

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences biologiques
Option : Microbiologie Moléculaire et Médicale



Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

*Criblage de souches de bacilles à Gram négatif
résistants aux -lactamines isolées de
l'environnement hospitalier du CHU de Khelil
Amran de Béjaïa*

Présenté par :

Hezouat Souad & Khane Aïcha

Soutenu le : **15 Juin 2016**

Devant le jury composé de :

Mme. Tafoukt R
Mme. Belhadi K
Mme. Gharout A

MAA
MAA
MCB

Président
Encadreur
Examineur

Année universitaire : 2015 / 2016

Remerciement

Avant tout nous remercions "Allah" tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nous tenons à remercier notre promotrice M^{me} Belhadî K pour nous avoir acceptés d'encadrer notre travail, pour sa rigueur scientifique, pour son assistance bien matérielle que morale, pour son aide et son soutien.

Nous tenon à exprimer notre gratitude, notre profond respect et notre remerciement aux membres de jury : M^{me} Tafoukt R et M^{me} Gharout qui ont accepté de faire partie de ce jury et d'examiner ce travail et consacré de leur temps pour son évaluation.

*Nos remerciements s'adressent également à :
M^r Touati A., M^r Belhadî D et M^{me} Rahmani pour leurs aide et leurs disponibilité au long de notre stage pratique.*

Notre gratitude s'adresse à tout le personnel de CHU de Béjaïa pour leur aide et leurs encouragements

Ces remerciements ne seront pas complets sans associés toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail, fruit de mes études

A

Mes très chers parents

*Pour leur amour, leurs encouragements et soutien sans faille
Je les remercie de m'avoir accompagnée tout au long de mon parcours*

*Mes frères et sœurs, leurs amours, leurs encouragements et leurs
générosités sans cesse.*

*Tous mes amis : Safa, Awatif, Soumia, Manel, Imane, Hadjer, Zahra,
Chahra et Fatima*

*Mes collègues du laboratoire : Khouloud, Sihem, Mouna, Hanane,
Sabrina et Hania pour les moments Inoubliables passés ensemble et
pour leur soutien.*

Ma binôme Aïcha et toute sa famille

Mon encadreur M^{me} Belhadî Karima

*Tous les étudiants de la promotion de microbiologie moléculaire et
médicale sans exception*

*Tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à la réalisation de ce
mémoire*

A tous mes proches, et tous ceux qui m'aiment.

SOUAD

Dédicace

J'ai le grand honneur de dédier ce travail

A

*Mes chères parents
pour leur amour, leur encouragement, les sacrifices
consentis.*

*Mon frère et Mes sœurs,
Que ce travail les incite à mieux faire et qu'il soit un faible
témoignage de l'affection de leur grande sœur*

Mon grand père, et ma grande mère

*Mes amies : Hadjer, Asma, Mouna, Mounira,
Ilhem, Tinhinen, Nadia, Habiba, Rokia,
Merieme,*

Ma chère binôme Souaed et sa famille

*Mes collègues de laboratoire : Sihem, Hanan, Nadia,
khoulod, Fatima.*

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

Aicha

Liste des abréviations

AB : Acide boronique

AMC : Amoxicilline + Acide clavulanique

AmpC : Chromosomal located céphalosporinase

ARN : Acide ribonucléique

ATB : Antibiotique

ATM : Aztréonam

BGN : Bacille à Gram négatif

BGNnF : Bacille à Gram négatif non fermentaire

BLSE : -lactamase à spectre élargi

BMR : Bactérie multirésistante

C2G : Céphalosporines de 2^{ème} génération

C3G : Céphalosporines de 3^{ème} génération

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

CAZ : Ceftazidime

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

CT : Colistine

CTAB : CetylTrimethyl Ammonium Bromide

CTX : Céfotaxime

CTX-M : Céfotaximase-Munich

EDTA : Éthylène-diamine-tétra-acétique

ETP : Ertapénème

EUCAST : European committee on antimicrobial susceptibility testing

FOX : Céfoxitine

GES : Guyana Extended Spectrum bêta-lactamase

GLU : Glucose

H₂S : Sulfure d'hydrogène

I : Intermédiaire

IMP : Imipénème

Imp : imperméabilité

IN : Infection Nosocomiale

IND : Indole

KPC : *Klebsella pneumoniae* carbapénémases

MBL : Métallo- -lactamase

MH : Mueller-Hinton

NaCl : Chlorure sodium

NDM : New Delhi metallo-bêta-lactamase

NR : Nitrate réductase

OXA : Oxacilline

R : Résistant

RM : rouge de méthyle

SHV : SulfiHydroxyl Variable

TEM : Temnoniera

TOB : Tobramycine

TSI : Triple Sugar Iron

UFC : Unités formant colonie

URE : Uréase

VANC : Vancomycine

VIM : Verona Integron encoded Metallo-bêta-lactamase

Liste de tableaux

Tableaux N°I : Les différents sites de prélèvements.....	06
Tableaux N°II : Les tests d'identification biochimique.....	08
Tableaux N°III : Les antibiotiques testés.....	09
Tableaux N°IV : Intèrprétation de résultat de Carba NP test.....	12
Tableaux N°V : Intèrprétation des résultat de la méthode de disques combinés.....	13
Tableaux N°VI : Nombre de prélèvements et de souches isolées par sites.....	14
Tableaux N°VII : Profil de sensibilité aux antibiotiques.....	17
Tableaux N°VIII : Nombre de souches productrices de carbapénémases.....	21
Tableaux N°IX : Phénotypes probables de résistance aux carbapénèmes.....	22

Liste des tableaux des annexes

Tableau N°I : sites de prélèvements des souches isolées au niveau du CHU de Béjaia
Tableau N°II : Résultats d'identification biochimique des entérobactéries par la galerie
Tableau N°III : Résultats de Hodge test et carba NP test des souches testées
Tableau N°IV : Diamètres des disques combinés (test des inhibiteurs)

Liste de figures

Figure 1 : Disposition des disques combinés.....	12
Figure 2 : La répartition des souches en fonction d'espèce	15
Figure 3 : Répartition des souches selon la nature de prélèvements	15
Figure 4 : Nombre de souches non fermentaires résistantes aux antibiotiques	16
Figure 5 : Taux de résistance de souches d'entérobactéries aux antibiotiques testés	19
Figure 6 : Résultats de DD-test sur gélose MH additionné de cloxacilline	20
Figure 7 : Résultats positif de la production de carbapénémase	21

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction1

Matériel et méthodes

I.Prélèvements	6
I.1. Prélèvement de surfaces	6
I.2. Prélèvement de l'air	7
I.3. Prélèvement des effluents	7
II. Isolement et purification	7
III. Identification	7
IV. Etude de la sensibilité aux antibiotiques	9
V. caractérisation de phénotypes de résistance	10
V.1. Recherche de la production de BLSE	10
a. DD-Test ou test de synergie	10
b. DD-Test à la cloxacilline	10
V.2. Recherche des carbapénémases	10
a. Le test de Hodge	10
b. Carba NP test	11
c. Méthode des disques combinés (test des inhibiteurs)	12

Résultats

I. Répartition des prélèvements par site	14
II. Identification des souches bactériennes	15
II.1. répartition des souches par groupes bactériennes et par espèces	15
II.2. Répartition des souches selon le site de prélèvement	16
III. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques	17
III.1. Résistance des souches non fermentaires aux antibiotiques	18
III.2. Résistance des entérobactéries aux antibiotiques testées	19
IV. Détermination des phénotypes de résistance aux β -lactamine	20
IV.1. Production de BLSE	20
IV.2. Production de carbapénémase	20
a. Hodge test et Carba NP test	20
b. Test des inhibiteurs	21

Discussion

Conclusion	27
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction

Le terme environnement hospitalier regroupe habituellement les surfaces, l'eau, l'air, le linge, les aliments, les dispositifs médicaux et les déchets (**Saouide el ayne et al., 2014**). À l'hôpital, les surfaces susceptibles d'entrer en contact avec le patient soit directement, soit indirectement par l'intermédiaire de dispositifs médicaux ou les mains des personnes peuvent constituer des réservoirs des microorganismes (**Rouillon et al., 2006**). Cette contamination varie qualitativement et quantitativement dans le temps, d'un établissement à un autre et, au sein d'un même établissement, en fonction des services, des patients, des soins et des techniques pratiqués (**Talon., 1999**).

La diffusion des infections nosocomiales provient souvent de la contamination croisée, les moyens les plus communs de transfert des pathogènes se produisent entre les mains de personnel de santé et les patients (**Drees et al., 2008**). Cependant, l'environnement de l'hôpital peut contribuer à la diffusion de ces pathogènes. En effet, il a été constaté que, dans des situations endémiques et épidémiques, il y a une contamination environnementale et un transfert des bactéries entre les patients et l'environnement (**Oliveira et al, 2010**).

Le rôle de l'environnement hospitalier inanimé (les surfaces) dans la propagation de l'infection nosocomiale est controversé. En outre, la découverte des agents pathogènes dans l'environnement hospitalier, bien que nécessaire, n'est pas suffisante pour prouver un rôle causal dans la pathogenèse d'infection nosocomiale (**Hota, 2004**).

Les surfaces environnementales Contaminées qui sont plus touchés par les patients et / ou le personnel peuvent être une source de transfert par la main. La distribution de cette contamination et l'isolement de souches multiples suggèrent que l'environnement peut être une source importante d'infection croisée (**French et al., 2004**). Cependant, plusieurs travaux ont démontré que les microorganisme pathogènes nosocomiaux sont excrétés par les patients et peuvent contaminer les surfaces en milieu hospitalier à des concentrations suffisantes pour la transmission, peuvent survivre pendant de longues périodes, peuvent persister malgré la désinfection, et peuvent être transférés via les mains du personnel soignant (**Otter et al., 2011**).

Les bactéries attachées à une surface inerte ou vivante et enveloppées dans une matrice, forment un biofilm qui protège les bactéries et leur permet de survivre dans des conditions environnementales hostiles. De plus, les bactéries qui vivent à l'intérieure d'un biofilm sont généralement moins sensibles aux antibiotiques et aux désinfectants (**Amiyare et al., 2015**).

Les effluents non traités générés par les activités hospitalières peuvent contribuer largement à la dissémination des bactéries multirésistantes (BMR) dans l'environnement. Les BMR des effluents proviennent essentiellement soit des produits biologiques (sang, urines, pus etc.) des patients colonisés, soit du transfert horizontal de gènes de résistance entre les souches multi-résistantes infectieuses et les souches environnementales (**Thomas et al., 2007**). Ces BMR généralement responsables des infections nosocomiales peuvent se retrouver dans l'environnement en particulier dans les eaux de surface et être impliquées dans les infections communautaires (**Guessennd et al., 2013**).

Les bacilles à Gram négatif occupent une place très importante parmi les microorganismes responsables d'infections nosocomiales. Ces pathogènes appartiennent à différentes familles bactériennes représentées majoritairement par les entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*...etc.), et les bacilles à Gram négatif non fermentaires (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*...) (**Liassine, 2000**).

L'émergence de la résistance aux antibiotiques se traduit dans la pratique hospitalière par une augmentation de la morbidité et parfois de la mortalité, ainsi que des coûts d'hospitalisation. De nombreux facteurs, parmi lesquels la pression de sélection antibiotique et la transmission croisée de certaines espèces hospitalières, favorisent les infections à germes multirésistants (**Bertrand et al., 2003**).

Parmi les β -lactamases, on distingue 4 classes selon le schéma d'Ambler A, B, C et D. Les enzymes de classe A, C et D sont dites à sérine active tandis que celles de classe B sont appelées métallo- β -lactamases (carbapénèmases) (**Cattoir, 2008**).

Les β -lactamases à spectre élargi (BLSE) sont une grande famille très hétérogène d'enzymes bactériennes. Elles sont induites soit par des plasmides, soit par des mutations des gènes naturellement présents chez certain espèces. Les deux mécanismes confèrent aux

bactéries touchées la capacité d'hydrolyser une grande variété de pénicillines et de céphalosporines (Vora et al., 2009).

La distinction des différents types de BLSE (TEM (*Temoneria*), SHV (*sulphydral variable*) et CTX-M (*CefoTaXime Munich*)) permet une analyse détaillée de la propagation épidémiologique. Ces différentes enzymes appartiennent aux bêtalactamases de classe A et sont habituellement détectées par une synergie entre une céphalosporine de troisième génération et l'acide clavulanique (aspect en «bouchon de champagne» sur un antibiogramme) (Cherkaoui et al., 2014).

