitalier 3
- I-2 Relation entre la contamination environnementale et l'infection nosocomiale 7

II- Les β -lactamases

- II-1 Définition et classification 10
- II-2 β -lactamases à spectre étendu (BLSE) 12

Matériel et Méthode

- I- Prélèvement 16
- II- Isolement et purification 18
- III- Identification 18
- IV- Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques. 18
- V- Recherche des phénotypes de résistance 20
 - a- DD test sur Muller Hinton 20
 - b- DD test sur Muller Hinton additionné de cloxacilline 20
 - c- Détection des carbapénémases (test de Hodge) 20
 - d- Test à l'EDTA 21
- VI- Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices 22
- VII- Transfert de gène de résistance par conjugaison 23

Résultats et Discussion

- I- Souches bactériennes 24
- II- Sensibilité aux antibiotiques 26
- III- Détermination des phénotypes de résistance 31
- IV- Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices 33
- V- Transfert de gènes de résistance par conjugaison 34

Conclusion 36

Références bibliographiques

Annexes

INTRODUCTION

Introduction

Le milieu hospitalier met en contact, des individus sains et de nombreux patients présentant des pathologies variées, infectieuses ou non. Chacun, en se déplaçant dans les locaux et en déplaçant du matériel, disperse des germes qui peuvent notamment se retrouver nombreux sur les surfaces, matériel médical et dans l'air faisant de l'environnement hospitalier une véritable « niche écologique » de germes. Ceux-ci évoluent selon leurs capacités intrinsèques de résistances, et selon les désinfectants et antiseptiques utilisés pour le nettoyage et les soins (Lemmen et *al.*, 2004).

Chaque patient hospitalisé arrive avec sa propre flore bactérienne. Mais une fois en contact avec l'environnement hospitalier (le lit, la table de nuit, le personnel...) et les différents traitements, celle-ci va se modifier, et va à son tour subir la pression de sélection. Par conséquent, les germes résistants de l'environnement vont se développer aux dépens de ceux peu résistants de la flore d'origine. Les germes hospitaliers sont de ce fait souvent capables de survivre dans un milieu hostile et de développer de multiples résistances aux antibiotiques les plus utilisés. Les bactéries résistantes rencontrées en milieu hospitalier varient considérablement d'un hôpital à un autre et entre les différentes unités au sein du même hôpital (Lemmen et *al.*, 2004).

Les bactéries multi-résistantes à Gram négatif représentent une menace émergente dans différents hôpitaux. Les infections causées par ces bactéries sont associées aux taux élevés de mortalité, les coûts accrus de soins et l'utilisation massive des antibiotiques inappropriés par rapport à d'autres types de bactéries. L'acquisition des bactéries multi-résistantes à Gram négatif peut être endogène, où l'exposition aux antibiotiques conduit à l'émergence de résistance antimicrobienne chez les bactéries initialement sensibles. Les bactéries multi-résistantes à Gram négatif peuvent également être acquises de manière exogène par la transmission patient à patient (Bhalla et *al.*, 2004).

Plusieurs études menées dans les établissements de soins de longue-durée ont rapporté que les mains du personnel peuvent être des véhicules de bactéries pathogènes à Gram négatif. Les surfaces de l'environnement hospitalier ont révélé une contamination par *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline, *Enterococcus* résistant à la vancomycine et par les bactéries pathogènes à Gram négatif. Les établissements de soins de longue-durée diffèrent des établissements de soins actifs, cela est dû aux occasions de contact fréquentes entre les résidents par le biais des activités de groupe telles que le manger et les pièces communes. Le potentiel de contamination de l'environnement dans les espaces

communs des établissements de soins de long-terme n'a pas été exploré, la contamination peut prévoir un risque par la transmission parmi les résidents de cet établissement (Anaissie et *al.*, 2002).

Le taux élevé des BMR et leur évolution sans cesse croissante dénotent de l'insuffisance et du dysfonctionnement de l'organisation de lutte contre ces pathogènes. Aujourd'hui plus que jamais, la maîtrise de la dissémination des BMR passe par l'éducation des personnels en matière d'hygiène, le respect des procédures de lavage des mains ainsi qu'une politique cohérente d'hygiène notamment dans les services à forte prévalence de BMR. De même, l'usage rationnel des antibiotiques permet de préserver les quelques molécules encore actives qui constituent les ultimes ressources thérapeutiques (Saïdani et *al.*, 2006).

L'objectif de notre étude est l'évaluation de la contamination de l'environnement hospitalier au niveau de deux services de l'hôpital Frantz Fanon par les bactéries multi-résistantes à Gram négatif et la caractérisation des phénotypes de résistances aux β -lactamines de ces souches.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I
ENVIRONNEMENT HOSPITALIER

I.1 Risques infectieux liés à l'environnement hospitalier

L'environnement hospitalier comprend habituellement l'eau, l'air, les surfaces, l'alimentation, le linge, les déchets et les dispositifs médicaux qui entrent en contact avec l'être humain (patients, personnel et visiteurs) dans une structure hospitalière (Barbut et al., 2006).

L'environnement hospitalier est naturellement contaminé par des microorganismes : bactéries, champignons filamenteux, levures, virus et parasites d'origine humaine ou spécifiquement environnementaux qui peuvent appartenir aussi bien aux espèces opportunistes, qu'aux espèces habituellement pathogènes pour l'homme (Cavallo et al., 2002). Le niveau de contamination varie qualitativement et quantitativement au cours du temps et en fonction des services et des patients. La contamination dépend aussi des conditions hygrométriques et de la température. Les microorganismes appartiennent soit à la flore saprophyte (*Bacillus*, *Staphylococcus* à coagulase négative, *Micrococcus*, *Pseudomonas*...) soit à la flore commensale de l'homme (*Staphylococcus aureus*, entérobactéries,...) (Barbut et al., 2006).

Concernant les bactéries, deux types peuvent être retrouvés dans l'environnement des patients:

- Des bactéries d'origine humaine (peau, muqueuses) parmi lesquelles des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques comme *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline, les entérobactéries productrices de β -lactamase à spectre étendu (BLSE) ou les *Enterococcus* résistants à la vancomycine (Lucet et Astagneau, 1998).
- Des bactéries d'origine environnementale dont certaines ont de fréquentes résistances naturelles aux antibiotiques, notamment les bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* ou *Legionella pneumophila* (Lucet et Astagneau, 1998).

Lorsque les patients sont colonisés et surtout lorsqu'il existe une infection patente, leur environnement immédiat est en général fortement contaminé par ces microorganismes. La survie et éventuellement 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 le microorganisme persiste et éventuellement une source à partir de laquelle le micro-organisme va pouvoir être transmis (Anaissi et al., 2002).

Si le rôle de cet environnement a été assez bien démontré lors d'épisodes épidémiques, son rôle dans les infections nosocomiales endémiques est plus souvent discuté (Barbut et al., 2006).

- **Eau**

L'eau contient naturellement des microorganismes qui sont adaptés au milieu hydrique et peuvent se retrouver dans les réseaux d'eau de distribution (Bertrou, 2000).

L'eau chaude sanitaire peut représenter un réservoir de *Legionella* à partir duquel patients les plus fragilisés peuvent se contaminer en inhalant des aérosols de microgouttelettes d'eau (douches, humidificateurs, nébuliseurs) (Stout, 1997). L'eau potable contient également une flore variée (*Aeromonas*, *Pseudomonas*) qui peut proliférer au niveau de bras morts, de brise-jets ou d'embouts de robinets ou dans les circuits mal entretenus de fontaines réfrigérantes (Lalande et al., 2001).

De nombreuses études indiquent que les points d'eau sont une source importante de *Pseudomonas aeruginosa* en service de soins intensifs.

Dans une étude réalisée dans deux services de réanimation adulte du CHU de Besançon, des prélèvements de l'environnement au niveau des points d'eau des chambres et des prélèvements sur les patients étaient réalisés de façon hebdomadaire.

Les auteurs ont rapporté dans cette étude que *P.aeruginosa* est non seulement un pathogène opportuniste mais aussi un commensal opportuniste à transmission directe, manuporté de patient à patient dans les services de réanimation et que l'environnement hydrique joue un rôle indiscutable dans le risque de colonisation hospitalière des patients (Bertrand et al., 2009).

- **Air**

Les microorganismes de l'air sont véhiculés sur des supports de taille variable : les poussières (10-100 μm), les squames cutanées (dans les services de grands brûlés par exemple), les gouttelettes ou les microgouttelettes de salive (particules de 10 à 1 000 μm émises lors de latoux, des éternuements, de la parole...) et les noyaux de condensation issus de ces gouttelettes (les droplets nuclei) (2-5 μm). Les plus grosses particules sédimentent en quelques minutes alors

que les plus petites (droplets nuclei) peuvent rester en suspension plusieurs heures, diffuser à distance et pénétrer par inhalation jusque dans les alvéoles pulmonaires des patients (Bertrou, 2000).

Le rôle de l'air dans la survenue d'infections nosocomiales a surtout été étudié au cours de deux circonstances : dans les épidémies d'aspergilloses invasives survenant chez des patients immunodéprimés (aplasiques, greffés...) à l'occasion de travaux réalisés à proximité (Alberti et al., 2001) et dans les infections du site opératoire.

Le rôle de l'air dans la survenue des infections du site opératoire a essentiellement été étudié dans les interventions de chirurgie orthopédique prothétique. Dans l'étude, ces auteurs ont démontré que le niveau de contamination de la plaie opératoire ainsi que le taux d'infection post-opératoire en chirurgie orthopédique prothétique étaient liés au niveau de contamination de l'air du bloc opératoire (Lidwell et al, 1983). La mise en place dans les blocs opératoires de systèmes de filtration de haut niveau de l'air a permis de diminuer de plus de deux fois le taux d'infections post-opératoires (de 3,4 % à 1,6%), mais à un niveau moindre que l'utilisation d'une antibioprophylaxie (de 3,4% à 0,8%) ou à l'association d'une filtration et d'une antibioprophylaxie (de 3,4% à 0,7%). Ces résultats suggèrent indirectement la responsabilité, au moins partielle, d'une transmission aéroportée à partir de particules mises en suspension, véhiculées par les turbulences d'air et déposées directement ou indirectement dans la plaie lors de l'intervention chirurgicale. Les agents les plus souvent mis en cause dans ces infections sont des bactéries d'origine cutanée ou muqueuse, comme les *staphylocoques* avec au tout premier plan l'espèce *Staphylococcus aureus* (Dolan et al., 2011).

Si l'aérobiocontamination a pu être impliquée comme source d'infections nosocomiales du site opératoire, il n'existe pas d'arguments pour mettre en cause l'environnement inerte du bloc opératoire comme les sols, les murs ou les autres surfaces (Rundstadler et al., 2002).

- **Surfaces**

La surveillance de la contamination bactérienne des surfaces est étroitement liée à celle de l'air. Elle s'établit sur les mêmes zones à risque. En effet, la biocontamination des surfaces se fait par contact, par rinçage ou par sédimentation des particules en suspension dans l'air, la contamination des surfaces a trois origines (Hota, 2004):

- L'air qui véhicule sous forme d'aérosols des amas bactériens capables de sédimenter et de coloniser le milieu.
- Les objets et les mains qui par contact direct colonisent différents supports. C'est le cas par exemple de la contamination des combinés téléphoniques par *Staphylococcus aureus*.
- L'eau qui contamine les surfaces et les dispositifs médicaux par rinçage.

Les surfaces sont contaminées par les microorganismes issus du patient lui-même (infecté ou simplement colonisé) ou par sédimentation de particules présentes dans l'air. Il a été montré par exemple, que l'environnement proche d'un patient porteur de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques (BMR) peut se retrouver à son tour contaminé et servir de réservoir secondaire. La contamination des surfaces dépend, outre de la qualité du nettoyage, de nombreux facteurs liés au microorganisme : sa durée de vie sur un support inerte (qui varie en fonction de la matière, de la température, de la dessiccation), de son adhérence à la surface, de sa capacité à produire un biofilm et de sa capacité à résister aux conditions défavorables. Par exemple, il a été montré que la durée de survie d'*Enterococcus faecalis* est de 30 minutes sur une membrane de stéthoscope alors que celle de certains clones de *S. aureus* résistants à la méticilline peuvent aller jusqu'à plusieurs semaines. *Clostridium difficile* peut persister plusieurs mois sous forme sporulée (Barbut et al., 2006).

Sergent et al. (2012) ont suggéré que la contamination dans le milieu hospitalier est fréquente au cours du bandage des blessures colonisées qui ont montré que plus de 50% des échantillons de surfaces et près de 40% des échantillons aéroportés étaient positifs. Ils confirment également la fréquence de différentes souches de bactéries qui contaminent l'environnement soit 24,7% de contamination à bactéries Gram-positives, en particulier *Staphylococcus aureus* et seulement 4,9% pour les bactéries Gram-négatives (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* et les entérobactéries) tel que rapporté antérieurement par Lemmen et al. (2004).

Buxton et *coll.* ont rapporté que *Acinetobacter spp.* peut survivre plus long temps dans des conditions sèches, alors que d'autres chercheurs ont démontré que *Acinetobacter baumannii* peut survivre pendant 6 jours sur papier filtre sec, 13 jours sur formica, plus de 7 jours sur du verre et plus de 25 jours sur le coton. Toutefois, ces enquêtes ne précisent pas si la capacité de survie est une caractéristique de l'espèce ou diffère d'une souche à l'autre (Weber et *al.*, 2010).

I.2 Relation entre la contamination environnementale et l'infection nosocomiale

La contamination de l'environnement par des micro-organismes fait poser la question de leur responsabilité dans la genèse des infections nosocomiales. Lors d'infections nosocomiales survenant sur un mode épidémique, le microorganisme responsable de l'épidémie peut être retrouvé dans l'environnement. Si ce dernier peut être une source de transmission à l'homme, la preuve formelle de sa responsabilité exclusive dans la genèse de l'infection reste difficile à apporter (Boyce, 2007).

En effet, les épidémies d'infections nosocomiales sont presque toujours associées à une transmission inter-humaine, ou à la contamination de dispositifs médicaux ou d'un liquide normalement stérile. La place de la transmission directe inter-humaine est reconnue comme prépondérante par rapport à la transmission liée à l'environnement (Bhalla *et al.*, 2004).

En dehors des situations épidémiques très particulières (épidémies de légionelloses nosocomiales en relation avec la contamination du réseau d'eau chaude sanitaire par les légionnelles, épidémie d'aspergillose invasive associée à des travaux de démolition ou de rénovation à proximité), le lien de causalité entre contamination environnementale et infection nosocomiale reste souvent très difficile à prouver. En effet, celle-ci peut être la cause ou la conséquence de l'infection. Tout patient infecté ou simplement colonisé peut contaminer son environnement proche. La présence de microorganisme dans l'environnement n'est pas une condition suffisante pour impliquer ce réservoir dans la survenue d'une infection nosocomiale (Barbut et *al.*, 2006).

L'interprétation du résultat devra tenir compte à la fois de la nature du microorganisme, de son inoculum, de sa virulence, de son mode de transmission, de la porte d'entrée (procédure invasive) et de la réceptivité de l'hôte (immunodépression). Weber et *al.* (1997) ont proposé 7

critères permettant d'évaluer le degré d'implication d'un réservoir environnemental dans la survenue d'une infection nosocomiale :

1. le microorganisme doit pouvoir survivre dans l'environnement inerte,
2. le microorganisme doit pouvoir s'y multiplier,
3. le microorganisme doit pouvoir être cultivé à partir de cet environnement,
4. aucune autre voie de transmission ne peut être identifiée,
5. l'exposition à l'environnement contaminé est démontrée par des études prospectives comme étant la seule cause de relation entre l'exposition et l'infection,
6. une association entre l'exposition à la contamination environnementale et l'infection est démontrée par des études cas-témoin,
7. la transmission est interrompue si l'on supprime le réservoir environnemental.

Weber et *al.*(1997) ont classé les réservoirs environnementaux en 4 niveaux d'implication (élevé, modéré, faible, non démontré) dans la survenue d'une infection nosocomiale (tableau N°I). Par exemple, les humidificateurs et les antiseptiques contaminés représentent respectivement un niveau élevé de risque de transmission aérienne de *Legionella* et de transmission par contact de *Pseudomonas*. A l'opposé, le rôle des stéthoscopes contaminés n'a pas été démontré dans la survenue d'une infection nosocomiale.

Tableau N°I : Exemple de réservoirs environnementaux et le degré d'implication dans les infections nosocomiales (Weber et *al.*,1997).

| Dégré d'implication | Reservoir | Microorganismes | Mode de transmission |
|---------------------|-----------------------|---|----------------------|
| Non démontré | Stéthoscope | <i>Staphylococcus</i> | |
| | Sanitaires | Bacilles à Gram négatif | |
| | fleurs | Bacilles à Gram négatif, <i>Aspergillus</i> | |
| Faible | Thermomètre | <i>Clostridium difficile</i> | Contact |
| | Lavabos, brise-jets | <i>Pseudomonas</i> | Contact , projection |
| | Douche | <i>Legionella</i> | Aérienne |
| | Nutrition parentérale | Bacilles à Gram négatif | Ingestion |
| Modéré | Filtre | <i>Aspergillus</i> | Aérienne |
| | Réspirateur | <i>Pseudomonas</i> | Inhalation |
| | Matelas | <i>Pseudomonas</i> <i>Acinetobacter</i> | Contact |
| | Glace alimentaire | <i>Salmonella</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Cryptosporidium</i> | Ingestion, contact |
| | Eau potable | <i>Legionella</i> <i>Pseudomonas</i> Mycobacteries | Contact |
| Élevé | Humidificateur | <i>Legionella</i> <i>Pseudomonas</i> | Aérienne , droplet |
| | Antiseptique | <i>Pseudomonas</i> | Contact |
| | Travaux d'excavation | <i>Aspergillus</i> | Aérienne |
| | Endoscopes | <i>Salmonella</i> <i>Pseudomonas</i> | Contact |

CHAPITRE II
LES β -LACTAMASES

II-1- Définition et classification

Les β -lactamases sont des enzymes bactériennes qui hydrolysent la liaison amide du cycle β -lactame inactivant les β -lactamines. Les gènes qui codent pour ces enzymes sont d'origine chromosomique ou plasmidique. Ces gènes ont aussi été détectés sur des transposons et des intégrons facilitant ainsi le transfert horizontal de ces gènes entre espèces phylogénétiquement éloignées. Ces enzymes sont exportés dans le milieu extracellulaire (bactéries à Gram positif) ou périplasmique (bactéries à Gram négatif). La production des β -lactamases est le mécanisme de résistance le plus répandu et le plus important des bactéries vis-à-vis des β -lactamines. Plus de 290 types de β -lactamases sont décrits (Touati, 2006).

Généralement, les β -lactamases sont classées suivant deux schémas: la classification moléculaire de Ambler qui tient compte de la structure primaire (séquence en acides aminés) des différentes β -lactamases et les divisent en quatre classes A, C, D qui sont des enzymes à serine active, et de classe B qui sont des metallo-enzymes nécessitant des ions Zn^{2+} . La classification fonctionnelle de Bush-Jacoby-Medeiros qui tient compte de la fonctionnalité des β -lactamases (substrat, profil d'inhibition) et divisent aussi ces enzymes en quatre groupes (1 à 4) avec plusieurs sous-groupes. La classification fonctionnelle mise à jour dans l'article de Bush et Jacoby (2010), est basée sur la proposition de Bush et *al.*, en 1995. Cette classification inclut le groupe 1 (classe C) des céphalosporinases, le groupe 2 (classe A et D) des β -lactamases à large spectre, des BLSE et des carbapénémases à serine et le groupe 3 (classe B) des metallo- β -lactamases. Plusieurs sous-groupes de chacun des grands groupes sont décrits en fonction du substrat préférentiel de l'enzyme (Bush et Jacoby, 2010).

Le tableau N°II illustre la relation entre la classification moléculaire d'Ambler et fonctionnelle de Bush et Jacoby (2010).

Tableau N°II : Relation entre la classification moléculaire d'Ambler et fonctionnelle (Bush et Jacoby, 2010).

| Groupe de Bush-Jacoby (2009) | Groupe de Bush-Jacoby (1995) | Classe moléculaire | Substrat préférentiel | Inhibition par | | Caractéristiques | Enzymes représentatives |
|------------------------------|------------------------------|--------------------|--|----------------|------|---|--------------------------------------|
| | | | | AC ou TZB | EDTA | | |
| 1 | 1 | C | Céphalosporines | Non | Non | -Hydrolyse meilleure des céphalosporines que les benzylpénicilline ; -Hydrolyse des céphamycines. | ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1 |
| 1e | NI | C | Céphalosporines | Non | Non | -hydrolyse accrue de la céftazidime et souvent autres oxyimino- β -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. | TEM-1, TEM-2, SHV-1 |
| 2be | 2be | A | Céphalosporines à spectre étendu, monobactames | Oui | Non | -Hydrolyse augmentée vis-à-vis des oxyimino- β -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 étendu, monobactames | Non | Non | -Hydrolyse augmentée vis-à-vis des oxyimino- β -lactamines ; -Résistance aux inhibiteurs de β -lactamases. | TEM-50 |
| 2c | 2c | A | Carbénicilline, | Oui | Non | -Hydrolyse meilleure pour la carbénicilline. | PSE-1, CARB-3 |
| 2ce | NI | A | Carbénicilline, céfépime | Oui | Non | -Hydrolyse de la carbénicilline, céfépime et céfpirome. | RTG-4 |
| 2d | 2d | D | Cloxacilline | V | Non | -Hydrolyse de la cloxacilline ou oxacilline. | OXA-1, OXA-10 |
| 2de | NI | D | Céphalosporines à spectre étendu | V | Non | -Hydrolyse de la cloxacilline ou l'oxacilline mais aussi des oxyimino- β -lactamines. | OXA-11, OXA-15 |
| 2df | NI | D | Carbapénèmes | V | Non | Hydrolyse de la cloxacilline, oxacilline et carbapénèmes. | OXA-23, OXA-48 |
| 2e | 2e | A | Céphalosporines à spectre étendu | Oui | Non | - Hydrolyse des céphalosporines ; - Inhibition par le clavulanate mais pas par l'aztréonam. | CepA |
| 2f | 2f | A | Carbapénèmes | V | Non | Hydrolyse des carbapénèmes, oxyimino- β -lactamines et céphamycines. | KPC-2, IMI-1, 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) | | | | | L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1 |
| 3b | 3 | B (B2) | Carbapénèmes | Non | Oui | Hydrolyse des carbapénèmes. | CphA, Sfh-1 |
| NI | 4 | inconnu | | | | | |

V : Variable

II-2- β -lactamases à spectre étendu (BLSE)

Les BLSE sont des β -lactamases de classe A ou D (sous-groupe 2be et 2de selon Jacoby et *al.*, 2010) capables d'hydrolyser les pénicillines, les céphalosporines de première, deuxième, troisième et quatrième génération et les monobactames. Les BLSE de classe A sont inhibées par les inhibiteurs de β -lactamases (I β L), comme l'acide clavulanique (Livermore, 2008).

▪ BLSE de type TEM (Temoneira)

Les BLSE de types TEM dérivent de TEM-1 et TEM-2 par substitution d'un ou de plusieurs acides aminés. Bien que les BLSE de ce type soient le plus souvent produites par *E. coli* et *K. pneumoniae*, ces enzymes ont été aussi mises en évidence chez les autres espèces d'Entérobactéries (*Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri* et *Salmonella spp.*), chez *Pseudomonas aeruginosa* (TEM-42) et *Capnocytophaga* (TEM-17).

En Europe, les BLSE de type TEM les plus fréquentes sont TEM-24 chez *Enterobacter aerogenes*, TEM-3 et TEM-4 chez *K. pneumoniae*, et TEM-52 chez *Salmonella enterica* et *E. coli* (Cantón et *al.*, 2008).

▪ BLSE de type SHV (Sulfhydrylvariable)

La β -lactamase SHV-1 qui est l'enzyme à partir de laquelle les BLSE de type SHV dérivent par substitution d'un ou de plusieurs acides aminés est très fréquente chez *K. pneumoniae*. Cette enzyme hydrolyse les pénicillines, les céphalosporines mais pas les oxyimino-céphalosporines et l'aztréoname. La transformation du phénotype non-BLSE en phénotype BLSE est pratiquement due toujours au remplacement de la glycine en sérine à la position 238.