Les BLSE de type OXA diffèrent de celle de la classe A par le fait qu'elles appartiennent à la classe D et au groupe 2d de Bush et Jacoby (Bush et al., 1995). Contrairement à ce qui est observé chez les BLSE de la classe A qui sont produites le plus souvent par les entérobactéries, les BLSE de type OXA sont en grande majorité détectées chez *P. aeruginosa*. Plus d'une dizaine de ces enzymes ont été mises en évidence et la majorité provient de OXA-10 et OXA-2 par mutation d'un ou de plusieurs acides aminés (Bradford, 2001).

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

Depuis 1996, les souches de *K. pneumoniae* productrices les carbapénémases de type KPC ont été décrites, d'abord aux Etats-Unis, puis ont rapidement disséminé dans de nombreuses régions du monde. Le plus souvent, les bactéries qui produisent des enzymes de type KPC expriment également d'autres β -lactamases, dont de nombreux types de BLSE, et possèdent un certain degré de résistance par imperméabilité de la paroi. Ces bactéries sont essentiellement responsables d'infections nosocomiales. De nos jours, les carbapénémases de type KPC ont été décrites dans plusieurs espèces d'entérobactéries mais également chez *P. aeruginosa* et *A. baumannii* (Cherkaoui et al., 2014).

Les enzymes de type VIM et IMP qui représentent la majorité des Métallo-β-lactamases ont été rejointes en 2008 par une nouvelle enzyme appelée NDM-1 (New Delhi metallo-β-lactamase 1). La plupart des souches productrices de M L sont des *K. pneumoniae* multirésistantes acquises dans les établissements de soins. Très récemment, l'apparition de nouveaux variant de NDM- 1, nommés NDM-2 et NDM-4 ont été décrites. NDM-2 a pour particularité d'atteindre les souches d'*A. baumannii* épargnées jusqu'alors par NDM-1. Ce variant a été décrit en Egypte et au Moyen Orient. NDM-4 a été détectée chez *E. coli* (**Boutet-Dubois et al., 2012**).

Les β-lactamases à serines (carbapénémases de type oxacillinase) de la classe D sont caractérisées par l'hydrolyse efficace de toutes les β-lactamines y compris les monabactames habituellement inhibées par le chlorure de sodium (NaCl). La première oxacillinase OXA-23 a été décrite en 1993 chez une souche d'*A.baumannii* multi-résistante (**Mansour et al., 2008**).

D'autre enzymes de ce type ont été rapportées telles que OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-40 et OXA-58. L'analyse des supports génétiques des gènes codant pour ces enzymes a montré une localisation chromosomique dans la plus part des cas mais une localisation plasmidique a été démontrée pour le gène codant les enzymes OXA-23 et OXA-58 (**Decré., 2012**).

La colistine appartient au groupe de polymyxines. Les antibiotiques de ce groupe ont une structure polypeptidique présentant une activité essentiellement bactéricide et un spectre antibactérien moyen, qui couvre uniquement des micro-organismes à Gram négatif (**CVMP, 2015**).

La colistine a été commercialisée en 1958, L'administration parentérale de la colistine a été abandonnée dans certains pays durant les 30 dernières années à cause de sa néphrotoxicité et de sa neurotoxicité (**Mokrani et al., 2014**). En réanimation, cet antibiotique revient en première ligne pour le traitement des infections à *Acinetobacter baumannii* et à *Pseudomonas aeruginosa* multirésistants (**Frasca et al., 2008**).

La surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé est un sujet qui s'intègre dans l'actualité de la prévention des infections nosocomiales avec l'impact médiatique lié aux épidémies récentes d'infections impliquant des bactéries environnementales dont certaines sont multirésistantes, notamment les bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*,

Burkholderia cepacia, *Legionella pneumophila* ou les mycobactéries atypiques (**Cavallo et al., 2002**).

L'objectif de notre étude est d'évaluer le degré de la contamination de trois composants de l'environnement hospitalier (surfaces, air et effluents) et la caractérisation de phénotypes de résistance aux β -lactamines des bacilles à Gram négatif isolées au niveau du CHU Khilil Amran de Béjaia. Pour cela nous avons adopté la méthodologie suivante :

- ✓ Prélèvements de surfaces, d'air et des effluents
- ✓ Isolement et identification des bacilles à Gram négatif.
- ✓ Détermination des mécanismes de résistances aux β -lactamines.

*Matériel et
Méthodes*

Cette étude est réalisée au niveau de laboratoire de microbiologie de l'université A/ Mira de Bejaia durant une période allant de février à mai 2016.

I-Prélèvements :

Des prélèvements de surfaces et de l'air ont été effectués au niveau du service de réanimation ainsi que des prélèvements d'effluents hospitalier au niveau de la station d'épuration du CHU de Khelil Amran de Bejaia.

Tableau N°I : Les différents sites de prélèvements au niveau du CHU Khelil Amran de Bejaia

Salles	Date de prélèvements	Sites de prélèvements	Nombres de prélèvements
Chambre B1	08/02/2016	Poignées de portes, interrupteurs,	07
Chambre B2		tables de chevet, chaises, draps,	16
Chambre B3		bordures des lits, téléphone, pailleuse,	15
Chambre B4		multiprises, poignées des fenêtres,	06
Couloire		chariot d'urgence, radiateurs,	12
Sanitaire		climatiseur, parafeurs, bureau,	03
Salle de médecins		étagères, tableau d'affichage,	09
Salle de nettoyage		tuyauterie d'aspiration, stéthoscope,	02
Chambre A1	23/02/2016	piège d'eau d'aspirateur, barboteur	06
Chambre A2		d'oxygène, ballon de réanima, pince,	06
Chambre A3		matériels d'intubation, laryngoscope,	04
Chambre A4		défibrillateur, brancard d'urgence,	05
Chambre A5		brassard à tension, seringue électrique,	03
Chambre A6		potence, distributeur de désinfectant,	02
Couloire		cuvette, manche, ordinateur de	02
Sanitaire		médecins, casier, Bétadine en solution.	02
Air	08/02/2016 09/02/2016	Chambre A1, A2, A3, A4, A5, A6, B1, B2, B3, B4, couloire, salle de soins, salle des médecins.	16
Effluents	16/03/2016	Station d'épuration	04
Total			120

I.1. Prélèvement de surfaces :

Les prélèvements de surfaces sont effectués par la méthode d'écouvillonnage qui consiste à frotter une surface de 25 cm² avec un écouvillon stérile préalablement humidifié dans un bouillon nutritif. L'écouvillon est immédiatement réintroduit dans le bouillon nutritif et acheminer au laboratoire de microbiologie de l'université A/Mira de Béjaia puis incubé à 37 °C pendant 24 à 48 heures (**French et al., 2004**).

I.2. Prélèvement de l'air :

Les prélèvements de l'air ont été effectués par la méthode de sédimentation en laissant des boîtes contenant la gélose Mac Conkey ouvertes pendant 4h pour permettre à la flore de l'air de sédimenter. Les boîtes sont acheminées au laboratoire de Microbiologie de l'Université A/Mira de Béjaïa puis incubées à 37°C pendant 48h (**Merah, 2009**).

I.3. Prélèvement des effluents :

Les échantillons d'eau hospitalier sont prélevés au niveau du collecteur principal des eaux usées de l'hôpital dans des flacons de 250 ml en verre stérile et transportés dans une glacière au laboratoire où ils ont été soumis immédiatement à l'analyse bactériologique (**Ameziane et al., 2013**).

II-Isolement et purification

À partir du bouillon nutritif présentant un trouble après 24 heures d'incubation, on ensemence deux géloses Mac Conkey déjà préparées :

- ✓ La première additionnée de 0.5 µg/ml d'ertapénème pour sélectionner les bacilles Gram négatifs résistants aux carbapénèmes et de 16 µg/ml de vancomycine pour éliminer les bactéries à Gram positif.
- ✓ La deuxième additionnée de 4 µg/ml de colistine pour sélectionner la résistance à la colistine et de 16 µg/ml de vancomycine. 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 pour purification et conservation.

III-Identification

L'identification des souches isolées est réalisée en tenant compte des caractéristiques morphologiques selon l'aspect des colonies sur gélose Mac Conkey (couleur, taille, forme) et de la coloration de Gram ainsi que l'utilisation d'une galerie biochimique classique (TSI, citrate de Simmon, bouillon nitraté, Clark et Lubs, eau peptonée exempt d'indole, Urée)

(Tableau N°2). La croissance à 44 °C est confirmée pour les souches d'*Acinetobacter baumannii*.

Tableau N°II : Les tests d'identification biochimique

Milieu	Mode d'ensemencement	Caractères recherchés	Résultats
TSI	Ensemencement par des colonies bactériennes de la pente de la gélose par des stries serrées, puis le culot par pique profonde et centrale. Incubation à 37 °C/ 24h.	-Fermentation du glucose - Fermentation du lactose -Production de gaz -Production d'H ₂ S	Lactose + : virage au jaune de la pente. Glucose + : virage au jaune du culot. Gaz + : apparition de bulles d'air. Production d'H₂S : noircissement du milieu.
Citrate de Simmon	Ensemencement par stries séries de la pente. Incubation à 37 °C/24h	-Utilisation du Citrate comme une seule source de carbone	Citrate + : virage de la couleur verte au bleu due à une l'alcalinisation.
Bouillon nitraté	Ensemencement du bouillon à partir de la suspension bactérienne. Incubation à 37 °C/ 24h.	-Réduction des nitrates en nitrite	Nitrate réductase + : virage au rouge après l'ajout des deux réactifs NRI et NRII. Nitrate réductase - : incolore
Clark et Lubs	Ensemencement du milieu avec quelques gouttes de la suspension bactérienne, puis incubée à 37 °C pendant 24h.	- Mise en évidence des voies fermentaire	VP + : couleur rouge cerise après l'ajout du VPI et VPII RM + : couleur rouge après l'ajout du réactif RM.
Eau peptoné exempt d'indol	L'ajout de quelques gouttes de la suspension bactérienne au milieu. Incubation à 37 °C/24h.	-Production d'indole	Indole + : apparition d'un anneau rouge en surface après ajout de réactif Kovaks.
Urée	L'ajout de quelques gouttes de la suspension bactérienne au milieu. Incubation à 37°C/24h.	-Présence de l'uréase	Uréase + : virage de la couleur du milieu au rose cerise.

IV-Etude de la sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques est testée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations définies par CA-SFM et EUCAST (2013, 2015). Les différents antibiotiques testés sont présentés dans le tableau N°III.

Tableau N°III : Antibiotiques testés

Antibiotique	Symbole	Charge (µg)	Sensible (S)	Résistant (R)	Familles	Marque
Tobramycine	TOB	10	>17	<14	Aminoside	Bioanalyse®
Céfoxitine	FOX	30	>19	<15	C2G	Bioanalyse®
Céftazidime	CAZ	30	>22	<19	C3G	HIMEDIA
Cefotaxime	CTX	30	>23	<15	C3G	HIMEDIA
Colistine	CT	50	>16	<13	Polymyxine	Bioanalyse®
Ertapénème	ERT	10	>25	<22	Carbapénème	Bioanalyse®
Imipénème	IPM	10	>22	<16	Carbapénème	HIMEDIA
Aztréonam	ATM	30	>24	<21	Monobactame	Bioanalyse®
Amoxicilline+ clavulanate	AMC	30	>19	<19	Aminopénicilli ne	HIMEDIA

IV.1. Préparation de l'inoculum et ensemencement des boîtes :

A partir d'une culture jeune, une suspension bactérienne est préparée en dissociant 4 à 5 colonies dans 4 ml d'eau physiologique stérile (10^8 UFC/ml). Des boîtes de Mueller Hinton sont ensemencées avec cette suspension bactérienne par écouvillonnage puis les disques d'antibiotiques sont déposés sur les boîtes à l'aide d'une pince puis incubées à 37 °C pendant 24h.

IV.2. Lecture :

Les différents diamètres des zones d'inhibition sont mesurés pour chaque antibiotique. L'interprétation en Sensible (S), Intermédiaire (I) ou Résistant (R) a été faite selon les critères définis par CA-SFM et EUCAST (2013, 2015).

V-Caractérisation de phénotypes de résistance

V.1. Recherche de la production de BLSE

a- DD-Test ou test de synergie

La recherche de la production d'une β -lactamase à spectre étendue (BLSE) est réalisée uniquement pour les entérobactéries résistantes aux céphalosporinases de 3^{ème} génération : cefotaxime (CTX) et/ou ceftazidime (CAZ).