▪ BLSE de type CTX-M (Céfotaximase –Munich)

Ces enzymes «émérgentes» représentent les BLSE les plus fréquentes au sein des entérobactéries au niveau mondial après une diffusion rapide depuis le milieu des années 90 (Livermore et *al.*, 2007). Elles hydrolysent préférentiellement le céfotaxime, d'où leur nom de céfotaximases (Bonnet, 2004). Au niveau structural, les CTX-M ne sont pas proches des β -lactamases de type TEM ou SHV (< 40 % d'identité). A ce jour, de nombreux variants de CTX-M ont été décrits (>50), et sont classés en 6 groupes phylogénétiques distincts : CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 et CTX-M-45 (Rossolini et *al.*, 2008).

Les progéniteurs des CTX-M ont été identifiés sur le chromosome de *Kluyveraspp.* qui sont des entérobactéries non pathogènes environnementales. En effet, les progéniteurs des gènes codant pour les CTX-M des groupes 1 et 2 et pour celles des groupes 8 et 9 sont respectivement *K. ascorbata* et *K. georgiana*, tandis que les sources des CTX-M des groupes 25 et 45 restent inconnues (Cantón et al., 2006).

▪ **BLSE de type GES (Guyana Extended-Spectrum Beta-lactamase)**

Les BLSE de type GES sont de plus en plus rapportées chez les BGN, notamment *P. aeruginosa*, *E. coli* et *K. pneumoniae*. GES-1 a été initialement décrite chez une souche de *K. pneumoniae* isolée en 1998 en France puis en Argentine, au Brésil, au Portugal et aux Pays-Bas. A ce jour, 9 variants différents ont été décrits dont GES-2 en Afrique du Sud, GES-5 à GES-8 (GES-7 = IBC-1 ; GES-8 = IBC-2) en Grèce, GES-3 et GES-4 au Japon, GES-5 en Corée du Sud, en Chine et au Brésil, et GES-9 en France. A noter que, contrairement à la plupart des BLSE, GES-1 n'hydrolyse pas l'aztréonam et surtout GES-2 hydrolyse les carbapénèmes en étant moins sensible aux I β L. Par une unique mutation, GES-2 est le premier exemple de BLSE avec un élargissement du spectre d'activité aux carbapénèmes ; depuis, 4 autres dérivés ont été décrits (GES-4 à GES-6, GES-8). De façon inquiétante, des souches de *P. aeruginosa* produisant GES-1 et la carbapénémase VIM-11 et d'*E. coli* produisant GES-7 et la carbapénémase VIM-2 ont été décrites respectivement en Argentine et en Grèce. Enfin, plusieurs épidémies de BGN producteurs de BLSE de type GES ont été rapportées : *K. pneumoniae* en Corée du Sud, au Portugal et en Grèce, *S. marcescens* aux Pays-Bas, et *P. aeruginosa* en Afrique du Sud (Naas et al., 2008).

▪ **Autres BLSE de classe A**

On trouve également d'autre BLSE appartenant à la classe A comme L'enzyme SFO-1 (*Serratia fonticola*) n'a été détectée qu'une seule fois dans une souche de *E. cloacae* isolée au Japon en 1988. L'enzyme BES-1 (Brazilian extended-spectrum β -lactamase) n'a été isolée qu'une seule fois à partir d'une souche de *S. marcescens* au Brésil en 1996. L'enzyme BEL-1 (Belgium extended-spectrum β -lactamase) a été identifiée dans une souche de *P. aeruginosa* en Belgique en 2004. L'enzyme TLA-1 (Tlahuicas - tribu indienne) a été décrite dans une souche de *E. coli* isolée au Mexique en 1993 (Naas et al., 2008). L'enzyme VEB-1 (Vietnam Extended-spectrum Beta-lactamase a38 % d'identité avec PER-1) a été retrouvée en 1996 dans une souche d'*E.*

coli isolée chez un patient vietnamien puis chez *P. aeruginosa* en Thaïlande (Weldhagen et al., 2003) (Naas et al., 2008). Plusieurs études épidémiologiques en Thaïlande et au Vietnam ont montré que respectivement jusqu'à 40 % et 80 % des souches d'entérobactéries et de *P. aeruginosa* résistantes à la céftazidime produisaient VEB-1. A ce jour, 4 dérivés de VEB-1 ont aussi été décrits (VEB-2 à VEB-5).

Bien que les BLSE appartiennent souvent à la classe A, plusieurs oxacillinases (OXA) (classe D et classe 2d) ont des propriétés de BLSE. Les β -lactamases de type OXA confèrent la résistance à l'ampicilline et à la céfalotine, et sont caractérisées par une forte activité hydrolytique des pénicillines M (oxacilline, cloxacilline). De plus, elles sont faiblement inhibées par l'acide clavulanique (Paterson et al., 2005).

L'enzyme PER-1 (*Pseudomonas* extended resistance), initialement découverte en 1993 chez *P. aeruginosa* en Turquie, est fréquente chez *P. aeruginosa* et *Acinetobacter spp.* (Weldhagen et al., 2003). Cette enzyme est faiblement liée à d'autre BLSE et confère une résistance aux pénicillines, céfotaxime, céftazidime, et à l'aztréonam mais variablement aux carbapénèmes et aux céphamycines. Son activité est inhibée par clavulanate, sulbactam et le tazobactam. Une enzyme PER-2 ayant 86% d'homologie en acides aminée avec PER-1, a été trouvée chez les souches de *S. enterica* en Argentine en 1996 et par la suite, chez d'autres bactéries à Gram négatif (Naas et al., 2008).

▪ Carbapénémases

L'acquisition de carbapénémases qui comprend à la fois les carbapénémases à serine et les metallo- β -lactamases, est devenue l'un des mécanismes de résistance les plus discutés durant ces dernières années. Les carbapénémases à serine ont été reconnues comme des enzymes chromosomiques spécifiques de l'espèce. A la fin des années 1990, les plasmides codant pour les carbapénémases à serine ont émergé avec les enzymes KPC.

Aujourd'hui, la famille des KPC et GES inclue au moins 10 uniques séquences KPC et 17 variantes de GES qui se sont propagées à travers le monde à la fois chez les bactéries fermentaires et nonfermentaires.

Ces enzymes confèrent un niveau élevé de résistance aux carbapénèmes, avec des CMI supérieurs à 256 μ g/ml dans la plus plupart des cas. Ces carbapénèmes sont codées par des gènes qui se situent la plupart du temps (si ce n'est systématiquement) au sein d'intégrons de classe 1

très souvent associés avec des gènes codant pour la résistance à d'autres familles d'antibiotiques, en particulier aux aminosides (Poirel et Nordmann, 2008).

Metallo- β -lactamases

Les metallo- β -lactamases continuent à se développer dans l'environnement clinique, avec des épidémies de VIM et IMP produites par des agents pathogènes signalés en Europe, en Asie et dans la région pacifique. Les M β L SPM-1, que l'on croyait être confinés au Brésil a été découverte en Europe sur un isolat de *P.aeruginosa* productrice de SPM-1.

En 2009 une nouvelle M β L a été décrite avec des caractéristiques biochimiques similaires à celles des enzymes IMP-1 et VIM-2, mais avec seulement avec 32% de séquences identiques à VIM-1. Cette enzyme a été initialement identifiée chez des souches du nord de l'Europe qui isolées chez les patients en provenance d'Inde ou les patients qui avaient voyagé en Inde pour un acte médical. Cette enzyme a été nommée NDM-1 (New Delhi metallo- β -lactamase).

Oxacillinases

Des oxacillinases aux propriétés de carbapénémase ont été identifiées chez *A. baumannii*, ce type de mécanisme serait émergent. Neuf enzymes de ce type ont été mises en évidence dans des souches résistantes ou de sensibilité intermédiaire à l'imipénème. La première β -lactamase de ce type fut OXA-23 (également appelée ARI-1) identifiée en Ecosse initialement puis en France (Zarrilli et al., 2008). OXA-23 a été identifiée dans un clone à l'origine d'une épidémie dans plusieurs unités d'un hôpital sud-coréen (Jeon et al., 2005).

MATERIEL
ET METHODES

I. Prélèvements

Quatre prélèvements au niveau des surfaces de l'environnement hospitalier ont été effectués dans deux services (infectieux et pneumonie) de l'hôpital Frantz Fanon.

Les prélèvements ont été effectués par la méthode d'écouvillonnage : l'écouvillon stérile est préalablement humidifié puis frotté sur une zone définie (25 cm²) en stries parallèles rapprochées (Quesnel, 1998). L'écouvillon est immédiatement introduit dans bouillon nutritif et incubé à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Les prélèvements ont ciblé des surfaces inertes et vivantes, les plus susceptibles de rentrer en contact avec les patients, le personnel et les visiteurs (Tableau N°III et N°IV).

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

| Surfaces | Sites de prélèvement |
|-------------------|--|
| Salle de réunion | Table de réunion, tableau, tableau radio, poignée d'armoire, poignée de fenêtre, radiateur, porte manteau, aérosol, interrupteur, télécommande, |
| Sanitaires | Poignée robinet, évier, porte savon, poignée porte, chasse d'eau, cuvette, interrupteur, recevoir de douche |
| Chambre de malade | Table de chevet, bordure de lit, drap, poignée de porte, interrupteur, poignée fenêtre, radiateur, tuyauterie d'O ₂ , clavier ordinateur d'un malade |
| Salle de soin | Poignée de porte, interrupteur, poignée de réfrigérateur, poignée armoire, poignée robinet, paillasse, table de soin |
| Matériel | Chariot de matériel, téléphone, stéthoscope, électrocardiogramme, plateau, poignée armoire, brassard de tensiomètre, Table de soin, échographe, clavier ordinateur, photocopieur, bureau, poignée de réfrigérateur, poignée armoire, micro-onde. |
| Personnel | Mains, blouses |

Tableau N°IV: Sites de prélèvement au niveau du service Pneumo-ptisiologie

| Surfaces | Sites de prélèvement |
|-----------------------|--|
| Chambre de malade | Table de lit, bordure de lit, drap, poignée de porte, interrupteur, poignée fenètre, radiateur, masque à O ₂ , chariot, clavier ordinateur de malade. |
| Salle de prélèvement | Table de soin, chariot, lavabo, masque a O ₂ , bocal d'aspiration, flacon de produit, poignée porte, poignée fenètre, écran de radio, table, interrupteur, porte sérum. |
| Sanitaires | Porte savon, poignée porte, chasse d'eau, cuvette, lavabo, robine, interrupteur, |
| Salle de soin | Poignée de porte, poignée de réfrigérateur, poignée armoire, table de soin, chariot, lavabo, brassard de tensiomètre, plateau. |
| Salle de consultation | Chariot, masque à O ₂ , armoire, poignée porte, poignée fenètre, écran radio, lavabo, porte savon, interrupteur, drap |
| Salle de phybroscopie | Chariot, masque à O ₂ , armoire, électrocardiogramme, poignée porte, poignée fenètre, écran radio, lavabo, robinet, porte savon, intercepteur, drap, tuyauteries. |
| Laboratoire d'analyse | Poignée porte, poignée fenètre, poigner placard, paillese bureau, lavabo, robinet, microscope, centrifugeuse, intercepteur. |
| Personnel | Mains |

II. Isolement et purification

A partir des cultures positives, on ensemence à l'aide d'une ose en plastique une gélose de Mac Conkey additionnée de céftazidime et de vancomycine avec une concentration finale de 2 µg/ml et 8 µg/ml respectivement. Les boîtes ensemencées sont incubées à 37°C pendant 24 heures. Après incubation, les boîtes sont examinées selon l'aspect des colonies et chaque type est réisolé sur gélose Mac Conkey (French *et al.*, 2004).

III. Identification

Les différentes souches ont été identifiées après coloration de Gram, catalase et oxydase, en utilisant une galerie API 20E pour les entérobactéries, culture à 44°C pour *Acinetobacter baumannii* et production de pigment pour *Pseudomonas aeruginosa*.

Utilisation de la galerie API20E (Biomérieux)

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, pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles. Les tubes et les cupules des tests CIT, VP et GEL sont remplis alors que seuls les tubes sont remplis dans le cas des autres tests. En ce qui concerne les tests ADH, LDC, ODC, UREE et H₂S, leurs cupules sont remplies avec de l'huile de vaseline stérile pour empêcher les gaz de se volatiliser. La galerie est placée dans son support dont les alvéoles sont remplies d'eau, refermée par un couvercle puis incubée à 37°C pendant 24 heures.

Dans le cas où 03 tests ou plus sont positifs, on note sur la fiche des résultats toutes les réactions spontanées puis on révèle les tests nécessitant l'addition de réactifs (TDA, VP et indole). L'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification.

IV. Etude de la sensibilité des souches sélectionnées aux antibiotiques

La sensibilité des souches aux antibiotiques est testée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du Comité Français de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2010). Les antibiotiques testés sont donnés dans le tableau N°V.

Tableau N°V : Antibiotiques testés

| Antibiotiques | Symboles | Charges (ug) | Sensible (S) | Resistant (R) | Familles |
|--------------------------|----------|--------------|--------------|---------------|---------------------|
| Céfoxitine | FOX | 30 | ≥ 22 | < 15 | C2G |
| Céfotaxime-clavulanate | CCTX | 30+10 | ≥ 26 | < 23 | C3G |
| Céftazidime- clavulanate | CCAZ | 30+10 | ≥ 26 | < 19 | C3G |
| Céfotaxime | CTX | 30 | ≥ 26 | < 23 | C3G |
| Céftazidime | CAZ | 30 | ≥ 26 | < 19 | C3G |
| Céfépime-cvavulanate | CFEP | 30+10 | ≥ 24 | < 17 | C4G |
| Céfépime | FEP | 30 | ≥ 24 | < 17 | C4G |
| Céfpirome | CPO | 30 | ≥ 24 | < 17 | C4G |
| Amoxicilline-clavulanate | AMC | 20+10 | ≥ 21 | < 14 | Aminopénicillines |
| Imipeneme | IPM | 10 | ≥ 24 | < 17 | Carbapénèmes |
| Ticarcilline | TIC | 75 | ≥ 22 | < 22 | Carboxypénicillines |
| Ticarcilline-clavulanate | TCC | 75+10 | ≥ 22 | < 22 | Carboxypénicillines |
| Aztréonam | ATM | 30 | ≥ 27 | < 21 | Monobactames |
| Amikacine | AMK | 30 | ≥ 17 | < 15 | Aminosides |
| Gentamicine | GM | 10 UI | ≥ 16 | < 16 | Aminosides |
| Chloramphenicol | C | 30 | ≥ 23 | < 23 | Phenicol |
| Colistine | CS | 50 | ≥ 15 | < 15 | Polypeptides |
| Rifampicine | RIF | 30 | ≥ 19 | < 14 | Rifamycines |
| Tetracycline | TET | 30 UI | ≥ 19 | < 17 | Tetracyclines |
| Tobramycine | TOB | 10 | ≥ 18 | < 16 | Aminosides |

S/R selon les diamètres critiques utilisés par le CA-SFM.

C2G : Céphalosporines de deuxième Génération, C3G : Céphalosporines de troisième Génération, C4G : Céphalosporines de quatrième Génération.

V. Recherche des phénotypes de résistance

a. DD-test sur gélose Mueller Hinton

La production d'une β -lactamase à spectre étendu (BLSE) est détectée par l'épreuve de synergie qui consiste à placer des disques de céfotaxime, céftazidime, céfepirome et aztréoname à une distance de 20 mm (centre à centre) d'un disque d'augmentin. La présence d'une BLSE se traduit par l'apparition d'une synergie entre les disques de céfotaxime, céftazidime, céfepirome et/ou le disque d'augmentin (Jarlier et *al.*, 1988).



Figure 1 : Disposition des disques d'antibiotique pour le DD-test (Touati).

b. DD-test sur gélose Mueller Hinton additionnée de 250 μ g/ml decloxacilline

Chez les souches naturellement productrices de céphalosporinases (*Enterobacter*, *Acinetobacter* et *pseudomonas*), le DD-test est réalisé sur une gélose Muller Hinton additionnée de cloxacilline, concentration finale de 250 μ g/ml afin d'inhiber l'activité céphalosporinase (Jarlier et *al.*, 1988).

c. Détection des carbapénèmases : Hodge test (Hodge et *al.*, 1978)

La production de carbapénèmases est recherchée pour les souches résistantes à l'imipénème. Un disque d'imipénème est appliqué au centre d'une boîte de Mueller Hinton (MH) préalablementensemencée avec la souche d'*Escherichia coli* ATCC 25922 (sensible à tous les antibiotiques). Ensuite, les souches à tester sont ensemencées sur la gélose sous forme

de stries à partir du disque d'imipénème jusqu'à la périphérie de la boîte (Figure 2). Après une nuit à 37°C, la déformation de la zone d'inhibition à l'intersection entre une strie et la culture d'*E.coli* indique la présence d'une carbapénémase (Cuzon et al.,2010).

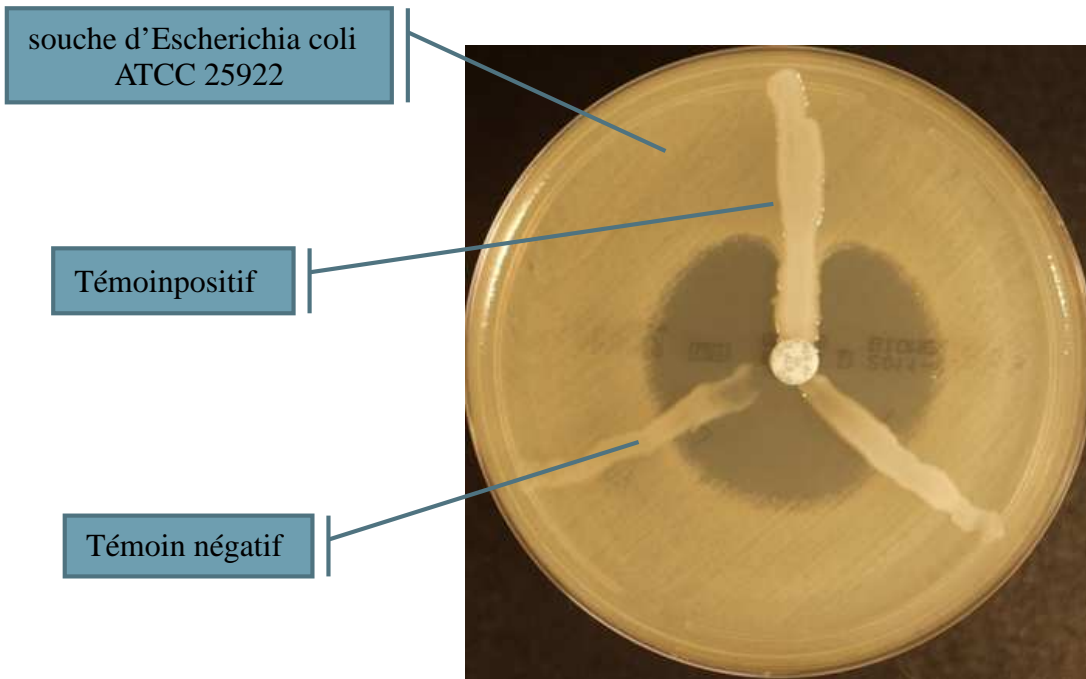


Figure 2:Hodge test (Touati)

d. Test à l'EDTA

La recherche de metallo- β -lactamases est effectuée chez toutes les souches résistantes à l'imipénème selon la méthode de Yong et al., (2002) en utilisant une solution stérilisée par autoclavage d'EDTA à 0,5M, pH 8.

Un antibiogramme est réalisé en utilisant deux disques d'imipénème (10 μ g) déposés séparément sur une boîte de Pétri, l'un comme témoin et sur l'autre, on ajoute 4 μ l de solution d'EDTA à 0,5M qui est un agent chélateur des ions Zn²⁺. Les souches dont le diamètre d'inhibition autour du disque IPM-EDTA est supérieur à celui obtenu avec le disque d'IPM seul d'au moins 6 mm sont considérées comme souches productrices de M β L (Yong et al., 2002).

VI. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices

La CMI des souches vis-à-vis de céftazidime, céfotaxime, aztréonam, imipenème et céfpirome a été déterminée par la méthode de dilution sur gélose MH et MH+Cloxacilline (250µg/ml).

Préparation d'une gamme d'antibiotiques

La poudre d'antibiotique est dissoute dans l'eau distillée stérile afin d'obtenir une solution mère d'une concentration de 5120 mg/l. A partir de cette solution, on effectue des dilutions comme le montre le tableau N°VI (CA-SFM, 1995).

Tableau N°VI:Préparation de la gamme d'antibiotiques

| Solution initiales (mg/l) | Solution mère (ml) | Volume du diluant (ml) | Concentrations obtenues (mg/l) | Concentrations finales au milieu de culture (mg/ml) |
|----------------------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|--|
| 5120 | 2 | 6 | 1280 | 128 |
| 5120 | 1 | 7 | 640 | 64 |
| 5120 | 1 | 15 | 320 | 32 |
| 320 | 4 | 4 | 160 | 16 |
| 320 | 2 | 6 | 80 | 8 |
| 320 | 1 | 7 | 40 | 4 |

On dépose 2ml de chaque dilution de la gamme d'antibiotique dans la boîte de Pétri et on ajoute 18 ml de la gélose Mueller Hinton en surfusion. On laisse solidifier et on fait sécher pendant quelques minutes à l'étuve à 37°C.

A partir d'une suspension bactérienne de 10⁶ bactéries/ml, on ensemence par spot (10µl) et on incube à 37°C pendant 24 heures.

La concentration minimale inhibitrice est définie comme étant la plus faible concentration d'antibiotiques pour laquelle il n'y a pas de croissance (CA-SFM, 1995).

VII. Transfert de gène de résistance par conjugaison

Pour le transfert de gène de résistance par conjugaison, nous avons utilisé le protocole suivant au niveau du laboratoire (Touati, 2008).

Souches donatrices : *Enterobacter cloacae* (102, 105, 125, 63,54) et *Escherichia coli* (57) sensible à la rifampicine.

Souche réceptrice : *Escherichia coli* C600 résistante à la rifampicine et sensible aux autres antibiotiques.

Le transfert des gènes de résistances est réalisé comme suit :

- Une culture des six souches donatrices et de la souche réceptrice est réalisée dans 10ml de bouillon trypticase soja (TSB) et incubée une nuit dans un bain-marie sous agitation.
- 200µl des cultures de souches donatrices et réceptrice ont été ajoutées à 10ml de bouillon trypticase soja soit une dilution de 1/51 puis incubé à 37°C pendant 3 heures.
- Dans un erlenmeyer de 25 ml stérile les cultures en phase exponentielle de la souche donatrice (1 ml) et réceptrice (1 ml) ont été mélangées additionné de 1 ml de TSB stérile (un rapport v/v/v).
- Après avoir ajouté 1ml de TSB stérile, Les culture ont été incubées 4 heures à 37°C.
- Pour la sélection des transconjugants : 200 µl des cultures en erlenmeyer ont étéensemencées avec un râteau étaleur sur gélose trypticase soja (TSA) contenant la céftazidine (16 µg/ml) et la rifampicine à (250 µg/ml).
- Pour le contrôle, 6 boites témoins contenant de la gélose trypticase soja additionnée de rifampicine (250 µg/ml) sont préparées sur lesquelles les souches donatrices sontensemencées et une boîte additionnée de céftazidine sur laquelle la souche réceptrice estensemencée.
- Tous les milieuxensemencés ont été incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures.

Les souches de transconjugant obtenues ont été identifiées en inoculant un milieu eau peptonée exempte d'indole incubé à 44°C et soumises à l'antibiogramme et au test de double synergie.

RESULTATS
ET DISCUSSION

I. Souches bactériennes

Au cours de notre étude, 250 prélèvements ont été effectués sur différentes surfaces de l'environnement hospitalier au niveau de l'hôpital FRANTZ FANON de la wilaya de Bejaia, durant le mois de mars 2012. La répartition des souches isolées par service est donnée dans les tableaux N° VII.