La production d'une BLSE est détectée par le test de la synergie qui consiste à placer des disques de ceftazidime (CAZ), cefotaxime (CTX) et aztréonam (ATM) à une distance de 15 mm (centre à centre) d'un disque combiné d'amoxicilline et d'acide clavulanique (AMC). L'augmentation de la zone d'inhibition entre le disque d'AMC, C3G (CTX, CAZ) et/ou aztréonam (ATM) indique la production d'une BLSE (**Jarlier et al., 1988**).

b- DD-Test à la Cloxacilline (250µg/ml)

Chez les souches naturellement productrices de céphalosporinase et chez les souches productrices de céphalosporinases plasmidiques, la présence d'une BLSE peut être masquée du fait de l'induction de la céphalosporinase par l'acide clavulanique. Ces souches ont été testées vis-à-vis du céfotaxime et ceftazidime en utilisant la gélose MH additionnée de la cloxacilline (250 µg/ml). La comparaison des diamètres d'inhibition entre les boîtes avec et sans cloxacilline permet de mettre en évidence la présence d'une BLSE (**Drieux et al., 2008**).

V.2. Recherche des carbapénémases

a- Le test de Hodge

Le test de Hodge modifié (MHT) est sensible pour la détection des carbapénémases, mais ne fournit pas d'information sur le type de carbapénémase produit (**Grall et al., 2011**).

Un disque d'imipénème est appliqué au centre d'une boîte de Mac Conkey préalablement ensemencée avec la souche d'*Escherichia coli* ATCC 25922 (sensible à tous les antibiotiques). Ensuite, les souches à tester, un témoin positif correspondant à une souche *Klebsiella pneumoniae* productrice d'une carbapénémase (KPC) et une souche sensible à

l'imipénème (*E.coli* ATCC 25922) comme témoin négatif sont ensemencées sur la gélose sous forme de stries déposées à partir du disque l'imipénème jusqu'à la périphérie de la boîte.

Après incubation à 37°C pendant 24h, la déformation de la zone d'inhibition à l'intersection entre un strie et la culture de *E.coli* indique la présence d'une carbapénémase (Cuzon et al., 2010).

b-Carba NP test:

Le principe de ce test repose sur la mise en évidence d'une acidification du milieu lors de l'hydrolyse de l'imipénème par une carbapénémase. L'indicateur de pH 7 change de couleur (du rouge au jaune) lorsque le milieu devient acide, traduisant la présence d'une carbapénémase (Bakour et al., 2015).

Protocole :

- Imipénème (Tienam®) poudre pour solution injectable IV.
- Tampon de lyse : CetylTrimethyl Ammonium Bromide (CTAB) (Sigma-Aldrich).
- Rouge de phénol en poudre.
- ZnSO₄, H₂O en poudre (BIOCHEM CHEMOPHARMA).

La solution A (solution contenant l'indicateur de pH) est préparée comme suite :

- 1- Préparer une solution concentrée de rouge de phénol à 0.5%.
- 2- Mélanger 2 ml de la solution concentrée de rouge de phénol dans 16.6 ml d'eau distillée.
- 3- Ajouter au mélange 180 µl d'une solution de ZnSO₄ à 10 Mm.
- 4- Ajuster le pH à 7 avec une solution de NaOH (1N).

Pour détecter la production d'une carbapénémase, on procède comme suite :

- Dans un tube Eppendorf, mettre 200 µl de tampon de lyse (CTAB 0.02%).
- Suspendre une ose calibrée (10µl) de colonies bactériennes dans le tampon de lyse et vortexer 1 à 2 min.
- Transférer 100 µl dans 2 tubes Eppendorf 'A' et 'B'.
- Ajouter 100 µl de solution A dans le tube Eppendorf 'A' et 100 µl de la solution A+ imipénème à 6mg/ml dans le tube Eppendorf 'B'.
- Vortexer 5 sec puis incubé à 37 °C pendant un maximum de 2h.

Préparer les témoins positif et négatif à partir des souches de référence *K. pneumoniae* productrice de carbapénémase et *E.coli* ATCC 25922 sensible (Bakour et al., 2015).

L'interprétation des résultats du carba NP test est représenté dans le tableau N°IV et la figure 2.

Tableau N°IV : Interprétation des résultats de Carba NP test (Bakour et al., 2015)

Tube A	Tube B	Interprétation
Rouge	Rouge	Pas de production carbapénémase
Rouge	Orange/jaune	Production de carbapénémase
Jaune	Jaune	Non interprétable.

b-Méthode des disques combinés

Un antibiogramme est réalisé pour les souches résistante aux carbapénèmes, des disques d'imipénème ou ertapénème et de papier filtre sont déposés sur gélose Mueller Hinton à une distance de 20mm.

On dépose 10 µl d'une solution d'EDTA (0.5 M, pH=8), 10 µl d'une solution de cloxacilline (750µg) et 20 µl d'une solution d'acide boronique (400µg) sur les disques de carbapénèmes (imipénème ou ertapénème) (10µg) et sur les disques de papier filtre vierges respectivement selon le schéma suivant (Figure 1) (Bartolini et al., 2014 ; CA-SFM, 2012 ; Spyros et al., 2010).

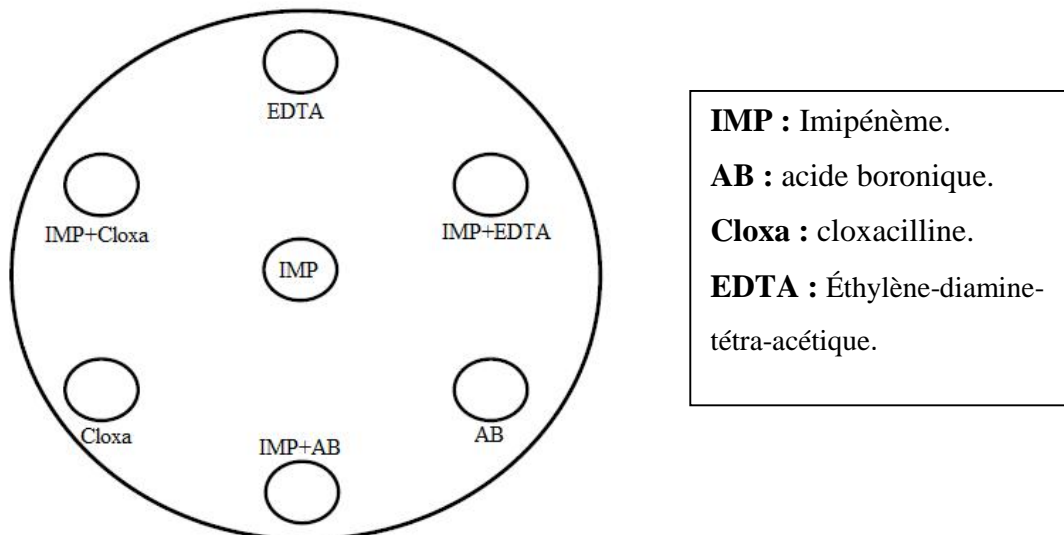


Figure 1 : Disposition des disques combinés

Après incubation à 37 °C pendant 24h, un résultat positif se traduit par une augmentation de la zone d'inhibition d'au moins 5 mm entre le disque de carbapénèmes additionné d'inhibiteur (cloxacilline, EDTA et acide boronique) et le disque vierge additionné

d'inhibiteur. Les résultats sont confirmés par la mise en évidence d'une image de synergie entre les deux disques (Tableau N°V).

Tableau N°V : Interprétation des résultats de la méthode des disques combinés

Mécanismes	Test de Hodge	EDTA	Acide boronique	Cloxacilline
Carbapénémase classe A	+	-	+	-
Carbapénémase classe B (VIM, NDM-1)	+	+	-	-
Carbapénémase classe D (OXA)	+	-	-	-
Céphalosporinase (AmpC) + imperméabilité	?	-	+	+
Ni AmpC, ni KPC, ni MBL	-	-	-	-

Résultats

I-Répartition des prélèvements par sites

Durant cette étude, 120 prélèvements ont été effectués au niveau du CHU de Khelil Amran de Bejaia dont 100 prélèvements sont effectués sur les surfaces, 16 sur l'air au niveau de service de réanimation et 4 prélèvements sur les effluents (canalisation de la station). Le nombre de prélèvements et de souches isolées par site est représenté dans le tableau N°VI.

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

Sites de prélèvements	Nombres de prélèvements	Nombres de souches	Total de prélèvements
Bordure du lit	8	5	100 prélèvements de surfaces
Aspirateur	6	2	
Brassard à tension	1	4	
Chariot d'urgence	2	2	
Climatiseur	1	1	
Cuvette	1	1	
Drap du lit	4	1	
Table de chevet	5	3	
Etagère	3	1	
Poignée de porte	10	1	
Potence	1	2	
Radiateur	5	2	
Robinet	1	1	
Air	16	2	16 prélèvement de l'air
Effluents	4	19	4 prélèvements d'eaux
Total		46	120

II- Identification des souches bactériennes

II.1. Répartition des souches par groupe bactérien et par espèces

Sur un total de 46 souches de bacilles à Gram négatif isolées des différents prélèvements :

- 27 souches ont été isolées en réanimation dont 14 souches ont poussées sur milieu additionné d'ertapénème et 11 souches sur milieu additionné de colistine.
- 2 souches ont été isolées de l'air sur gélose Mac conkey sans antibiotiques.
- 19 souches ont été isolées des effluents dont 9 souches ont poussées sur milieu additionné d'ertapénème et 10 souches sur milieu additionné d'imipénème.

La répartition des souches par sites et par type de prélèvements est représentée dans l'annexe II.

Sur la base des caractères culturaux, la coloration de Gram et les testes biochimiques, 30 souches appartenant au groupe des non fermentaires ont été identifier dont 19 *Acinetobacter baumannii* (41,3 %) et 11 *Pseudomonas aeruginosa* (23,91%). Par ailleurs, sur les 16 souches d'entérobactéries identifiées, 5 souches sont des *Klebseilla pneumoniae* (10,86%), 6 souches sont des *Klebseilla oxytoca* (13,04%) et 5 souches sont des *Enterobacter sp.* (10,86%). La répartition des souches en fonction d'espèces est représentée dans la figure 2.

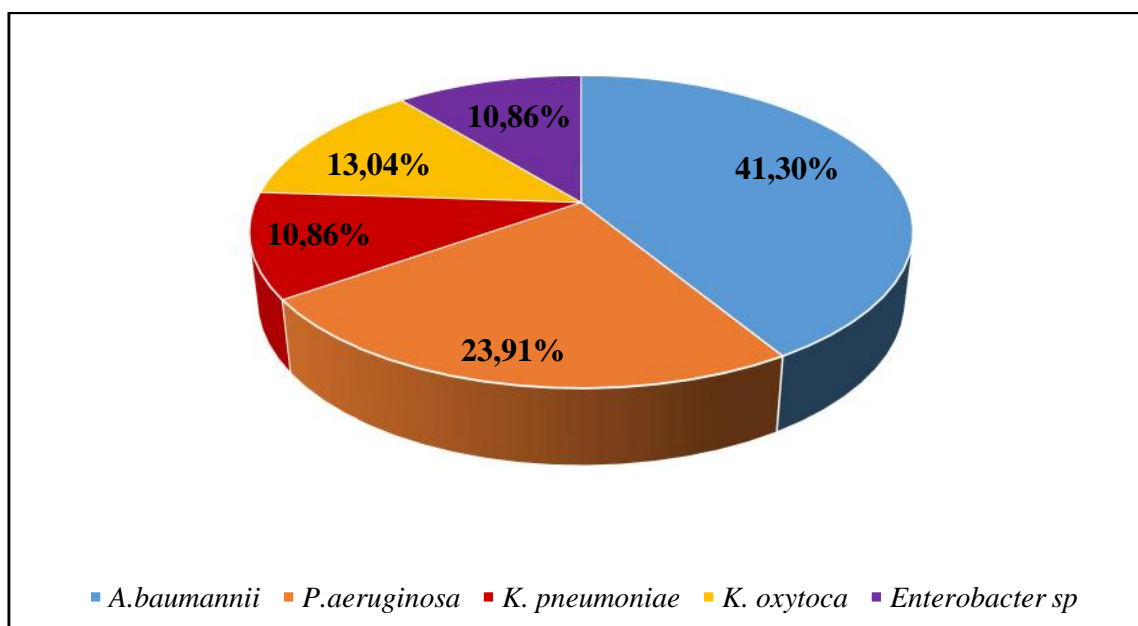


Figure 2 : Répartition des souches par espèces

Cette figure montre une prédominance des bacilles à Gram négatif non fermentaires par rapport aux entérobactéries, dont la fréquence est probablement liée au caractère nosocomial des infections dans lesquelles elles sont impliquées.