Tableau N°VII : Nombre de prélèvement et de souches isolées au niveau du service infectieux et pneumo-physiologie.

| | Surfaces | Nombre de Prélèvements | Nombres de souches isolées |
|--|-----------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| Service infectieux (5 souches) | Chambre Femme | 44 | 0 |
| | Salle de réunion | 12 | 0 |
| | Sanitaires | 12 | 1 |
| | Chambre homme | 19 | 1 |
| | Salle de soin | 8 | 0 |
| | Matériels | 22 | 3 |
| | Personnels | 8 | 0 |
| Service pneumo-physiologie (11 souches) | Chambre homme | 38 | 0 |
| | Salle de prélèvement | 15 | 0 |
| | Sanitaires | 9 | 6 |
| | Chambre femme | 19 | 5 |
| | Salle de soin | 8 | 0 |
| | Salle de consultation | 11 | 0 |
| | Salle de fibroscopie | 14 | 0 |
| | Laboratoire d'analyse | 9 | 0 |
| | Personnels | 2 | 0 |
| Total | | 250 | 16 |

Au total 16 souches de bacilles à Gram négatif résistantes au Céfotaxime (CAZ) ont été sélectionnées des différentes surfaces analysées. 11 souches ont été isolées du service pneumo-physiologie et 05 souches du service infectieux. Les différents sites d'isolement de ces souches sont donnés dans le tableau N° VIII.

La fréquence de contamination des deux services et différentes, cela peut être expliqué par le fait que le service infectieux soit nouvellement installé et le fait qu'il accueille un nombre réduit de patient pourrait également influencer la qualité et le degré de contamination de cet environnement contrairement au service pneumo-physiologie.

Tableau N°VIII : Différents sites de prélèvement

| Code | Salles | Dates | Souches | Service | Site de prélèvement |
|-------|---------------------|------------|--------------------------------|---------|-------------------------|
| I 63 | Salle de bains | 09/03/2012 | <i>Enterobacter cloacae</i> | I H | Chasse d'eau |
| I 102 | Couloire | 09/03/2012 | <i>Enterobacter cloacae</i> | I H | Electro cardiogramme |
| I 105 | Couloire | 09/03/2012 | <i>Enterobacter cloacae</i> | I H | Brassard de tensiomètre |
| I 125 | Loge des infirmiers | 09/03/2012 | <i>Enterobacter cloacae</i> | I H | Micro onde |
| I 76 | Chambre 1 | 09/03/2012 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | I H | Drap |
| P 57 | Salle de bain | 13/03/2012 | <i>Escherichia coli</i> | P P H | Poignée de porte |
| P 54 | Salle de bain | 13/03/2012 | <i>Enterobacter cloacae</i> | P P H | Lavabo |
| P 55 | Salle de bain | 13/03/2012 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | P P H | Cuvette de toilette |
| P 92 | Chambre 4 | 20/03/2012 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | P P F | Drap |
| P 93 | Chambre 4 | 20/03/2012 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | P P F | Table de chevet |
| P 94 | Chambre 4 | 20/03/2012 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | P P F | Tuyauterie de Sérum |
| P 95 | Chambre 4 | 20/03/2012 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | P P F | Chariot de soin |
| P 105 | Chambre 2 | 20/03/2012 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | P P F | Table de chevet |
| P 119 | Salle de bain | 20/03/2012 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | P P F | Lavabo |
| P 120 | Salle de bain | 20/03/2012 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | P P F | Robinet |
| P 121 | Salle de bain | 20/03/2012 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | P P F | Poignée de porte |

I H : infectieux homme, PPH: pneumo-physiologie homme, PPF: pneumo-physiologie femme

D'après les tableaux VIII, il apparaît une différence entre le taux de contamination du service infectieux et pneumo-physiologie. En effet, la répartition des bactéries résistantes par services montre que le service pneumo-physiologie possède un taux de contamination plus élevé (11/125) par rapport au service infectieux (5/125).

L'identification par galerie API 20 E et galerie biochimique ont permis d'identifier ces souches comme suit : 9 souches d'*Acinetobacter baumannii*, 5 souches d'*Enterobacter cloacae*, une souche d'*Escherichia coli* et une souche de *Pseudomonas aeruginosa*.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Liassine (2000) qui a montré que les microorganismes de l'environnement hospitalier sont extrêmement variés. Les bactéries pathogènes à Gram négatif retrouvées dans cet environnement appartiennent à différents

groupes bactériens (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas maltophilia*).

II. Sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité des souches aux antibiotiques est donnée dans le tableau N° IX et N° X.

Tableau N° IX : Diamètres des zones d'inhibition (mm)

| Code | Souche | CTX | CCTX | CAZ | CCAZ | FEP | CFEP | TIC | TCC | AMC | FOX | IPM | TET | C | RIF | Cs | GEN | AMK | KAN | TOB |
|-------|---------------------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|----|-----|-----|-----|-----|
| I 102 | <i>E.cloacae</i> | 6 | 35 | 6 | 34 | 26 | 35 | 6 | 6 | 6 | 17 | 27 | 6 | 6 | 10 | 15 | 10 | 17 | 10 | 8 |
| I 105 | <i>E.cloacae</i> | 12 | 28 | 16 | 27 | 19 | 28 | 6 | 6 | 6 | 6 | 30 | 6 | 9 | 11 | 16 | 13 | 20 | 14 | 10 |
| I 125 | <i>E.cloacae</i> | 16 | 27 | 17 | 27 | 25 | 29 | 6 | 6 | 6 | 6 | 28 | 6 | 6 | 11 | 17 | 6 | 22 | 12 | 6 |
| I 63 | <i>E.cloacae</i> | 6 | 13 | 6 | 11 | 24 | 28 | 6 | 6 | 6 | 6 | 26 | 6 | 6 | 11 | 15 | 13 | 21 | 16 | 12 |
| I76 | <i>A.baumannii</i> | 6 | 6 | 6 | 6 | 10 | 11 | 6 | 6 | 6 | 6 | 8 | 6 | 6 | 14 | 14 | 17 | 20 | 8 | 20 |
| P 54 | <i>E.cloacae</i> | 6 | 10 | 6 | 10 | 25 | 23 | 6 | 6 | 6 | 11 | 28 | 22 | 29 | 12 | 15 | 26 | 23 | 24 | 22 |
| P55 | <i>A.baumannii</i> | 6 | 6 | 6 | 6 | 9 | 12 | 6 | 6 | 6 | 6 | 9 | 6 | 6 | 15 | 15 | 17 | 12 | 6 | 19 |
| P 57 | <i>E.coli</i> | 6 | 27 | 9 | 27 | 12 | 25 | 6 | 6 | 6 | 27 | 30 | 25 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 |
| P92 | <i>A.baumannii</i> | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 13 | 15 | 6 | 17 | 15 | 16 | 13 | 9 | 15 |
| P95 | <i>A.baumannii</i> | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 9 | 16 | 6 | 14 | 15 | 18 | 16 | 17 | 17 |
| P93 | <i>A.baumannii</i> | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 9 | 17 | 6 | 18 | 16 | 17 | 13 | 9 | 16 |
| P94 | <i>A.baumannii</i> | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 13 | 19 | 6 | 19 | 19 | 17 | 17 | 9 | 17 |
| P 105 | <i>P.aeruginosa</i> | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 9 | 6 | 6 | 6 | 27 | 15 | 15 | 12 | 18 | 25 | 23 | 14 | 23 |
| P119 | <i>A.baumannii</i> | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 9 | 18 | 6 | 19 | 17 | 6 | 16 | 6 | 6 |
| P120 | <i>A.baumannii</i> | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 10 | 19 | 6 | 17 | 18 | 20 | 16 | 11 | 20 |
| P121 | <i>A.baumannii</i> | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 8 | 18 | 6 | 15 | 17 | 12 | 19 | 9 | 10 |

Légende : CTX : Céfotaxime, CCTX : Céfotaxime/AC. Clavulanique, CAZ : Céftazidime, CCAZ : Céftazidime/AC clavulanique, FEP : Céfépime,

CFEP: Céfépime/ AC. Clavulanique, TIC: Ticarcilline, TCC: Ticarcilline/AC. Clavulanique, AMC: Amoxicilline/AC. Clavulanique, FOX: Céfoxitine

IPM: Imipénème, TET : Tétracycline, C : Chloramphénicol, RIF : Rifampicine, Cs : Colistine, GEN : Gentamicine, AMK : Amikacine,

Tableau N° X : Sensibilité des souches aux antibiotiques (Interprétation en catégories cliniques selon le CA-SFM)

| Code | Souche | CTX | CCTX | CAZ | CCAZ | FEP | CFEP | TIC | TCC | AMC | FOX | IPM | TET | C | RIF | Cs | GEN | AMK | KAN | TOB |
|-------|---------------------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|-----|----|-----|-----|-----|-----|
| I 102 | <i>E.cloacae</i> | R | S | R | S | S | S | R | R | R | I | S | R | R | R | S | R | S | R | R |
| I 105 | <i>E.cloacae</i> | R | S | R | S | I | S | R | R | R | R | S | R | R | R | S | R | S | R | R |
| I 125 | <i>E.cloacae</i> | R | S | R | S | S | S | R | R | R | R | S | R | R | R | S | R | S | R | R |
| I 63 | <i>E.cloacae</i> | R | R | R | R | S | S | R | R | R | R | S | R | R | R | S | R | S | I | R |
| I76 | <i>A.baumannii</i> | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | I | R | I | S | R | S |
| P 54 | <i>E.cloacae</i> | R | R | R | R | S | S | R | R | R | R | S | S | S | R | S | S | S | S | S |
| P55 | <i>A.baumannii</i> | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | I | S | I | R | R | S |
| P 57 | <i>E.coli</i> | R | S | R | S | R | S | R | R | R | S | S | S | R | I | R | R | R | R | R |
| P92 | <i>A.baumannii</i> | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | I | S | I | R | R | R |
| P95 | <i>A.baumannii</i> | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | I | S | S | I | S | I |
| P93 | <i>A.baumannii</i> | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | I | R | I | S | I | R | R | I |
| P94 | <i>A.baumannii</i> | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | R | S | S | I | S | R | I |
| P105 | <i>P.aeruginosa</i> | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | R | R | R | S | S | S | R | S |
| P119 | <i>A.baumannii</i> | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | I | R | S | S | R | I | R | R |
| P120 | <i>A.baumannii</i> | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | R | I | S | S | I | R | S |
| P121 | <i>A.baumannii</i> | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | I | R | I | S | R | S | R | R |

Le développement et la fréquence des bactéries résistantes parmi les espèces communément responsables d'infections nosocomiales a eu pour conséquence une consommation accrue de certains antibiotiques entraînant ainsi une escalade de résistance (Abid et al., 2007).

• **Sensibilité des souches aux β -lactamines**

Les 16 souches sont résistantes au céfotaxime, céftazidime, ticarcilline, amoxicilline-clavulanate et ticarcilline-clavulanate. 75% des souches sont résistantes au céfépime, céfotaxime-clavulanate, céftazidime-clavulanate. Toutes les souches d'*A. baumannii* sont résistantes à l'imipénème (figure 3).

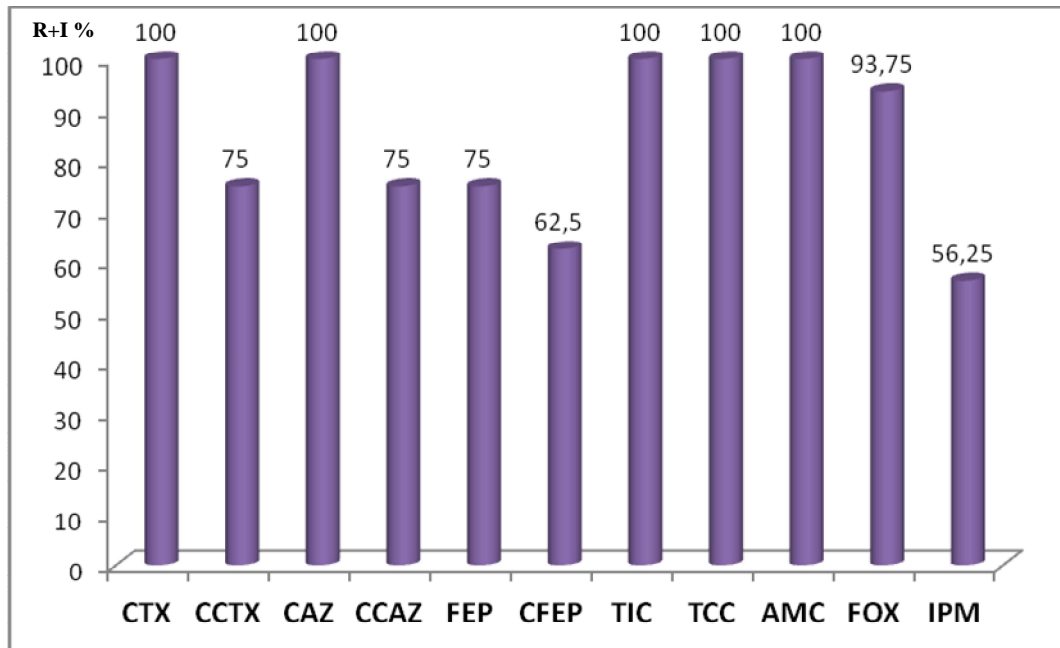


Figure 3: Taux de résistance des souches aux β -lactamines.