II.2. Répartition des souches selon le site de prélèvement

La répartition de 46 souches appartenant aux bacilles à Gram négatif en fonction de la nature du prélèvement est comme suit :

- ✓ Prélèvements des surfaces : le taux d'*Acinetobacter baumannii* isolée à partir ces surfaces est plus important que celui des entérobactéries et de *P.aeruginosa* (34,78% *A. baumannii*, 10,86% *P.aeruginosa*, 10,86% *Klebseilla pneumoniae* et 2,17% *Enterobacter sp.*).
- ✓ Prélèvements d'effluents : 6,52% des souches isolées sont des *A. baumannii*, 13,04% sont des *P.aeruginosa* et 13,04% et 8,69% sont des *K.oxytoca* et *Enterobacter sp.* respectivement.
- ✓ Pour les prélèvements de l'air seulement de 2 souches *K.pneumoniae* ont été isolées à une fréquence de 4,34%.

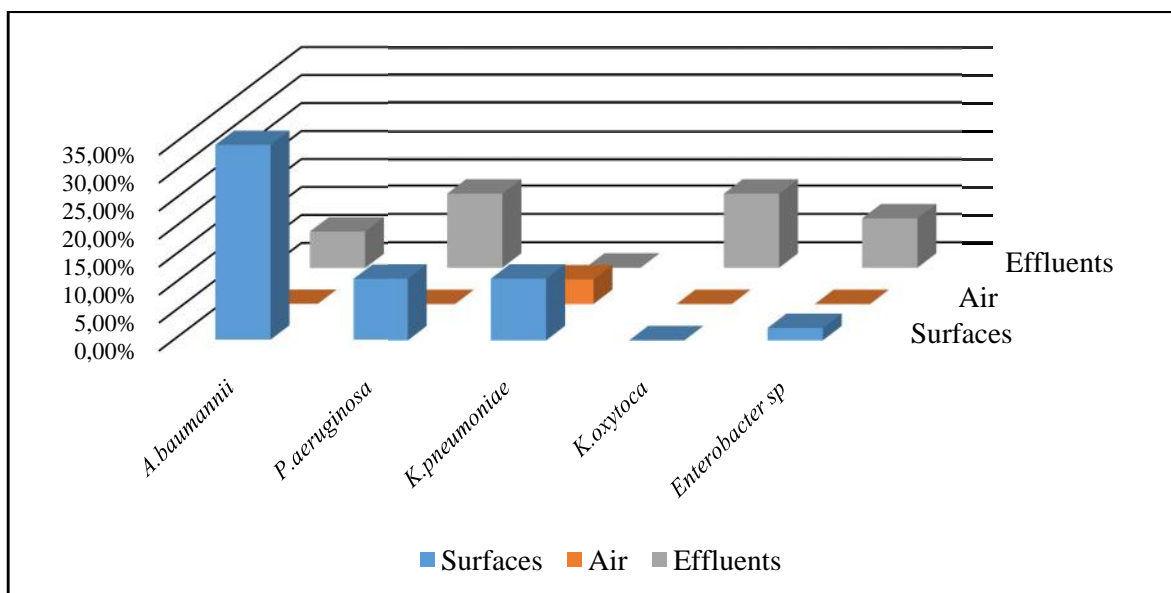


Figure 3 : Répartition des souches selon la nature de prélèvements

III- Etude de la résistance des souches aux antibiotiques

On remarque d'après le tableau N°VII que toutes les souches sont sensibles à la colistine est compris les souches qui sont été isolées sur gélose Mac Conkey additionée de colistine. On remarque également que les 46 souches étudiées expriment une résistance vis-à-vis de la majorité des antibiotiques testés.

Tableau N° VII : Profils de résistance des souches aux antibiotiques

Code	Souches	TOB		CAZ		CT		ERTA		IMP		Site de prélèvements
AR 05	<i>A. baumannii</i>	10	R	0	R	17	S	/		0	R	Bordure du lit
AR 08	<i>P.aeruginosa</i>	24	S	0	R	20	S	/		28	S	Radiateur
AR 10	<i>P.aeruginosa</i>	24	S	0	R	22	S	/		28	S	Etagère
AR 15	<i>A. baumannii</i>	0	R	0	R	19	S	/		12	R	Aspirateur
AR 45	<i>P. aeruginosa</i>	24	S	0	R	21	S	/		28	S	Cuvette
AR 48	<i>P.aeruginosa</i>	28	S	0	R	22	S	/		31	S	Climatiseur
AR 57	<i>P.aeruginosa</i>	24	S	0	R	20	S	/		29	S	Radiateur
AR 74	<i>Enterobacter sp</i>	19	S	0	R	18	S	24	I	26	S	Aspirateur
AR 77 A	<i>A. baumannii</i>	0	R	0	R	19	S	/		14	R	Table de chevet
AR 77 B	<i>A. baumannii</i>	0	R	0	R	18	S	/		14	R	Table de chevet
AR 79	<i>A. baumannii</i>	0	R	0	R	15	S	/		15	R	Bordure du lit
AR 80	<i>A. baumannii</i>	0	R	0	R	21	S	/		15	R	Scope
AR 82 A	<i>A. baumannii</i>	0	R	0	R	19	S	/		16	R	Brassard à tension
AR 82 B	<i>K.pneumoniae</i>	7	R	0	R	19	S	30	S	28	S	Brassard à tension
AR 83	<i>A. baumannii</i>	0	R	0	R	19	S	/		14	R	Bordure du lit
AR 84	<i>A. baumannii</i>	0	R	0	R	19	S	/		13	R	Drap du lit
AR 87	<i>A. baumannii</i>	0	R	0	R	18	S	/		15	R	Poignée de porte
AR 88	<i>A. baumannii</i>	0	R	0	R	18	S	/		18	I	Table de chevet
AR 90 A	<i>K.pneumoniae</i>	0	R	0	R	19	S	32	S	29	S	Aspirateur
AR 90 B	<i>K.pneumoniae</i>	0	R	0	R	18	S	32	S	32	S	Aspirateur
AR 92	<i>A. baumannii</i>	0	R	0	R	19	S	/		14	R	Bordure du lit
AR 93 A	<i>A. baumannii</i>	0	R	0	R	19	S	/		13	R	Potence
AR 93 B	<i>A. baumannii</i>	0	R	0	R	19	S	/		13	R	Potence
AR 97	<i>A. baumannii</i>	0	R	0	R	20	S	/		15	R	Chariot d'urgence
AR 99	<i>A. baumannii</i>	0	R	0	R	19	S	/		13	R	Robinet
B	<i>K.pneumoniae</i>	19	S	0	R	19	S	30	S	34	S	Air
C	<i>K.pneumoniae</i>	10	R	0	R	19	S	31	S	31	S	Air
IF ₂₃	<i>P.aeruginosa</i>	22	S	30	S	20	S	/		11	R	Effluents

Code	Souche	TOB		CAZ		CT		ETP		IMP		Site de prélèvement
IF ₂ 2	<i>Enterobacter sp</i>	18	S	0	R	20	S	26	S	23	I	Effluents
IF ₁ 3	<i>A. baumannii</i>	0	R	0	R	19	S	/		10	R	Effluents
EF ₂ 2	<i>Enterobacter sp</i>	23	S	24	S	20	S	0	R	31	S	Effluents
IF ₁ 1	<i>K. oxytoca</i>	16	I	0	R	20	S	10	R	15	R	Effluents
EF ₂ 3	<i>P. aeruginosa</i>	21	S	22	S	17	S	/		27	S	Effluents
IF ₁ 2	<i>P. aeruginosa</i>	24	S	32	S	23	S	/		11	R	Effluents
IF ₂ 1	<i>P. aeruginosa</i>	24	S	30	S	21	S	/		10	R	Effluents
EF ₃ 3	<i>K. oxytoca</i>	12	R	8	R	18	S	26	S	18	I	Effluents
IF ₃ 1	<i>P. aeruginosa</i>	21	S	27	S	18	S	/		9	R	Effluents
EF ₁ 1	<i>K. oxytoca</i>	23	S	15	R	19	S	27	S	28	S	Effluents
EF ₃ 2	<i>Enterobacter sp</i>	11	R	11	R	17	S	18	R	24	S	Effluents
IF ₄ 1	<i>P. aeruginosa</i>	26	S	36	S	20	S	/		38	S	Effluents
EF ₃ 4	<i>A. baumannii</i>	22	S	0	R	19	S	/		13	R	Effluents
EF ₃ 1	<i>Enterobacter sp</i>	11	R	0	R	19	S	16	R	17	I	Effluents
IF ₄ 2	<i>A. baumannii</i>	22	S	18	R	17	S	/		0	R	Effluents
IF ₃ 2	<i>K. oxytoca</i>	20	S	0	R	20	S	7	R	16	R	Effluents
EF ₁ 3	<i>K. oxytoca</i>	23	S	14	R	18	S	33	S	34	S	Effluents
EF ₁ 2	<i>K. oxytoca</i>	24	S	14	R	19	S	32	S	26	S	Effluents

III.1. Résistance des souches non fermentaires aux antibiotiques

La figure 4 montre que toutes les souches d'*Acinetobacter baumannii* présentent une résistance aux -lactamines (ceftazidime et imipénème), et presque la totalité des souches (17/19) sont résistantes à la tobramicyne. 6 souches de *P. aeruginosa* sont résistantes à la ceftazidime et seulement 4 sont résistantes à l'imipénème. Aucune souche n'est résistante à la tobramicyne et n'est à la colistine.

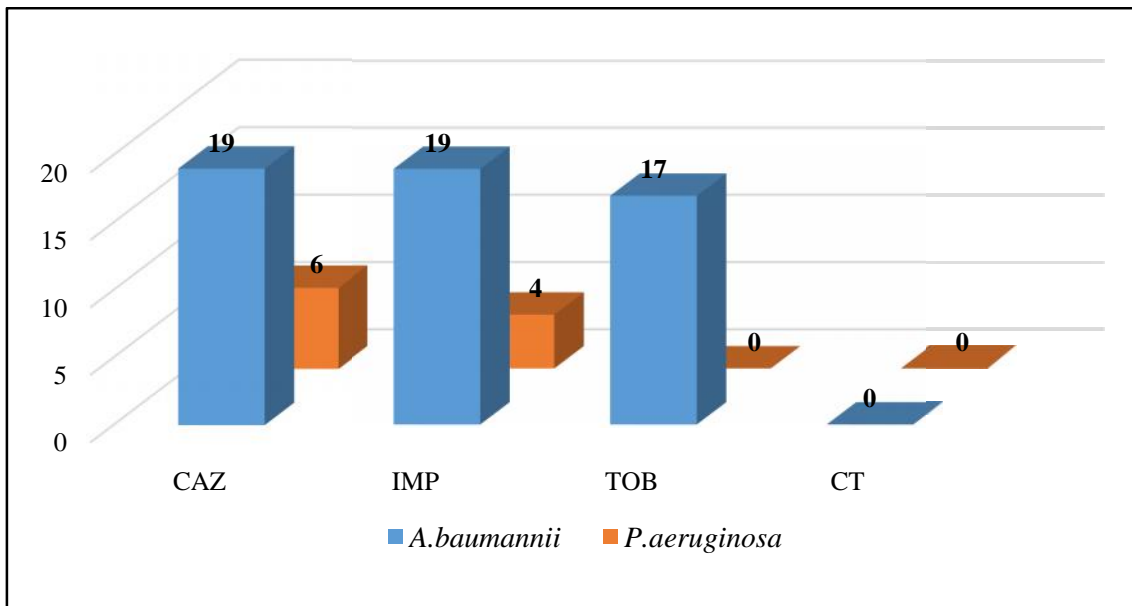


Figure 4 : Nombre de souches non fermentaires résistantes aux antibiotiques

III.2. Résistance des entérobactéries aux antibiotiques testées

Selon la figure 5, la majorité des entérobactéries sont résistantes à la ceftazidime (15/16) et 8 souches sont résistantes et ou intermédiaires aux carbapénèmes. La moitié des entérobactéries sont résistants à la tobramicyne et aucune souche n'est résistante à la colistine.

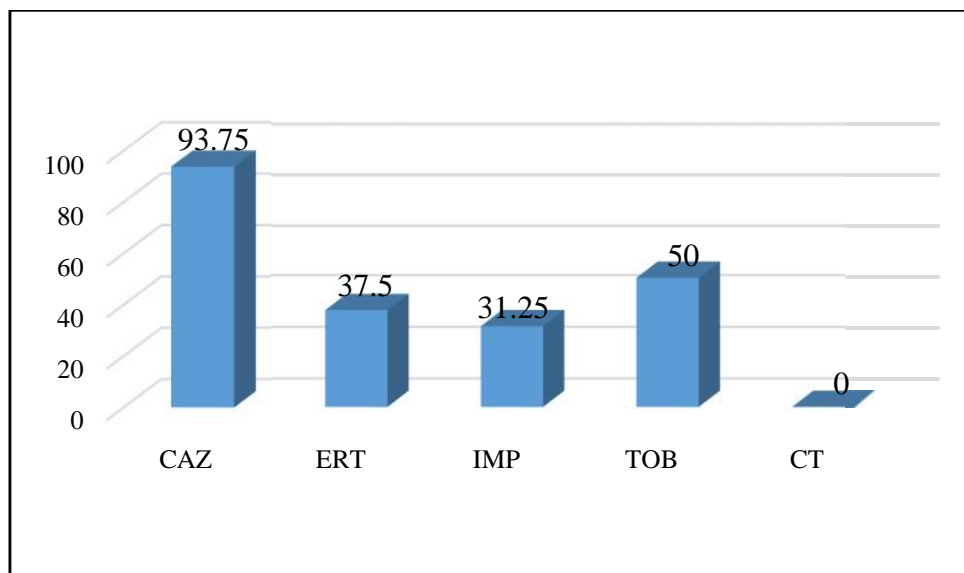


Figure 5 : Taux de résistance de souches d'entérobactéries aux antibiotiques testés

IV-Détermination des phénotypes de résistance aux β -lactamines

IV.1. Production de BLSE

Le DD-test sur gélose MH est négatif pour toutes les souches testées. Par contre, le test de synergie sur gélose MH + cloxacilline a permis de révéler une hyperproduction d'une céphalosporinase chez une souche d'*Enterobacter sp.* (AR 74).



Absence d'image de synergie
(*K. pneumoniae* AR 90)



Hyperproduction d'une céphalosporinase
(*Enterobacter sp.* AR 74)

Figure 6 : Résultats du DD-test sur gélose MH additionnée de cloxacilline

IV.2. Production de carbapénémase

a. Hodge test et Carba NP test

La production de carbapénémase est mise en évidence chez 28 souches résistantes ou intermédiaires aux carbapénèmes (IMP et ETP) par le test de Hodge et le carba NP test. Les résultats sont présentés dans le tableau N°VIII.

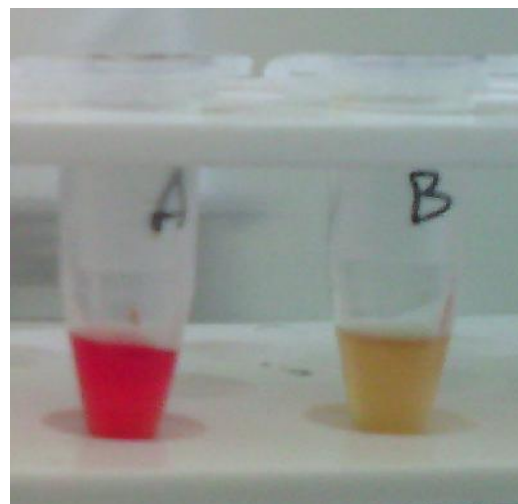
Tableau N°VIII : Nombre de souches productrices de carbapénémases caractérisées par chaque test

Tests	Nombre de souches productrices de carbapénémase
Hodge test	20/28
Carba NP test	24/28

Parmi les 28 souches testées, le Hodge test est positif pour 20 souches, par contre, le carba NP test est positif pour 24 souches, ce qui confirme la fiabilité de carba NP test dans la détection des carbapénémases. Les résultats positif des deux tests sont représentés dans la figure 7.



Test de Hodge positif
A.baumannii (IF₄2)



Carba NP test positif
A.baumannii (IF₄2)

Figure 7 : Résultats positif de la production de carbapénémase

b. Test des inhibiteurs

Le test des inhibiteurs a permis de mettre en évidence 3 souches productrices de carbapénémase de classe A, une souche résistante par un mécanisme non enzymatique et 22 souches productrice d'une carbapénémase de classe D associée à une céphalosporinase (OXA-like+AmpC), et 2 souches productrice d'une céphalosporinase associée à une imperméabilité (Annexe V). La répartition de ces souches est représentée dans le tableau N°IX.

Tableau N°IX : Phénotypes probables de résistance au carbapénèmes

Code	Souches	Profil de résistance			Hodge	Carba NP test	Inhibiteurs			BLSE	Phénotype probable
		CAZ	ERT	IMP			EDTA	A.boronique	Cloxa		
EF ₂	<i>Enterobacter sp.</i>	-	+	-	+	+	-	+	-	-	Carba de classe A
AR 77 A	<i>A.baumannii</i>	+	+	+	+	+	-	-	+	-	OXA-like+AmpC
EF ₃	<i>Enterobacter sp.</i>	+	+	-	+	+	-	+	+	-	OXA-like+AmpC
AR 88	<i>A.baumannii</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	-	OXA-like+AmpC
IF ₂	<i>P.aeruginosa</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	-	OXA-like+AmpC
AR 15	<i>A.baumannii</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	-	OXA-like+AmpC
AR 83	<i>A.baumannii</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	-	OXA-like+AmpC
IF ₃	<i>K.oxytoca</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Non enzymatique
AR 84	<i>A.baumannii</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	-	OXA-like+AmpC
AR 87	<i>A.baumannii</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	-	OXA-like+AmpC
AR 99	<i>A.baumannii</i>	+	+	+	+	+	-	-	+	-	OXA-like+AmpC
AR 79	<i>A.baumannii</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	-	OXA-like+AmpC
AR 80	<i>A.baumannii</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	-	OXA-like+AmpC
AR 97	<i>A.baumannii</i>	+	+	+	-	+	-	+	-	-	Carba de Classe A
EF ₃	<i>Enterobacter sp.</i>	+	+	+	+	+	-	-	+	-	OXA-like+AmpC
AR 82	<i>A.baumannii</i>	+	+	+	-	+	-	+	+	-	OXA-like+AmpC
AR 93 A	<i>A.baumannii</i>	+	+	+	+	+	-	-	+	-	OXA-like+AmpC
EF34	<i>A.baumannii</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	-	OXA-like+AmpC
AR 93 B	<i>A.baumannii</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	-	AmpC+Imp
IF ₃	<i>K.oxytoca</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	-	OXA-like+AmpC
IF ₂	<i>P.aeruginosa</i>	-	+	+	-	+	-	+	+	-	OXA-like+AmpC
AR 74	<i>Enterobacter sp.</i>	+	+	-	/	/	-	+	-	-	Hyper AmpC+ Imp
IF ₁	<i>A.baumannii</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	-	OXA-like+AmpC
IF ₁	<i>K.oxytoca</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	AmpC+Imp
IF ₂	<i>P.aeruginosa</i>	-	+	+	-	+	-	+	+	-	OXA-like+AmpC
IF ₄	<i>A.baumannii</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	-	OXA-like+AmpC
AR 05	<i>A.baumannii</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	-	Carba de classe A
AR 77 B	<i>A.baumannii</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	-	OXA-like+AmpC



Discussion

L'environnement hospitalier constitue une niche écologique important de microorganismes qui pourraient avoir une signification cliniques (De Abreu et al., 2014). Ce réservoir peut ensuite être prolongée par des vecteurs tels que la turbulence de l'air, l'humidité sous forme d'aérosol, les mains souillé non lavée ou le contact direct avec des surfaces ou du matériel et équipement contaminées (Dancer, 2004).

Notre étude effectués au niveau du CHU Khelil Amran de Bejaia montre la présence de souches de bacilles à Gram négatif sur des surfaces en contact avec les patients (bordure du lit, drap de malade, table de chevet...) et suggère que leur flore endogène peut être impliquée dans la contamination de ces dernières. En outre des souches sont également isolées des surfaces en contact avec le personnel (brassard à tension, poignée de porte, chariot d'urgence, aspirateur...) et suggère l'implication de ce dernier dans la transmission des germes d'un patient à un autre (Talon, 1999).

Il a été montré que certains antiseptiques telles que le chlore hexidine ou d'hexamidine ont moins d'efficacité sur les souches de *Klebsiella sp* que sur d'autres bactéries telles que *E.coli* (Grare et al., 2010) et que l'efficacité des agents antibactériens utilisés dans l'entretien des locaux, du matériel et des équipements reste toutefois variable d'une application à une autre. En effet, si près de 100% des cellules se trouve à l'état planctonique peuvent être éliminées, ce rendement est moindre sur des cellules adhérente ou en biofilms, ce qui peut explique les résultats que nous avant obtenu (Allian, 2004).

Plusieurs travaux nationaux et internationaux on rapportés la contamination par des souches d'*A. baumannii*, de *P. aeruginosa* et de *K. pneumoniae* de l'environnement proche des patients telles que les poignées, les draps, bordure du lit et les couvertures et des équipements médicaux telles que les stéthoscopes, moniteur de fréquence cardiaque, table d'opération et de compresses utilisée lors d'une opération chirurgicale. Ces souches sont capables de survivre pendant des mois sur des surfaces inanimées et sont fréquemment isolées de patients atteints d'infections nosocomiale (Touati et al., 2007 ; Touati et al., 2010 ; Obeidat et al., 2014 ; Stoesser et al., 2014 ; Zenati et al., 2016).

Nos résultats montrent une émergence de BGN multirésistants dans l'environnement de nos établissements de santé ou un taux de (58,7%) est retrouvé au niveau de la réanimation et un taux de (41,3%) dans les prélèvements d'effluents hospitalier. Ceci signifie qu'il existe un besoin urgent de comprendre l'épidémiologie de ces microorganismes pathogènes, y

compris la mesure dans laquelle des surfaces contaminées contribuent à leur transmission (Otter et al., 2011).

Notre étude a montré qu'à partir des prélèvements effectués au niveau du service de réanimation, *Acinetobacter baumannii* représente 59,26 % des souches isolées suivie des entérobactéries avec 22,22% et enfin de *Pseudomonas aerogenosa* avec 18,52%. Les différents réservoirs potentiels de ces bactéries sont les patients eux-mêmes, le personnel soignant, le matériel médical et l'environnement (Weber et al., 2010). Les bactéries à Gram négatif non fermentaire sont considérées comme des pathogènes opportunistes, émergents et multirésistants. Le plus souvent, ils sont responsables d'infections nosocomiales difficiles à contrôler et à traiter, en particulier dans les unités des soins intensifs (Peleget al., 2008).

La majorité des souches *Acinetobacter baumannii* isolées des surfaces présentent un profil de résistances similaires qui peut être due à une dissémination clonale au niveau du service de réanimation ou effectivement le personnel soignant à signalé la présence de plusieurs infections causées par cette bactérie et qui montent une multirésistance aux antibiotiques utilisés dans le traitement (imipénème). *Acinetobacter baumannii* est une bactérie aérobie stricte souvent responsable d'épidémies d'infections nosocomiales dans les services de soins intensifs. La survenue d'épidémie est favorisée par sa tolérance à la dessiccation et son antibiorésistance (Héritier et al., 2005). Elle peut persister longtemps dans l'environnement hospitalier et sa transmission est principalement manuportée (Yeom et al., 2013).

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportées par Bellache et Yous en 2013 sur la prédominance de souches d'*A. baumannii* (61.11%) par rapport aux entérobactéries isolées de l'environnement hospitalier au niveau de CHU Khlil Amran de Béjaia. Et avec ceux rapporté par Yaici et Zakar en 2012 qui ont rapportées un taux de 52,31% isolées à partir des surfaces de l'hôpital de Frantz Fanon de Béjaia dans des études en vue de l'obtention du diplôme Master.

L'air joue un rôle important comme un vecteur des microorganismes de patient à patient, dont la présence de 2 souches *Klebseilla sp.* dans l'air confirme que ce dernier est aussi impliqué dans la transmission des germes (Largus et al., 2005).

Les effluents hospitaliers ont la particularité d'être très dangereux en raison des microorganismes qu'ils pourraient disséminer ; le danger est plutôt lié à la résistance de certaines bactéries aux antibiotiques. Ces eaux usées sont réutilisées dans l'irrigation des diverses cultures maraîchères et arboricoles et peuvent provoquer des infections (**Ameziane et Benaabidate, 2012**).

Durant cette étude, 19 souches ont été isolées à partir des prélèvements des effluents avec une fréquence d'isolement de 41,3%. Le niveau de contamination des effluents est très variable selon l'heure, le jour ou le débit au moment du prélèvement. Sur le plan microbiologique, les concentrations en germes sont plus faibles dans les effluents hospitaliers que dans les effluents urbains, ce qui est probablement lié à des concentrations plus élevées en désinfectants et antibiotiques (**Darsy et al., 2002**).