• **Susceptibilité des souches aux aminosides**

Des taux de résistance très élevés aux différents aminosides ont été obtenus : 87% à la kanamicine, 75% à la gentamicine, 68,75% à la tobramicine et 43,75% à l'amikacine (tableau XII et figure 4).

Tableau N°XI : Phénotype de résistance aux Aminosides.

| Code | Souche | GEN (G) | KAN (K) | TOB (T) | AMK (A) | Phénotype |
|-------|---------------------|---------|---------|---------|---------|-----------|
| I76 | <i>A.baumannii</i> | I | R | S | S | GK |
| P55 | <i>A.baumannii</i> | I | R | S | R | GKA |
| P94 | <i>A.baumannii</i> | I | R | I | S | GKT |
| P121 | <i>A.baumannii</i> | R | R | R | S | GKT |
| P92 | <i>A.baumannii</i> | I | R | R | R | GKTA |
| P93 | <i>A.baumannii</i> | I | R | I | R | GKTA |
| P119 | <i>A.baumannii</i> | R | R | R | I | GKTA |
| P120 | <i>A.baumannii</i> | S | R | S | I | KA |
| P95 | <i>A.baumannii</i> | S | S | I | I | TA |
| I 102 | <i>E.cloacae</i> | R | R | R | S | GKT |
| I 105 | <i>E.cloacae</i> | R | R | R | S | GKT |
| I 125 | <i>E.cloacae</i> | R | R | R | S | GKT |
| I 63 | <i>E.cloacae</i> | R | I | R | S | GKT |
| P 54 | <i>E.cloacae</i> | S | S | S | S | SAUVAGE |
| P 57 | <i>E.coli</i> | R | R | R | R | GKTA |
| P 105 | <i>P.aeruginosa</i> | S | R | S | S | K |

G : Gentamicine, K : Kanamicine, T : Tobramycine, A : Amikacine

Le phénotype GKA est probablement dû à la modification de l'antibiotique soit par une *O*-adényltransférase (ANT(2)-Ia) ou par une *N*-acétyltransférase (AAC(3)-Ia). Ces modifications empêchent la liaison de l'aminoside à sa cible (ARNr16s) (Wright, 2008).

Une seule souche *E.cloacae* a été retrouvée sensible aux 4 aminosides testés. La souche de *P.aeruginosa* est naturellement résistante à la kanamicine et les 7 souches restantes (4 *E.cloacae* et 3 *A.baumannii*) sont résistantes à 3 aminosides (phénotype GKA pour la souche *A.baumannii* P55 et GKT pour le reste des souches). 4 souches sont résistantes à tous les aminosides testés (3 *A.baumannii* et *E.coli* (P57)).

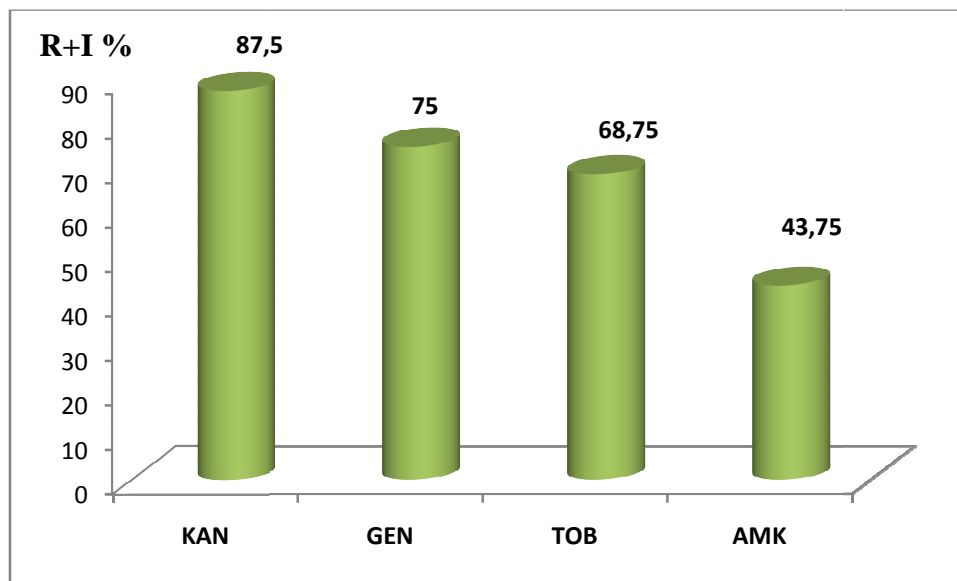


Figure 4 : Taux de résistance des souches aux aminosides

- **Sensibilité des souches aux autres familles d'antibiotiques**

Concernant les autres familles d'antibiotique, 93.75%, 87.05% et 75% des souches sont respectivement résistantes au chloramphénicol, rifampicine et tétracycline. 2 souches d'*E.coli* et une souche d'*A.baumannii* sont retrouvées résistantes à la colistine (figure 5).

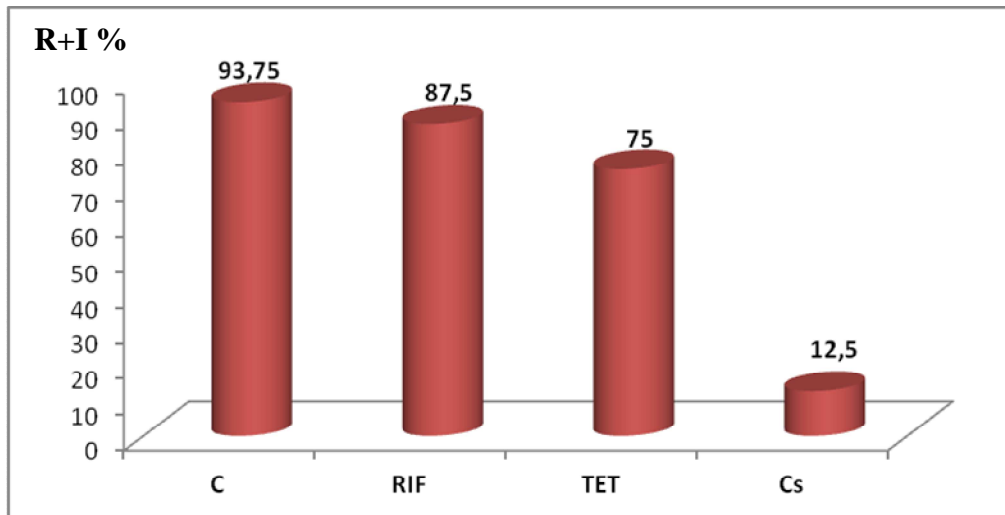


Figure 5 : Taux de résistance des souches aux autres familles d'antibiotiques.

- **Indice de multi-résistance (IMR)**

L'indice de multi-résistance aux antibiotiques est calculé selon le rapport du nombre d'antibiotiques auxquels la souche est résistante sur le nombre total d'antibiotiques testés. Cet indice renseigne sur la multi-résistance de la souche. Le tableau N°XII donne les résultats du calcul de cet indice.

Tableau N°XII : Indice de multi-résistance des souches étudiées.

| Souche | Site de prélèvement | Rapport | IMR |
|--------------------------------|-------------------------|---------|------|
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | Drap | 18/19 | 0,95 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | Tuyauterie de Sérum | 18/19 | 0,95 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | Drap | 17/19 | 0,89 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | Lavabo | 17/19 | 0,89 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | Lavabo | 17/19 | 0,89 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | Poignée de porte | 17/19 | 0,89 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | Table de chevet | 16/19 | 0,84 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | Chariot de soin | 15/19 | 0,79 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | Robinet | 15/19 | 0,79 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | Micro onde | 14/19 | 0,73 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Table de chevet | 14/19 | 0,73 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | Electro cardiogramme | 13/19 | 0,68 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | Chasse d'eau | 12/19 | 0,63 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | Cuvette de toilette | 13/19 | 0,63 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | Brassard de tensiomètre | 12/19 | 0,61 |
| <i>Escherichia coli</i> | Poignée de porte | 9/19 | 0,47 |

On note d'après ce tableau, que les 16 souches étudiées expriment une résistance vis-à-vis de 9 à 18 antibiotiques. L'indice de multi-résistance des souches varie de 0.47 à 0.95. Les souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées du service Pneumo-phtisiologie possèdent l'indice de résistance le plus élevé.

III. Détermination des phénotypes de résistance

a- Le DD-test sur milieu MH a permis d'observer une image de synergie (figure 6) chez cinq souches d'entérobactéries (4 *E.cloacae* et *E.coli*), indiquant ainsi que ces souches sont productrices de BLSE.

b- Le test de synergie sur gélose MH+ cloxacilline a permis d'obtenir les résultats suivant : La souche de *P.aeruginosa* et la souche d'*E.cloacae*(P54) sont hyperproductrices de leur AmpC chromosomique puisqu'il ya eu augmentation des diamètres (sensible) après ajout de la cloxacilline. Aucune récupération dans les diamètres d'inhibitions, ni d'image de synergie n'ont été observées pour les 9 souches d'*A.baumannii*. A noter que ces souches sont résistantes à l'imipénème.



Figure 6 : Hyperproduction de céphalosporinase sur Muller Hinton plus cloxacilline.

c- Le Hodge test a été positif pour les 9 souches d'*Acinetobacter baumannii*, traduisant la production probable de carbapénèmases.

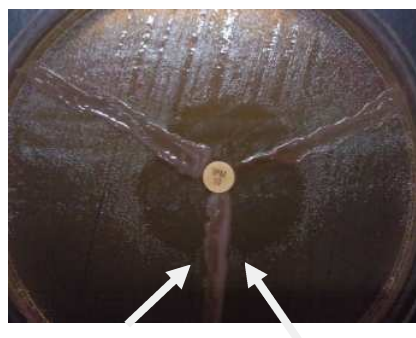


Figure 7 : Résultats du test de Hodge sur Mac Conkey.

La présence des bactéries à Gram négatif multirésistantes sur les surfaces de l'environnement hospitalier souligne la capacité de cet environnement à fournir une niche écologique importante de microorganismes résistants et qui présentent une signification clinique dans l'émergence des infections nosocomiales (Hota et *al.*, 2004). Ces bactéries résistantes aux antibiotiques sont transmises chez les patients au niveau des hôpitaux par la contamination de leur environnement ou par des vecteurs humains. Ces bactéries servent aussi de réservoir de résistance plasmidique aux antibiotiques qui sont transmis horizontalement entre les souches et les espèces de bactéries (Webb et *al.*, 2005).

d- Le test à l'EDTA, aucune récupération dans les diamètres au tour du disque d'imipénème + EDTA n'a été observée, indiquant probablement l'absence de production de metallo- β -lactamases. Les différents résultats obtenus sont donnés dans le tableau N°XIII.

Tableau N°XIII: Phénotype de résistance aux β -lactamines.

| Code | Souches | DD-TEST | Hodge test | EDTA | Phenotype |
|-------|---------------------|---------|------------|------|------------|
| P 54 | <i>E.cloacae</i> | - | ND | ND | AmpC Hyper |
| P 105 | <i>P.aeruginosa</i> | - | ND | ND | AmpC Hyper |
| I 102 | <i>E.cloacae</i> | + | ND | ND | ESBL |
| I 105 | <i>E.cloacae</i> | + | ND | ND | ESBL |
| I 125 | <i>E.cloacae</i> | + | ND | ND | ESBL |
| I 63 | <i>E.cloacae</i> | + | ND | ND | ESBL |
| P 57 | <i>E.coli</i> | + | ND | ND | ESBL |
| I76 | <i>A.baumannii</i> | - | + | - | OXA |
| P55 | <i>A.baumannii</i> | - | + | - | OXA |
| P92 | <i>A.baumannii</i> | - | + | - | OXA |
| P95 | <i>A.baumannii</i> | - | + | - | OXA |
| P93 | <i>A.baumannii</i> | - | + | - | OXA |
| P94 | <i>A.baumannii</i> | - | + | - | OXA |
| P119 | <i>A.baumannii</i> | - | + | - | OXA |
| P120 | <i>A.baumannii</i> | - | + | - | OXA |
| P121 | <i>A.baumannii</i> | - | + | - | OXA |

OXA : oxacillinases.