Les effluents hospitaliers sont caractérisés par la présence de bactéries multirésistantes aux antibiotiques et aux autres substances antibactériennes (**Ameziane et al., 2013**). La présence des produits d'entretien notamment les produits chlorés, dont le plus courant est l'eau de javel, et d'autres produits toxiques tels que les produits désinfectants et antiseptiques qui relèvent des activités de soin, en forte concentration dans les rejets d'un hôpital serait à l'origine de l'atténuation de la concentration de la flore bactérienne présente dans l'analyse des effluents hospitalier (**Ameziane et Benaabidate, 2012**).

Les mécanismes de résistance aux antibiotiques émergents et importants chez les bacilles Gram négatif sont les β -lactamases à spectre élargi (BLSE), les carbapénémases, et les méthylases de l'ARN 16S qui confèrent une résistance aux aminosides. Ces déterminants de résistance confèrent d'emblée une multirésistance aux antibiotiques. Ils sont observés chez les entérobactéries, les *P. aeruginosa* et *A. baumannii* (**Nordmann et al., 2014**).

Dans notre travail, toutes les souches d'*A.baumannii* présentent un taux de résistance de 100% vis-à-vis de l'imipénème. Ce taux est similaire avec celui rapporté par **Zenati et al. (2016)** qui ont trouvés un taux de 91,04% chez des souches environnemental d'*A.baumannii* isolées de deux CHU en Algérie à partir des surfaces, du matériel médical et des mains du personnel soignant et que le mécanisme génétique de résistance à cette molécules est la production d'une carbapénémase de la classe D représenté par l'OXA-23 et de la classe B représenté par les NDM-1.

Les souches de *P. aeruginosa* isolées dans notre étude, ont montré des taux de résistance vis-à-vis des β -lactamines utilisées à savoir 54,54% pour la CAZ et 36,36% pour imipénème et aucune résistance n'a été détectée à tobramycine. Le principal mécanisme par lequel *P.aeruginosa* acquiert une résistance aux carbapénèmes est la réduction de la perméabilité par la perte de la porine OprD, voie préférentielle de pénétration des carbapénèmes (**Livermore, 2002**). Cette perte de porine est en effet responsable d'une augmentation de la CMI, rendant la souche intermédiaire ou résistante aux carbapénèmes. Lorsqu'elle s'accompagne de l'hyperproduction de la céphalosporinase (AmpC) ou de l'hyperexpression du mécanisme d'efflux mexAB-oprM, les CMI peuvent être encore plus élevées (**Quale et al., 2006**).

Toutes les souches non fermentaires isolées durant cette étude sont sensibles à la colistine. La grande sensibilité à la colistine parmi nos souches en fait parfois la seule alternative thérapeutique disponible. Malgré ses effets secondaires, notamment néphro et neurotoxiques, cette molécule est utilisée avec succès dans le traitement de bactériémies à *A. baumannii* et à *P. aeruginosa* multirésistants en association avec d'autres familles d'antibiotiques (**Saidani et al., 2006**).

La résistance des entérobactéries aux β -lactamines et aux autres antibiotiques est souvent liée à une résistance plasmidique transférable entre les espèces. Cette résistance est associée aux β -lactamases à spectre étendu (BLSE) en particulier la famille CTX-M et les carbapénémases de classe A (KPC), de classe D (OXA-48) et de classe B (VIM, IMP, et NDM-1) (**Buch, 2010**) Les mécanismes de résistance aux carbapénèmes diffèrent selon les bactéries. Il s'agit soit d'une résistance enzymatique liée à la production de carbapénémases, chromosomique ou plasmidique, soit d'une résistance non enzymatique par imperméabilité ou par efflux (**Zahar et al., 2011**).

Le test de Hodge, le carba NP test, le DD-test et le test des inhibiteurs ont permis de mettre en évidence 22 souches productrices d'une carbapénémase associée à une céphalosporinase (Carba+AmpC) (16 *A.baumannii*, 2 *Enterobacter sp.*, 3 *P. aeruginosa* et 1 souche de *K.oxytoca*), 2 souches productrices de carbapénémase de type KPC (une souche d'*Enterobacter sp.* et une souche *A. baumannii*) et une souche de *K. oxytoca* résiste au carbapénème par un mécanisme non enzymatique. Une souche d'*Enterobacter sp.* est révélée hyperproductrice d'AmpC.

Bien que le mécanisme de résistance aux carbapénèmes le plus répandu chez *A. baumannii* corresponde à l'acquisition de carbapénémases, ou à la surexpression de l'OXA-51 chromosomique par insertion d'ISAbal, des mécanismes de résistance non enzymatiques existent (**Turton et al., 2006**). Le rôle de la porine CarO et celui d'une autre protéine de 43kDa (*OprD-like*) ont été démontrés dans la résistance à l'imipénème (**Nordmann., 2010**). Par ailleurs, la surexpression du système d'efflux AdeABC semble pouvoir affecter l'activité des β -lactamines, en particulier en association à d'autres mécanismes (**Grall et al., 2011**).

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

Sur les 120 prélèvements effectués au niveau des surfaces, air et effluents, 46 souches de bacilles à Gram négatif ont été isolées et identifiées, dont 19 *Acinetobacter baumannii*, 11 *Pseudomonas aerogenosa* et 16 appartenant aux enterobactéries (6 *K. oxytoca*, 5 *K. pneumoniae* et 5 *Enterobacter sp.*).

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

- ✓ Toutes les souches d'*Acinetobacter baumannii* sont résistantes aux β -lactamines (ceftazidime et imipénème). Presque toutes les souches sont résistantes à la tobramicyne (17/19).
- ✓ Les souches de *Pseudomonas aerogenosa* présentent une résistance aux β -lactamines testés, 6/11 vis-à-vis de la ceftazidime et 4/11 vis-à-vis de l'imipénème. Aucune souche n'est résistante à la tobramicyne.
- ✓ Presque la totalité des entérobactéries sont résistants au ceftazidime (15/16), 8 souches sont résistantes et ou intermédiaires aux carbapénèmes. 8 souches sont résistantes à la tobramicyne.
- ✓ Toutes les souches isolées sont sensibles à la colistine.

La recherche de phénotypes de résistance aux β -lactamines a permis de détecter la production d'une carbapénémase associée à une hyperproduction d'une céphalosporinase (AmpC) chez 22 souches, 3 souches productrices de carbapénémase de classe A (KPC), 2 souches productrices d'une AmpC associée à une imperméabilité et une souche non enzymatique.

Ces résultats montrent que l'environnement hospitalier dans la région de Béjaia est fréquemment contaminé par les bacilles à Gram négatif multirésistants en particulier *Acinetobacter baumannii*, et qu'il peut être une source potentielle de ces bactéries. Ces résultats nous incitent à proposer des recommandations au sein des structures sanitaires. Il s'agit particulièrement du renforcement de l'application des mesures générales d'hygiène, et plus précisément l'hygiène des malades et de l'environnement hospitalier, de la sensibilisation du personnel hospitalier concernant ce risque sous-estimé et de la nécessité d'une surveillance adéquate des souches BMR dans l'environnement des hôpitaux algériens.

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

- ✓ La détermination de l'évolution de la contamination de l'environnement hospitalier dans le temps.
- ✓ L'élargissement de l'étude sur toute la flore environnementale pour inclure les bactéries à Gram négatif pour déterminer les places des BMR parmi ces germes.
- ✓ L'étude moléculaire pour déterminer les mécanismes impliqués dans la résistance aux antibiotiques.

*Références
bibliographiques*

A

Allione A. Environnement des bactéries et sensibilité aux biocides. *Laboratoires AMINOS*. 2004.

Ameziane N, Benaabidate L. Caractérisation microbiologique des effluents de l'hôpital Mohamed V de Meknès et étude de leur impact sur l'environnement. *Rev Nature & Technologie. C- Sciences de l'Environnement* 2014 : 10 : 31- 38.

Amiyare R, Afifi I, Ouhsine M. Hospital environment and risk of nosocomial infections in the intensive care unit of Provincial Hospital El Idrissi of Kenitra in Morocco. *Der Pharmacia Lettre*, 2015, 7 (3):134-140.

B

Bakour S, Loucif L, Brunel JM, Touati A, Rolain JM. Rapid identification of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* using a Modified Carba NP test. *J Med Microbiol*. 2015. 7.89-93.

Bertrand X, Blasco G, Belle E, et al. [*Pseudomonas aeruginosa* epidemiology in intensive care units : importance of cross-transmission]. *Ann Fr Anesth Reanim* 2003;22: 505-9.

Birgy A, Bidet Ph, Nathalie Genel N, Doit C, Decré D, Arlet G, Bingena E. Phenotypic Screening of Carbapenemases and Associated β -Lactamases in Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012 :12 : 1295–1302.

Boutet-Dubois A, Pantel A, Sotto A, Lavigne J.P. Les entérobactéries productrices de carbapénémases. *Lettre d'information du C Clin Sud-Est*. 2012 : 2 :1-5.

Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 933-951.

Bratu S, Landman D, Alam M, et al. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49.

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

Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39: 1211-33.

C

Cattoir V. Les nouvelles β -lactamases à spectreétendu(BLSE). *Pathologie infectieuse en réanimation* :2008 :204 : 204-209.

Cavallo J. D, Antoniotti G, Baffo N.Y, Condrais G S, Hajjar J, Horn C, Le Ghouhir C, Le Guyader A, Le jeune B, Mounier M and Salomon V. SurveillanceMicrobiologique des l'environnement dans les établissements de santé Air, eaux et surfaces. *Ministère chargé de la santé*, DGS/DHOS, CTIN. France. 2002. 70p.

Charkaoui.A, Emonet.S, Renzi.G, Riat.A, Greub.G, Schrenze.J. β -lactamases à spectreétendu et carbapénémases chez les entérobactériaceae. *Rev Med Suisse* 2014 ;2142-2148.

Cuzon G., Naas T, Nordmann P. carbapénémases de type KPC :quel enjeu en microbiologie clinique. *Pathologie Biologie.* 2010 :58 :39-45.

CVMP. Comité des médicaments à usage vétérinaire. *European Medicines Agency.*2015.

D

Dancer, S.J. How do we assess hospital cleaning? A proposal for microbiological standards for surface hygiene in hospitals. *J Hosp Infect.* 2004.56 : 10-15.

Darsy. C, Lescure. I, Payot. V, Rouland. G. Effluents des établissements hospitaliers: teneur en microorganismes pathogènes, risques sanitaires, procédures particulières d'épuration et de gestion des boues. *OIE.* 2002.

De Abreu, P.M., P.G. Farias, G.S. Paiva, A.M. Almeida, and P.V. Morais. Persistenc of microbial communities including *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital environment: a potential health hazard. *BMC Microbiol.* 2014.14: 118.

Decré D. *Acinetobacter baumannii* et résistance aux antibiotiques : un modèle d'adaptation. *Laboratoire de bactériologie Saint-Antoine*. 2012 ;42 :43-52.

Drees M, Snyderman DR, Schmid CH, Barefoot L, Hansjosten K, Vue PM, *et al.* Prior environmental contamination increases the risk of acquisition of vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis* 2008; 46(5):678-85.

Drieux. L, Brossier. F, Sougakoff. W, Jarlier. V. Phenotypic detection of extended-spectrum - lactamase production in Enterobacteriaceae : review and bench guide. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* : 2008 : 14 : 90–103.

F

Fagon JY, Chastre J, Vuagnat A, *et al.* Nosocomial pneumonia and mortality among patients in intensive care units. *JAMA* 1996;275: 866-9.

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

G

Girault C, Tamion F, Beduneau G. Quality of care assessment and nosocomial pneumonia in the intensive care unit. *Rev Mal Respir* 2006;23Suppl 2: 4S27-43.

Grall. N, Andreumont. A, Armand-Lefèvre. L. Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ? *Journal des Antinfectieux*. 2011.

Grare M, Dibama HM, Lafosse S, Ribon A, Mourer M, Regnouf-de-Vains JB, *et al.* Cationic compounds with activity against multidrug-resistant bacteria : interest of a new compound compared with two older antiseptics, hexamidine and chlorhexidine. *Clin Microbiol Infect* 2010 ; 16: 432-8.

Guessenn N.K, Ouattara M.B, Ouattara N.D, Nevry R. K, Gbonon V, Tiekoura K.B, Dossom M *et Le GerBmr.* Étude des bactéries multirésistantes des effluents hospitaliers et

universitaire (CHU) de la ville d, Abidjan (côte d'Ivoire). *J. Appl. Biosci.* 2013. 69:5456 – 5464.

H

Héritier C, Poirel L, Fournier P-E, Nordmann P., et al. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother* 49(10): 2005. 4174–4179.

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

J

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

K

Kramer A, Schwebke I et Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis* 2006; 6 (130): 8 p.

L

Largus T. Angenent, Scott T. Kelley, Allison St. Amand, Norman R. Pace, and Mark T. Hernandez. Molecular identification of potential pathogens in water and air of a hospital therapy pool. *PNAS* 2005 ;102 : 4860–4865.

Liassine N. Problème des pathogènes Gram négatif résistants aux antibiotiques en milieu hospitalier. *Schweiz Med Wochenschr* 2000; 130(50): 1930-1936.

Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002;34:634-40.

M

Mansour W., Bouallegue O., Dahmen S., Boujaafar N. Caractérisation des mécanismes enzymatiques de résistance aux β -lactamines chez des souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées à l'hôpital universitaire Sahloul, Sousse en Tunisie (2005). *Pathologie Biologie*. 2008 56 (3) : 116-120.

Mokrani. K, Ait Hamouda. R, Mahdjoub. H, Tebbal. S. Regain d'intérêt pour la colistine dans le traitement des infections urinaires. *Maladies infectieuses*. 2014.

N

Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009;9:228—36.

Nordmann. P, Poirel. L. Résistances aux antibiotiques émergentes et importantes chez les bactéries Gram négatif : épidémiologie, aspects théoriques et détection. *Rev Med Suisse* 2014 :902-907.

O

Obeidat, N., F. Jawdat, and A.G. Al-Bakri. 2014. Major biologic characteristics of *Acinetobacter baumannii* isolates from hospital environmental and patient's respiratory tract sources. *Am J Infect Control* 2014;42:40140e40144.

Oliveira AC, Damasceno QS. Surfaces of the hospital environment as possible deposits of resistant bacteria: a review. *Rev Esc Enferm USP* 2010; 44 (4):1112-7.

Otter JA, Yezli S, French GL. The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2011; 32(7): 687-699.

P

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

Poirel L, Heritier C, Tolun V, et al. Emergence of oxacillinase- mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:15—22.

Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P, « *Outbreak of extended-spectrum bêta-lactamase VEB-1-producing isolates of Acinetobacter baumannii in a French hospital* », *J Med Microbiol*, vol. 41, n° 8, 2003, p. 3542-3547.

Poirel L, Nordmann P. Résistance aux bêta-lactamines chez *Acinetobacterbaumannii* :évolution et émergence de nouveaux mécanismes. *Antibiotiques* 2006;8:100—7.

Psichogiou M, Tassios PT, Avlami A, et al. Ongoing epidemic of blaVIM-1positive *Klebsiella pneumoniae* in Athens,Greece:a prospective survey.*JAntimicrobChemother*2008;61:59—63.

Q

Quale J, Bratu S, Gupta J, et al. Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*2006 ; 50:1633-41.

R

Rouillon.S, Ourdanabia.S, Jamart.S, Hernandez.C, etMeunier.O. Étude de l'efficacité d'un produitdétergentdésinfectant pour sols et surfaces sur les souches bactériennes isolées à partir de l'environnementhospitalier. *Pathologie Biologie* .2006. 54 325–330.

S

Saïdani. M, Boutiba. I, Ghazzi. R, Kammoun. A, Ben Redjeb. S. Profilbactériologique des bactériémies à germesmultirésistants à l'hôpital Charles-Nicolle de Tunis. *Med Mal Infect* 36. 2006. 163–166.

Saouide el ayne N, Echchelh A, Chaouch A, Auajjar N, Hamama S, Soulaymani A. Role de l'environnementhospitalier dans la prevention des infections nosocomiales: surveillance de la flore des surfaces al'hospital el idrissi de kenitra – Maroc. *European Scientific Journal*. 2014 :10 : 1857 – 7881.

Spyros P, Aggelik P et Athanassions T. Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase producing Enterobacteriaceae in clinical practice by using boronic acid compound. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65, 1319-1321.

Stoesser, A., E. Giess, M. Batty, A.E. Sheppard, A.S. Walker, D.J. Wilson, X. Didelot, A. Bashir, R. Sebra, A. Kasarskis, B. Sthapit, M. Shakya, D. Kelly, A.J. Pollard, T.E.A. Peto, D.W. Crook, P. Donnelly, S. Thorson, P. Amatya, and S. Joshi. Genome Sequencing of an Extended Series of NDM-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Neonatal Infections in a Nepali Hospital Characterizes the Extent of Community- versus Hospital Associated Transmission in an Endemic Setting. *Antimicrob Agents Chemother.* **58** (12) : 2014. 7347-7357.

T

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

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

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

Touati, A., S. Benallaoua, F. Djoudi, J. Madoux, L. Brasme, and C. De Champs. Characterization of CTX-M-15-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Strains Isolated from Hospital Environments in Algeria. *Microb Drug Resist.* 13: 2007. 85-89.

Turton JF, Ward ME, Woodford N, et al. The role of ISAba1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett* 2006;258: 72—7.

V

Vora.S, et Auckenthaler.R. Que signifie « β -lactamases à spectre élargi» en pratique ? *Rev Med Suisse*; 5 : 2009. 1991-4.

W

Weber DJ, Rutala WA, Miller MB, Huslage K, Sickbert-Bennett E. Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: Norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. *Am J Infect Control* 2010; 38(5) (Suppl 1): S25-33.

Y

Yeom J, Shin JH, Yang JY, Kim J, Hwang GS, « (1) *H* NMR-based metabolite profiling of planktonic and biofilm cells in *Acinetobacter baumannii* 1656-2 », *PloS one*, vol. 8, n° 3, 2013, e57730.

Z

Zahar. J.R, Grall. I, Kouatchet. A.T. Carbapénèmes : nouvelles molécules, différentes indications ?. *La Lettre du Pharmacologue*. 2011 ; 25 : 16-20.

Zenati. K, Touati. A, Bakour. S, Sahli. F, Rolain. J.M. Characterization of NDM-1- and OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates from inanimate surfaces in a hospital environment in Algeria. *J Hos Infect* 92 .2016. 19-26.

Annexes

Annexe I : composition des milieux de culture (pour 1L d'eau distillée)

(Guiraud,2003)

Bouillon nutritif

Peptone.....10g

Chlorure de sodium.....05g

Extrait de viande.....05g

PH : 7,2

Gélose Mac Conkey

Peptone de caséine.....17g

Peptone de viande.....03g

Lactose.....10g

Mélange de sels biliaires.....1,5g

Chlorure de sodium.....05g

Rouge neutre.....0,03g

Cristal violet.....0,001g

PH :7,4

Gélose Mueller Hinton

Infusion de viande de bœuf.....03g

Hydrolysate de caséine.....17,5g

Amidon.....1,5g

Agar.....17g

PH :7,4

Gélose TSI (TreeSugar and Ion)

Extrait viande de bœuf.....	03g
Extrait de levure.....	03g
Peptone tryptique.....	20g
Chlorure de sodium.....	05g
Citrate ferrique.....	0.3g
Thiosulfate de sodium.....	0.3g
Lactose.....	10g
Glucose.....	01g
Saccharose.....	10g
Rouge de phénol.....	0.05g
Agar.....	12g
PH : 7.4	

Milieu de Citrate de Simmons

Citrate de sodium.....	02g
Chlorure de sodium.....	05g
Sulfate de magnésium.....	0.2g
Phosphate monoammoniaque.....	01g
Phosphate bipotassique.....	0.01g
Bleu de bromothymol.....	0.08g
Agar.....	15g
PH : 7 – 7,2.	

Bouillon nitraté

Bouillon nutritif.....	1l
Nitrate de potassium.....	1g

Eaupeptoné

Peptone exempte d'indole.....	15g
Chlorure de sodium.....	5g

PH :7.2

Milieu Urée-Indole

L-tryptophane.....	03g
Phosphate monopotassique.....	01g
Phosphate bipotassique.....	01g
Chlorure de sodium.....	05g
Urée.....	20g
Alcool à 95.....	10ml
Rouge de phénol.....	0.025g

PH :7

Milieu Clark -Lubs

Peptone trypsique de viande.....	05g
Phosphate bipotassique.....	05g
Glucose.....	06g

PH :7

Gélose nutritive

Extrait de viande.....	05g
------------------------	-----

Peptone.....	10g
Chlorure de sodium.....	05g
Agar.....	20g
PH : 7	

Composition des réactifs utilisés

Réactif de Griess (NR1 et NR2)

NR1

Acide sulfanilique.....	0.8ml
Acide acétique 5N.....	100ml

NR2

Diméthylamine.....	0.6ml
Acide acétique 5N.....	100ml

Réactif de Kovacs

P-diméthylaminebenzaldéhyde.....	10ml
Acide chloridrique.....	50ml
Alcool amylique.....	150ml

Réactif de Voges-Proskauer (VP1-VP2) :

VP1

-naphthol.....	6g
Alcool à 90°.....	100ml

VP2

NaOH 4N

Rouge de méthyle (RM)

Rouge de méthyle.....0.5g

Alcool éthylique à 60 %.....100ml

Annexe II : Sites de prélèvements des souches isolées de l'environnement hospitalier

Tableau N°1 : sites de prélèvements des souches isolées au niveau du CHU de Béjaia

Code	Salle	Site de prélèvements	ERTA	Colistine
AR 01	B 02	Poignée de porte	-	-
AR 02	B 02	Interrupteur	-	-
AR 03	B 02	Poignée de fenêtre	-	-
AR 04	B 02	Poignée d'armoire	-	-
AR 05	B 02	Bordure du lit	+	-
AR 06	B 02	Drap du lit	-	-
AR 07	B 02	Table de chevet	-	-
AR 08	B 02	Radiateur	-	+
AR 09	B 02	Bordure du lit 02	-	-
AR 10	B 02	Etagère	+	-
AR 11	B 02	Tableau d'affichage	-	-
AR 12	B 02	Tuyauterie aspirateur	-	-
AR 13	B 02	Piège d'eau	-	-
AR 14	B 02	Tuyauterie aspirateur 02	-	-
AR 15	B 02	Aspirateur	+	-
AR 16	B 02	Scope	-	-
AR 17	B 03	Poigné porte	-	-
AR 18	B 03	Interrupteur	-	-
AR 19	B 03	Poigné fenêtre	-	-
AR 20	B 03	Barboteur oxygène	-	-
AR 21	B 03	Table de chevet	-	-
AR 22	B 03	Drap du lit	-	-
AR 23	B 03	Bordure du lit	-	-
AR 24	B 03	Tableau d'affichage	-	-
AR 25	Couloir	Chariot de soins	-	-
AR 26	B 03	Radiateur	-	-
AR 27	B 03	Etagère	-	-
AR 28	Couloir	Chariot pansement	-	-
AR 29	Couloir	Bétadine solution	-	-
AR 30	B 03	Aspirateur	-	-
AR 31	B 03	Tambour boîte à instamment	-	-
AR 32	B 03	Scope	-	-
AR 33	B 03	Pince	-	-
AR 34	B 03	Aspirateur	-	-
AR 35	B 04	Poigné porte	+	-
AR 36	B 04	Interrupteur	-	-
AR 37	B 04	Poigné fenêtre	-	-

AR 38	B 04	Chaise	-	-
AR 39	B 04	Multiprise	-	-
AR 40	B 04	Bordure du lit	-	-
AR 41	Couloir	Interrupteur	-	-
AR 42	Couloir	Distributeur désinfectant	-	-
AR 43	Couloir	Paravent	-	-
AR 44	Toilette	Poigné porte	-	-
AR 45	Toilette	Cuvette	+	-
AR 46	Toilette	Manche	-	+
AR 47	Salle de nettoyage	Eau distillé humidificateur	-	-
AR 48	Couloir	Climatiseur	+	-
AR 49	Couloir	Poigné porte 02	-	-
AR 50	Salle de nettoyage	Palliasse	-	-
AR 51	Couloir	Bordure de fenêtre	-	-
AR 52	B 01	Laryngoscope	-	-
AR 53	B 01	Défibrillateur	-	-
AR 54	B 01	Réanima	-	-
AR 55	B 01	Aspirateur mobil	-	-
AR 56	B 01	Brancard d'urgence	-	-
AR 57	B 01	Radiateur	+	-
AR 58	B 01	Désinfectant des mains	-	-
AR 59	Couloir	Poigné porte principale	-	-
AR 60	Couloir	Téléphone	-	-
AR 61	Couloir	Radiateur	-	-
AR 62	Salle de medecins	Bureau médecins	-	-
AR 63	Salle de medecins	Poigné porte	-	-
AR 64	Salle de medecins	Ordinateur	-	-
AR 65	Salle de medecins	Stéthoscope	-	-
AR 66	Salle de medecins	Chaise	+	-
AR 67	Salle de medecins	Téléphone	-	-
AR 68	Salle de medecins	Tableau d'affichage	-	-
AR 69	Salle de medecins	Radiateur	-	-
AR 70	Salle de medecins	Casier	-	-
AR 71	A 01	Poigné porte	-	-
AR 72	A 01	Table de chevet	-	-
AR 73	A 01	Bordure du lit	-	-
AR 74	A 01	Aspirateur	-	+
AR 75	A 01	Barboteur oxygène	-	-
AR 76	A 01	Interrupteur	-	-
AR 77	A 02	Table de chevet	+	+
AR 78	A 02	Aspirateur	-	-
AR 79	A 02	Bordure du lit	+	-
AR 80	A 02	Scope	+	-