IV. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Les CMI ont été déterminées pour les 5 souches d'entérobactéries BLSE (tableau XIV) et pour les 9 souches d'*Acinetobacter baumannii* (tableau XV).

Tableau N°XIV : Concentrations minimales inhibitrices des entérobactéries BLSE.

| Code | Souche | Antibiotiques | | | | | | | |
|--------------|------------------|---------------|-------------------|------|-------------------|------|-------------------|------|-------------------|
| | | CTX | CTX+ Cloxacilline | CAZ | CAZ+ Cloxacilline | ATM | ATM+ Cloxacilline | CPO | CPO+ Cloxacilline |
| I 63 | <i>E.cloacae</i> | >128 | >64 | >128 | >64 | >128 | >64 | >128 | >64 |
| I 102 | <i>E.cloacae</i> | >128 | >64 | 128 | >64 | 128 | >64 | >128 | >64 |
| I 105 | <i>E.cloacae</i> | >128 | >64 | 64 | 32 | >128 | >64 | >128 | 64 |
| I 125 | <i>E.cloacae</i> | >128 | >64 | 64 | 32 | 128 | >64 | >128 | 64 |
| P 57 | <i>E.coli</i> | >128 | >64 | 128 | >64 | >128 | >64 | >128 | >64 |

Les résultats de la détermination des CMI, montrent une variabilité entre les souches et entre leurs réponses aux différents antibiotiques testés. Les valeurs des CMI sont comprises entre 32 µg/ml et 128 µg/ml pour les antibiotiques testés.

Toutes les souches représentent une CMI élevée pour CTX, CPO et ATM. A noter que la CMI de CTX + Cloxacilline, ATM + Cloxacilline et CPO + Cloxacilline est de 64 µg/ml. Par contre la CMI de CAZ est de 128 µg/ml pour trois souches (deux souches d'*E.cloacae* et une souche d'*E.coli*) et elle est de 64 µg/ml pour les deux autres souches d'*E.cloacae*. Par l'ajout de Cloxacilline leurs CMI sont devenues 64 µg/ml et 32 µg/ml respectivement.

Tableau N°XV : Concentrations minimales inhibitrices des *Acinetobacter baumannii* vis-à-vis des antibiotiques testés.

| Code | Antibiotiques | | | | | | |
|--------------|---------------|-------------------|------|-------------------|------|-------------------|-----|
| | CAZ | CAZ+ Cloxacilline | ATM | ATM+ Cloxacilline | TIC | TIC+ Cloxacilline | IPM |
| I 76 | 128 | >64 | >128 | >64 | >128 | >64 | 16 |
| P 55 | 128 | >64 | >128 | >64 | >128 | >64 | 16 |
| P 92 | >128 | >64 | >128 | >64 | >128 | >64 | 32 |
| P 93 | >128 | >64 | 128 | >64 | >128 | >64 | 32 |
| P 94 | >128 | >64 | >128 | >64 | >128 | >64 | >32 |
| P 95 | >128 | >64 | >128 | >64 | >128 | >64 | >32 |
| P 119 | >128 | >64 | >128 | >64 | >128 | >64 | >32 |
| P 120 | >128 | >64 | >128 | >64 | 128 | >64 | >32 |
| P 121 | >128 | >64 | >128 | >64 | >128 | >64 | >32 |

Toutes les souches représentent une CMI de 128 $\mu\text{g/ml}$ pour la CAZ, ATM et la TIC et lors de l'ajout de Cloxacilline leurs CMI sont devenues de 64 $\mu\text{g/ml}$. Les CMI de l'IPM sont de 16 $\mu\text{g/ml}$ pour la I 76 et I 55, pour le reste des souches présentent une CMI de 32 $\mu\text{g/ml}$.

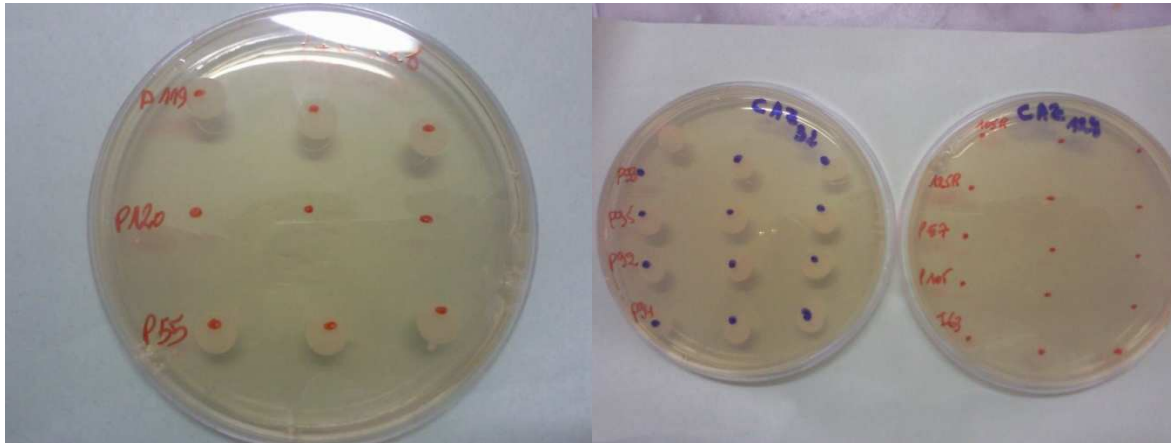


Figure 8 : Détermination des concentrations minimales inhibitrices.

V. Transfert des gènes par conjugaison

Aucun transfert n'a été obtenu pour les souches testées.

L'absence de transconjugants peut être expliquée par le fait que les plasmides portant le gène de résistance ne soient pas conjugatifs. En effet, même si, dans la majorité des cas, le gène *bla*CTX-M est porté par un plasmide conjugatif, certains plasmides portant ce même gène ne sont pas transférables. Le gène de résistance peut, cependant, être transféré par d'autres éléments mobilisables à savoir, les intégrons et les transposons (Corkill et *al.*, 2005 citer par Touati, 2008).

Nos résultats montrent que l'environnement inanimé entourant les patients peut être contaminé par des souches BGN multirésistantes et indiquent ainsi que les surfaces et les objets peuvent servir comme réservoir secondaires à la transmission croisée de ces souches. Par conséquent des mesures doivent être prises afin de limiter la transmission croisée de ces souches multirésistantes.

Au cours de notre étude, les 16 souches isolées ont été retrouvées multirésistantes aux antibiotiques dont les plus résistantes sont les souches d'*Acinetobacter*. Cette résistance touche des molécules très importantes, comme l'imipénème et l'amikacine rendant le traitement des infections par ces souches très difficile. Les mécanismes en cause pourraient être la production de BLSE chez les entérobactéries et la production de carbapénémases de type oxacillinases chez *A. baumannii*. Touati et al.(2008) ont rapporté des souches de *K. pneumoniae* et *E. coli* productrices de BLSE de type CTX-M isolées de l'environnement hospitalier de l'hôpital de Sidi-Aich, de même des souches d'*E. cloacae* productrices de BLSE de type CTX-M-15 isolées au niveau des surfaces de L'hôpital de Frantz Fanon (Touati et al.,2010).

Les études concernant la colonisation des patients avec les souches de BGN multirésistantes et leur propagation dans l'environnement hospitalier sont très limitées. Les études disponibles ne démontrent pas une grande présence de ces souches dans l'environnement de patients. Cela est vrai pour notre cas où uniquement 6.4% de prélèvements de surfaces sont positifs. Ce taux faible pourrait être expliqué par la faible viabilité des Gram négatifs en dehors de l'hôte (Lemmen et al., 2004)

Le taux faible d'isolement de souches de BGN résistantes au cours de notre étude est probablement lié au fait qu'au cours de cette étude, aucune épidémie à BGN n'a été déclarée au niveau des deux services étudiés et de ce fait, les souches isolées des échantillons de surfaces de l'environnement ont comme origine probable le patient lui-même. La transmission croisée de pathogènes Gram négatif a été rapportée pour être variable de 5 à 23% qui est très faible par rapport à *S. aureus* et entérocoques qui ont des taux de transmission supérieurs à 50% (Lemmen et al., 2004).

CONCLUSION

Conclusion

Cette étude a montré que les bacilles à Gram négatif sont omniprésents sur les surfaces inanimées de l'environnement hospitalier des services étudiés. Les résultats de cette étude attirent une attention particulière sur le degré de contamination des surfaces inanimées à proximité des patients.

Sur les 250 prélèvements effectués, 16 souches de bacilles à Gram négatif résistantes sont isolées et identifiées, dont 9 *Acinetobacter*, 6 entérobactéries et un *Pseudomonas aeruginosa*. Ces souches sont isolées de différentes surfaces à proximité des patients (draps, table de chevet, sanitaire) et du personnel (matériels et ustensiles).

Les souches de bacilles à Gram négatif montrent une multi-résistance vis-à-vis des antibiotiques testés par la production de BLSE chez les entérobactéries et probablement d'oxacillinases dans de cas *d'Acinetobacter baumannii* ou on observe une forte résistance au β -lactamines, chloramphénicol, rifampicine et tétracycline.

Ces résultats appuient l'hypothèse que les surfaces puissent servir de réservoirs de microorganismes multi-résistants dont l'identification peut être utile pour la prévention de la transmission d'agents pathogènes nosocomiaux et restent préliminaires et méritent d'être exploiter et compléter par :

- L'étude moléculaire pour déterminer les mécanismes impliqués dans cette résistance ;
- La détermination de l'évolution de la contamination des surfaces de l'environnement hospitalier dans le temps ;
- L'extension de la zone d'étude et l'augmentation du nombre de prélèvements pour une meilleure prévention de la dissémination ;
- L'élargissement de l'étude sur toute la flore environnementale pour inclure les bactéries Gram positives, afin de déterminer la place des bactéries multi-résistantes (BMR) parmi ces germes ;
- L'extension de l'étude sur d'autres composantes de l'environnement interne (air, eau) et externe (effluents) à l'hôpital pour mesurer la capacité d'adaptation de ces entérobactéries BLSE et la possibilité de transferts génétiques.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIES

Références bibliographiques

Abid F., Boutefnouchet N., Dekhil M. and Bouzerna N. (2007). *Klebsiella pneumoniae productrices de Beta-lactamases à spectre Elargi (BLSE) isolées dans les hôpitaux de la ville de Annaba, Algérie. Scientific Study & Research.* **3** (2) : 199- 214.

Alberti C., Bouakline A., Ribaud R. Lacroix C., Rousselot R., Leblanc T. and Derouin E. (2001) *Aspergillus* study group, Relationship between environmental fungal contamination and the incidence of invasive *Aspergillosis* in haematology patients. *Jornal of Hospital Infection* **48**,198-206.

Anaïssie E.J., Penzak S.R. and Dignani M.C. (2002). The hospital water supply as a source of nosocomial infections: a plea for action. *Arch. Int. Med.* 162, 1483-1492.

Bala H. (2004). Contamination, Disinfection, and Cross-Colonization: Are Hospital Surfaces Reservoirs for Nosocomial Infection?. *Clinical Infectious Diseases.* 39,1182–9.

Barbut F. and Neyme D. (2006). Les difficultés d'interprétation des contrôles microbiologiques environnementaux. *Revue Francophone des Laboratoires.* (382). 27-32.

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

Bhalla A., Pultz N.J., Gries D.M., Ray A.J., Eckstein E.C., Aron D.C. and Donskey C. J. (2004). Acquisition of nosocomial pathogens on hands after contact with environmental surfaces near hospitalized patients. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 25 (2):164-167.

Bonnet R. (2004). Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:1-14.

Boyce J. (2007). Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. *Jornal of Hospital Infection.* **65**, 50-4.

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

Cantón R, Coque TM. (2006). The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* 9:466-75.

Cantón R., Novais A., Valverde A., Machado E., Peixe L., Baquero F. and Coque TM. (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology Infection.* 14:144-153.