AR 81	A 02	Piège d'eau	-	-
AR 82	A 02	Brassard à tension	+	+
AR 83	A 03	Bordure du lit	-	+
AR 84	A 03	Drap du lit	+	-
AR 85	A 03	Scope	-	-
AR 86	A 03	Seringue électrique	-	-
AR 87	A 04	Poigné porte	+	-
AR 88	A 04	Table de chevet	-	+
AR 89	A 04	Interrupteur	-	-
AR 90 A	A 04	Aspirateur	+	-
AR 90 B	A 04	Aspirateur	-	+
AR 91	A 04	Etagère	-	-
AR 92	A 05	Bordure du lit	-	+
AR 93	A 05	Potence	+	+
AR 94	A 05	Tableau d'affichage	-	-
AR 95	A 06	Poigné de fenêtre	-	-
AR 96	A 06	Drap du lit	-	-
AR 97	Couloir	Chariot d'urgence 02	-	+
AR 98	Couloir	Réanima	-	-
AR 99	Toilette	Robinet	+	-
AR 100	Toilette	Poigné porte	-	-
A	B 01	Air	/	/
B	B 02	Air	/	/
C	B 03	Air	/	/
D	B 04	Air	/	/
E	A 01	Air	/	/
F	A 02	Air	/	/
G	A 03	Air	/	/
H	A 04	Air	/	/
I	A 05	Air	/	/
J	A 06	Air	/	/
K	Salle de soins	Air	/	/
L	Salle de medecins	Air	/	/
M	Couloir	Air	/	/
N	Couloir	Air	/	/
O	Couloir	Air	/	/
P	Couloir	Air	/	/
			ERTA	IMP
IF23	Station d'épuration	Effluents	-	+
IF22	Station d'épuration	Effluents	-	+
IF13	Station d'épuration	Effluents	-	+
EF22	Station d'épuration	Effluents	+	-
IF11	Station d'épuration	Effluents	-	+

EF23	Station d'épuration	Effluents	+	-
IF12	Station d'épuration	Effluents	-	+
IF21	Station d'épuration	Effluents	-	+
EF33	Station d'épuration	Effluents	+	-
IF31	Station d'épuration	Effluents	-	+
EF11	Station d'épuration	Effluents	+	-
EF32	Station d'épuration	Effluents	+	-
IF41	Station d'épuration	Effluents	-	+
EF34	Station d'épuration	Effluents	+	-
EF31	Station d'épuration	Effluents	+	-
IF42	Station d'épuration	Effluents	-	+
IF32	Station d'épuration	Effluents	-	+
EF13	Station d'épuration	Effluents	+	-
EF12	Station d'épuration	Effluents	+	-

*Annexe II : Résultats d'identification biochimique des entérobactéries
par la galerie classique*

**Tableau N°2 : Résultats d'identification biochimique des entérobactéries par la galerie
classique**

Code	Souche	Glu	Lac	Gaz	H2S	Cit	Uré	Nit	Ind	RM
B	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	-
C	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	-
AR 74	<i>Enterobacter sp</i>	+	+	+	-	+	-	+	-	-
AR 82	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	-
AR 90 A	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	-
AR 90 B	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	-
EF11	<i>K.oxytoca</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	-
EF33	<i>K.oxytoca</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	-
IF11	<i>K.oxytoca</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	-
EF22	<i>Enterobacter sp</i>	+	+	+	-	+	-	+	-	-
EF32	<i>Enterobacter sp</i>	+	+	+	-	+	-	+	-	-
EF12	<i>K.oxytoca</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	-
EF31	<i>Enterobacter sp</i>	+	+	+	-	+	-	+	-	-
IF32	<i>K.oxytoca</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	-
IF22	<i>Enterobacter sp</i>	+	+	+	-	+	-	+	-	-
EF13	<i>K.oxytoca</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	-

Annexe IV :Résultats de Hodge test et carba NP test des souches testées

Tableau N°3 :Résultats de Hodge test et carba NP test des souches testées

Code	Souches	Hodge test	Carba NP test
EF₂2	<i>Enterobacter sp</i>	+	+
AR 77 A	<i>A.baumannii</i>	+	+
EF₃2	<i>Enterobacter sp</i>	+	+
AR 88	<i>A.baumannii</i>	+	+
IF₂1	<i>Pseudomonas sp</i>	+	+
AR 15	<i>A.baumannii</i>	+	+
AR 83	<i>A.baumannii</i>	+	+
IF₃2	<i>Klebseilla sp</i>	-	-
AR 84	<i>A.baumannii</i>	+	+
AR 87	<i>A.baumannii</i>	+	+
AR 99	<i>A.baumannii</i>	+	+
AR 79	<i>A.baumannii</i>	+	+
AR 80	<i>A.baumannii</i>	+	+
AR 97	<i>A.baumannii</i>	-	+
EF₃1	<i>Enterobacter sp</i>	+	+
AR 82	<i>A.baumannii</i>	-	+
AR 93 A	<i>A.baumannii</i>	+	+
AR 93 B	<i>A.baumannii</i>	-	-
IF₃1	<i>Klebseilla sp</i>	+	+
IF₂3	<i>Pseudomonas sp</i>	-	+
AR 74	<i>Enterobacter sp</i>	/	/
IF₁3	<i>A.baumannii</i>	+	+
IF₁1	<i>Klebseilla sp</i>	-	-
IF₁2	<i>Pseudomonas sp</i>	-	+
IF₄2	<i>A.baumannii</i>	+	+
AR 05	<i>A.baumannii</i>	+	+
AR 77 B	<i>A.baumannii</i>	+	+
EF₃4	<i>A.baumannii</i>	+	+

Annexe V : Diamètres des disques combinés (test des inhibiteurs)

Tableau N°IV : Diamètres des disques combinés (test des inhibiteurs)

Code	Souche	EDTA	EDTA+IMP		AB	AB+IMP		Clox	Clox+IMP		Phénotype
EF22	<i>Enterobacter sp.</i>	30	30	0	11	16	5	6	6	0	Carba de classe A
AR 77 A	<i>A.baumannii</i>	30	30	0	16	18	2	6	13	7	OXA-like
EF32	<i>Enterobacter sp.</i>	20	20	0	10	22	12	6	20	14	OXA-like+ AmpC
AR 88	<i>A.baumannii</i>	30	30	0	12	16	4	6	17	11	OXA-like +AmpC
IF21	<i>P.aeruginosa</i>	30	34	4	9	25	16	8	19	11	OXA-like+ AmpC
AR 15	<i>A.baumannii</i>	30	30	0	12	19	7	6	15	9	OXA-like+AmpC
AR 83	<i>A.baumannii</i>	30	30	0	9	15	6	6	11	5	OXA-like +AmpC
IF32	<i>K.oxytoca</i>	28	28	0	11	11	0	9	13	4	Non enzymatique
AR 84	<i>A.baumannii</i>	29	29	0	10	17	7	6	14	8	OXA-like + AmpC
AR 87	<i>A.baumannii</i>	29	29	0	8	18	10	6	14	8	OXA-like +AmpC
AR 99	<i>A.baumannii</i>	29	29	0	12	13	1	6	14	8	OXA-like+AmpC
AR 79	<i>A.baumannii</i>	27	30	3	6	16	10	6	14	8	OXA-like+AmpC
AR 80	<i>A.baumannii</i>	26	26	0	10	19	9	6	12	5	OXA-like+AmpC
AR 97	<i>A.baumannii</i>	28	32	4	16	22	6	15	15	0	Carba de classe A
AR 82	<i>A.baumannii</i>	31	31	0	16	22	6	6	13	7	OXA-like+AmpC
AR 93 B	<i>A.baumannii</i>	30	30	0	16	18	2	6	14	8	AmpC + Imp
AR 93 A	<i>A.baumannii</i>	30	30	0	16	22	6	6	18	12	OXA-like + AmpC
IF31	<i>K.oxytoca</i>	10	14	4	6	14	8	6	14	8	OXA-like + AmpC
IF23	<i>P.aeruginosa</i>	40	40	0	15	30	15	9	23	14	OXA-like + AmpC
AR 74	<i>Enterobacter sp.</i>	30	30	0	20	23	3	20	24	4	Hyper AmpC + Imp
EF31	<i>Enterobacter sp.</i>	27	27	0	6	6	0	6	12	6	OXA-like + AmpC
IF11	<i>K.oxytoca</i>	24	24	0	11	11	0	6	13	7	AmpC + Imp
IF12	<i>P.aeruginosa</i>	32	32	0	12	19	7	6	11	5	OXA-like + AmpC
IF42	<i>A.baumannii</i>	30	30	0	10	16	6	6	12	6	OXA-like + AmpC
EF34	<i>A.baumannii</i>	28	28	0	11	16	5	6	14	8	OXA-like + AmpC
IF13	<i>A.baumannii</i>	28	28	0	9	18	9	6	12	6	OXA-like + AmpC
AR 05	<i>A.baumannii</i>	30	30	0	11	16	5	8	12	4	Carba de classe A
AR 77 B	<i>A.baumannii</i>	30	30	0	10	15	5	6	13	7	OXA-like + AmpC

Résumé :

Objectif : Caractérisation de phénotypes de résistance aux β -lactamines des souches de bacilles à Gram négatif isolées de l'environnement hospitalier du CHU Khelil Amran de Bejaia.

Méthode : 120 prélèvements ont été effectués à partir de l'environnement hospitalier (surface, air, effluent), l'isolement a été fait sur deux géloses de Mac Conkey, la première additionnée d'ertapénème à 0.5 $\mu\text{g/ml}$ et de vancomycine à 16 $\mu\text{g/ml}$, la deuxième additionnée de colistine à 4 $\mu\text{g/ml}$ et de vancomycine à 16 $\mu\text{g/ml}$. Les souches isolées ont fait l'objet d'une identification et d'une caractérisation de la sensibilité vis-à-vis des β -lactamines et d'autres familles d'antibiotiques. Les phénotypes de résistance aux β -lactamines ont été étudiés.

Résultat : Au total, 46 souches de bacilles à Gram négatif ont été identifiées dont 19 souches sont des *A. baumannii*, 11 souches de *P. aeruginosa* et 16 souches d'entérobactéries. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a révélé que presque toutes les souches d'*A. baumannii* sont résistantes au ceftazidime et imipénème. 22 souches sont productrices de carbapénémase associée à une céphalosporinase hyperproduite (AmpC) et 3 souches sont productrices de carbapénémase de classe A. 2 souches sont productrices d'une céphalosporinase associée à une imperméabilité et une souche résistante aux carbapénèmes par un mécanisme non enzymatique.

Mots clés : environnement hospitalier, résistance, carbapénémase, bacilles Gram négative, BLSE.

Summary:

The aim of this study : was to characterize the phenotypic resistant mechanisms of β -lactam determinant in Gram negative bacilli isolated from the hospital environment (surface, air, effluent) from Khelil Amran in Bejaia hospital.

Methodology: 120 samples were taken from the hospital environment (surface, air, effluent). The sample was plated in Mac ConKey agar, the first supplemented with ertapenem (0.5 $\mu\text{g/ml}$), and vancomycin (16 $\mu\text{g/ml}$), the second supplemented with colistin (4 $\mu\text{g/ml}$) and vancomycin (16 $\mu\text{g/ml}$). The identification and the characterization of the sensitivity to β -lactam and other antibiotics and the phenotype of resistance to β -lactam were studied.

Resultat: A total 46 strains of Gram negative bacilli were identified in which 19 strains are *A. baumannii*, 11 strains are *P. aeruginosa* and 16 strains are enterobacteria. The study of antibiotic susceptibility showed that all strains of *A. baumannii* are resistant to ceftazidim and imipenem. 22 strains were found to producing carbapenemase associated to the hyperproduction of cephalosporinase and 3 strains were producing carbapenemase type KPC. 2 strains were producing cephalosporinase associate to impermeability, and one strain were resistant to carbapeneme by non enzymatique mechanisme.

Keywords: hospital environment, resistance, carbapenemase, Gram negative bacilli, ESBL.