CA-SFM. (1995). Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

- CA-SFM. (2010).** Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
- Cavallo J., Antoniotti G., Baffo N. Y., Condras G. S., Hajjar J., Horn C., Le Gouhir C., Le Guyader A., Le jeune B., Mounier M. and Slomon V. (2002).** Surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé Air, eaux et surfaces. Ministère chargé de la santé, DGS/DHOS, CTIN. France. 70p.
- Dolan A., Bartlett M., McEntee B., Creamer E. and Humphreys H. (2011).** Evaluation of different methods to recover methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from hospital environmental surfaces. *Journal of Hospital Infection*. 79, 227-230.
- Floret N., Bertrand X., Thouverez M. and Talon D. (2009).** Infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa* : origine exogène ou endogène de la bactérie responsable ?. *Pathologie Biologie*. 57, 9–12.
- French G.L., Otter J.A., Shannon K.P., Adams N.M.T., Watling D. and Parks M.J. (2004).** Tackling contamination of the hospital environment by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) : a comparison between conventional terminal cleaning and hydrogen peroxide vapour decontamination. *Journal of Hospital Infection*. 57 : 31-37.
- Hirai Y. (1991).** Survival of bacteria under dry conditions: from a viewpoint of nosocomial infection. *Journal of Hospital Infection*. 19, 191–200.
- Hota B. (2004).** Contamination, Disinfection, and Cross-Colonization : Are Hospital Surfaces Reservoirs for Nosocomial Infection? *Clinical Infectious Diseases*. 39 : 1182-1189.
- Jarlier V., Nicolat M.H., Fournier G. and Philipon A. (1988).** Extended-broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to new β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Review infection diseases*. 10: 867-878.
- Kac G., Podglajen I., Vaupré S., Colardelle N., Buu-Hoï A. and Gutmann L. (2004).** Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated from environmental and clinical specimens in a cardiac surgery intensive care unit. *Infection Control Hospital Epidemiology*. 25 (10) : 852-855.
- Lalande V., Barhut E., Varnerot A., Febvre M., Nesa D., Wadel S., Vincent V. and Petit J.C. (2001).** Pseudo-outbreak of *Mycobacterium gordonae* associated with water from a refrigerated fountain. *Journal of Hospital Infection*. 48, 76-79.
- Lemmen S.W., Hafner H., Zoldann D., Stanzel S. and Lutticken R. (2004).** Distribution of multi-resistant Gram-negative versus Gram-positive bacteria in the hospital inanimate environment. *Journal of Hospital Infection*. 56, 191-197.
- Liassine N. (2000).** Problème des pathogènes Gram négatif résistants aux antibiotiques en

milieu hospitalier. *Schweiz Med Wochenschr.* 130 : 1930-6.

Lidwell O.M., Lowburry O.J., Whyte W., Blowers R., Stanley S.J. and Lowe D. (1983). Airborne contamination of wounds in joint replacement operations the relationship to sepsis rate. *Journal of Hospital Infection.* 4, 111-131.

Livermore D.M., Canton R., Gniadkowski M., Nordmann P., Rossolini G.M., Arlet G., Ayala J., Coque T.M., Kern-Zdanowicz I., Luzzaro F., Poirel L. and Woodford N. (2007). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 59:165-74.
Livermore D.M. (2008). Defining an extended-spectrum β -lactamase. *Clinical Microbiology Infection.* 14:3-10.

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

Paterson D.L. and Bonomo R.A. (2005). Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Review.* 18:657-86.

Ploy M. C., Gassama A., Chainier D. and Denis F. (2005). Integrons: An antibiotic resistance gene capture system. *In Immuno-Analyse et Biologie Specialisee.* 20: 343-352.
Quesnel C. (1998). Prelevement de surface. In. Contrôle microbiologiques en hygiène hospitalière. Conseil pratique. *CCLIN Sud-Ouest.* Version 1. Pp. 2-7.

Rossolini G.M., D'Andrea M.M. and Mugnaioli C. (2008). The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Clinical Microbiology Infection.* 14(Suppl. 1):33-41.

Rundstadler Y. and Di majo P. (2002). Lutter contre la contamination au bloc opératoire. *Ingénierie biomédicale.* 23 : 180- 185.

Sergent A.-P., Slekovec C., Pauchot J., Jeunet L., Bertrand X., Hocquet D., Pazart L. and Talon D. (2012). Bacterial contamination of the hospital environment during wound dressing change. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research.*

Saïdani M., Boutiba I., Ghazzi R., Kammoun A. and Ben Redjeb S. (2006). Profil bactériologique des bactériémies à germes multirésistants à l'hôpital Charles-Nicolle de Tunis. *Med Mal Infect.* 36 : 163–16.

Stout J.E. (1997). Legionellosis. *N. Engl. J. Med.* 337, 682-687.

Touati A. (2006). Caractérisation des phénotypes de résistance des entérobactéries aux β -lactamines, isolées en milieu hospitalier; cas de deux hôpitaux de la wilaya de Bejaïa. Thèse de doctorat. Université A. MIRA de Bejaïa. 86p.

Touati A., Lucien B., Benallaoua S., Gharout A., Madoux J. and De Champs C. (2008). First report of qnrB-producing *Enterobacter cloacae* and qnrA-producing

Acinetobacter baumannii recovered from Algerian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 60 : 287-290.

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.

Weber David J., MD, MPH, Rutala William A., PhD, MPH, Miller Melissa B., PhD, Huslage K., RN, BSN, MSPH, and Sickbert-Bennett E., MS. (2010). Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: Norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. *American Journal of Infection Control.* 38:S25-33.

Weldhagen GF., Poirel L. and Nordmann P. (2003). Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother.* 47:2385-92.

Yong D., Lee k., Yum J.H., Shin H.B., Rossolini G.M. and Chong Y. (2002). Imipenem-EDTA Disk method for differentiation of Metallo β -lactamase-producing Clinical Isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* *Journal of Clinical Microbiology.* 40 (10):3798-3801.

ANNEXES

**Annexe 1 : Composition des milieux de culture (pour 1l d'eau distillée)
(Le Minor et Richard, 1993)**

Gélose Mac Conkey

| | |
|--------------------------------|---------|
| Peptone de caséine..... | 17 g |
| Peptone de viande..... | 03 g |
| Lactose..... | 10 g |
| Mélange de sels biliaires..... | 01,5 g |
| Rouge neutre..... | 0,03 g |
| Chlorure de sodium..... | 05 g |
| Cristal violet..... | 0,001 g |
| Agar..... | 10 g |

pH 7,4

Mueller Hinton

| | |
|---------------------------------|--------|
| Infusion de viande de bœuf..... | 3.00g |
| Hydrolysât de caséine..... | 17,5 g |
| Amidon..... | 1,5 g |
| Agar..... | 17 g |

pH 7,4

Bouillon nutritif

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

pH 7,3

Annexe 2 : Réactifs utilisés

Réactif de Kovacs

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

Réactif de TDA

| | |
|---|------|
| Soluté de perchlorure de fer $FeCl_3$ | 10ml |
| Eau distille | 20ml |

Rouge de méthyle

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

Réactif de Voges-Proskauer (VPI)

| | |
|-----------------------------|-------|
| α Naphtol..... | 6g |
| Alcooléthylique a 90% | 100ml |

Réactif de Voges-Proskauer (VPII)

NaOH 4N

Réactif de Griess I (NRI)

| | |
|------------------------------|----|
| Acide parasulfanilique | 8g |
| Acide acétique 5N | 1L |

Réactif de Griess (NRII)

| | |
|------------------------------|----|
| α -naphtylamine | 6g |
| Acide acétique 5N..... | 1L |

Tableau XVIII : Résultats de la galerie API20E.

| Code des souches | Codes des galeries API20E | Espèces identifiées |
|------------------|---------------------------|-----------------------------|
| I 63 | 3305573 | <i>Enterobacter cloacae</i> |
| I 102 | 3305573 | <i>Enterobacter cloacae</i> |
| I 105 | 3305573 | <i>Enterobacter cloacae</i> |
| I 125 | 3305573 | <i>Enterobacter cloacae</i> |
| P 57 | 5144152 | <i>Escherichia coli</i> |
| P 54 | 3305573 | <i>Enterobacter cloacae</i> |



Figure 9 : Galerie API20E correspondant à *Enterobacter cloacae*.

| TUBE | RÉACTIONS | | COMMENTAIRES |
|---|-------------------------|----------------------------|---|
| | POSITIVE | NÉGATIVE | |
| ONPG | Jaune | Incolore | Une teinte jaune pâle est souvent obtenue, la considérer comme une réaction négative. |
| ADH | Rouge ou orange | Jaune | |
| LDC | Rouge ou orange | Jaune | |
| ODC | Rouge ou orange | Jaune | |
| CIT | Turquoise ou bleu foncé | Vert pâle ou jaune | La lecture se fait dans la partie supérieure de la cupule (en aérobie). |
| H ₂ S | Dépôt noir | Aucun dépôt noir | |
| URE | Rouge ou orange | Jaune | |
| TDA | Brun-rouge | Jaune | Ajouter 1 goutte de chlorure de fer à 10%. Lire immédiatement la réaction. |
| IND | Anneau rouge | Jaune | Ajouter 1 goutte du réactif de James. Lire la réaction immédiatement. |
| VP | Rose foncé ou rouge | Incolore ou rose pâle | Ajouter 1 goutte de KOH à 40% puis 1 goutte d'alpha-naphthol à 6%. Lire la réaction après 10 minutes. |
| GEL | Diffusion du pigment | Aucune diffusion, incolore | La répartition des particules solides à travers la cupule doit être considérée comme une réaction négative. |
| GLU MAN INO SOR RHA SAC MEL AMY ARA | Jaune | Bleu ou bleu-vert | La fermentation des sucres commence dans la partie la plus anaérobie du microtube (partie inférieure). Il faut lire ces réactions à partir de la base de la cupule vers le haut. Une couleur jaune au fond indique une réaction positive. |

Figure 10 : Lecture et interprétation des résultats de galerie API20E

Annexe 4 :Préparation de la solution d'EDTA (Young et al.2002)

La solution d'EDTA à 0.5 M est préparé par dissolution de 189.1 g de poudre d'EDTA-2H₂O disodique dans 1 000 ml d'eau distillée, puis ajustée au pH 8.0 utilisant une solution de NaOH et stérilisés par autoclavage.

Résumé

Objectif : Caractérisation des phénotypes de résistances des souches de bacilles Gram négatif isolés des surfaces de l'environnement hospitalier de l'hôpital Frantz Fanon.

Méthode : 250 prélèvements ont été effectués à partir de l'environnement hospitalier de deux services de l'hôpital Frantz Fanon. L'isolement a été fait sur gélose Mac Conkey additionnée de ceftazidime (2 µg/ml) et de vancomycine (8 µg/ml). Les souches sélectionnées ont été identifiées et testées vis-à-vis de 19 antibiotiques de différentes familles. Les phénotypes de résistance aux β-lactamines ont été étudiés.

Résultats : 16 souches de BGN résistantes à la céftazidime ont été identifiées incluant 9 souches d'*Acinetobacter baumannii*, 4 souches *Enterobacter cloacae*, une souche d'*Escherichia coli* et une souche de *Pseudomonas aeruginosa*. L'étude de la sensibilité de ces souches vis-à-vis du céfotaxime, céftazidime, céfépime et imipénème a permis de déduire les phénotypes suivants : 4 souches (3 *E. cloacae*, 1 *E. coli*) BLSE, 1 *P. aeruginosa* et 1 *E. cloacae* hyperproductrices de leur AmpC chromosomiques et 9 souches *A. baumannii* résistantes à l'imipénème produisant de carbanémases.

Mots clés : Environnement hospitalier, bacilles Gram négatif, BLSE, carbapénemase.

Abstract

Objective: The aim of this study is the characterization of resistance phenotypes of Gram negative bacilli stain isolate from hospital environment of Frantz Fanon hospital.

Methodology: 250 samples were obtained from 02 different wards of Frantz Fanon hospital. Isolation was performed on Mac Conkey agar supplemented with 2 µg/ml of Ceftazidime and 8 µg/ml of vancomycine. The selected strains were identified and their susceptibility was tested against 19 antibiotics. Their resistance phenotypes were determined.

Results : 16 ceftazidime resistant BGN stains were identified including 09 *Acinetobacter baumannii*, 04 *Enterobacter cloacae*, 01 *Pseudomonas aeruginosa* and 1 *Escherichia coli* strain. These were resistant to CTX, CAZ FEP and isolates of *A. baumannii* were also resistant to IMP. Resistance phenotypes included ESBL, hyperproduction of AmpC and carbapenemases production.

Key words: Hospital environment, Gram negative bacilli, ESBL, carbapenemase.