

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

Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme

D'Ingénieur d'Etat en Génie Biologique

Thème

**Caractérisation des phénotypes de résistances aux β -lactamines
des souches de bacilles à Gram négatif isolées des surfaces de
l'environnement hospitalier
du service d'oncologie de l'hôpital d'AMIZOUR**

Présenté par :

M^r YOUSFI Koussaila.

M^r ZERARGA Badis.

Devant le jury :

Président : M^r F. DJOUDI, MAA, Université A/MIRA Béjaia

Promoteur : M^r A.TOUATI, MCA, Université A/MIRA Béjaia

Co-promoteur : M^{me} K. BELHADI, MAB, Université A/MIRA Béjaia

Examineur : M^{lle} F. BEKKA, MAA, Université de Jijel

Examineur : M^{lle} R. TAFOUKT, Doctorante, Université A/MIRA Béjaia

2012/2013

REMERCIEMENTS

Nous remercions Dr A. TOUATI, Mme K. BELHADI pour nous avoir dirigés tout au long de ce travail.

Nous remercions Mr Y. BOUZIDI, Dr S. DAOUDI , Mr M. ABDELI pour leur conseils et aide précieuse.

Nos remerciements vont aussi à l'égard des membres du jury pour avoir accepté d'examiner notre travail.

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail à mes très chers parents :

A mon père pour l'amour du travail inculqué, ses encouragements et son soutien permanent, qui m'ont permis d'aller de l'avant.

A Ma douce et tendre mère, qui a tant sacrifié pour notre réussite, qu'elle puisse trouver dans mon travail, le fruit de son labeur.

A mes deux sœurs Nadra, Djiga et mon adorable petit frère Selyan pour leur présence à mes côtés.

A toute ma famille, mes ami(e)s qui m'ont énormément soutenu et aidé dans les périodes de doutes.

Koussaila.

DEDICACE

Je remercie le dieu tout puissant. Mes prières sur le prophète Mohamed paix et bénédictions sur lui, qui m'éclairent la vie.

Je dédie ce modeste travail aux personnes qui me sont chers

Mes parents que j'aime beaucoup, pour leur soutien, je leur suis redevable toute ma vie, que dieu les protège.

Mes frères et sœurs qui m'ont aidés dans ma vie et dans cette réussite.

Mes amis, spécialement les membres de l'association ERRACHED et ASSIREM avec lesquels j'ai partagé que des bon moments.

A toute personne qui m'a aidée de loin ou de près.

A toute la promotion de génie biologique de l'année universitaire 2012 /2013.

Badis

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AK: Amikacine

Ala : Alanine

AMC : Amoxicilline + Acide Clavulanique

Api : Appareillage et Procédés d'Identification

ARI: Acinetobacter Resistant to Imipénème

ATM: Aztréonam

BGN: Bactéries à Gram Négatif

BLSE : β -lactamases à spectre élargi

BMR : Bactérie Multi-résistantes

C: Chloramphenicol

C1G : Céphalosporine de 1^{ère} génération

C2G : Céphalosporine de 2^{ème} génération

C3G : Céphalosporine de 3^{ème} génération

C4G : Céphalosporine de 4^{ème} génération

CAZ : Céftazidime

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

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CTX : Céfotaxime

CTX-M : Céfotaximase-Munich

DD-test : Double Disque test

EBLSE : Entérobactéries Productrices De Bêta-lactamase à Spectre Elargi

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra-Acétique

FOX / CX: Cefoxitine

GES: Guyana Extended-Spectrum Beta-lactamase

Gly: Glycine

IMI: imipénème-hydrolyzing β -lactamase

IMP: metallo beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*

IN: Infection Nosocomiale

IPM: Imipénème

KPC: *Klebsiella pneumoniae* Carbapénèmase

NA: Acide Nalidixique

NDM: New Delhi Metallo-beta-lactamase

OXA: Oxacillinase

PCR: Polymérase Chain Réaction

PER: *Pseudomonas* extended resistance

PIT: PITton J-S

PLP : Protéines liant la pénicilline

RIF/RA: Rifampicine

Ser : Sérine

SHV : Sulfhydryl Variable

Sme : *Serratia marcescens* Enzyme

TE: Tétracyclines

TEM: Temoneira

TOB: Tobramycine

TR: Trimethoprime-Sulfametoxazole

VEB: Vietnam Extended-spectrum beta-lactamase

VIM : Verona Integron-Encoded Metallo-B-Lactamase

Liste des figures

Figure N°1 : Répartition des souches résistantes par espèce	10
Figure N° 2 : Taux de résistance des souches aux β -lactamines.....	14
Figure N° 3 : Taux de résistance des souches aux autres familles d'antibiotiques.....	14
Figure N° 4 : Taux de résistance par espèces aux antibiotiques	15
Figure N° 5 : Image de synergie obtenue.....	16
Figure N° 6 : Répartition des souches productrices de BLSE selon les sites d'isolement.	18

Liste des tableaux

Tableau N° I : Sites de prélèvement au niveau du service d'oncologie	05
Tableau N° II : Antibiotiques testés	07
Tableau N° III : Répartition des prélèvements par site	09
Tableau N° IV : Répartition des souches résistantes selon les sites d'isolement	11
Tableau N° V: Sensibilité des souches aux antibiotique (Interprétation en catégories cliniques selon le CA-SFM, 2010)	13
Tableau N° VI : Phénotype de résistance aux β -lactamase	17

SOMMAIRE

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	01
Matériel et méthodes	
I. Prélèvements	05
II. Isolement	05
III. Identification	06
IV. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques	07
V. Détection des phénotypes de résistance	08
Résultats	
I. Souches bactériennes	09
II. Sensibilité des souches aux antibiotiques	12
II. a- Sensibilité des souches aux β -lactamines	14
II. b- Sensibilité des souches aux autres familles d'antibiotiques	14
III. Détermination des phénotypes de résistance	16
IV. Indice de multi-résistance (IMR)	17
Discussion	19
Conclusion	23
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction

L'utilisation massive d'antibiotiques en médecine humaine contribue à la sélection et à la diffusion de microorganismes résistants aux antibiotiques. Dans ces dernières années, l'émergence de la résistance aux antibiotiques parmi les bactéries pathogènes dans l'environnement clinique est devenue un grave problème dans le monde entier, ce qui soulève l'inquiétude à propos des risques que peut présenter ces réservoirs de résistance aux antibiotiques sur la santé humaine. (Henriques et *al.*, 2006).

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 services et en touchant le matériel présent, disperse des germes qui peuvent se retrouver sur les surfaces, matériel médical et dans l'air faisant de l'environnement hospitalier une véritable « niche écologique » de germes. Ces derniers évoluent selon leurs capacités intrinsèques de résistance, et selon les désinfectants et antiseptiques utilisés pour le nettoyage et les soins. (Lemmen et *al.*, 2004).

La principale source d'agents pathogènes nosocomiaux était considérée comme la flore endogène du patient, mais une estimation de 20% à 40% des infections nosocomiales ont été attribuées aux infections par contact des mains du personnel de la santé. La contamination des mains du personnel de la santé pourrait à son tour entraîner la contamination des patients à chaque contact direct ou indirectement par la contamination de leur environnement proche (Weber et *al.*, 2010).

Weber et *al.* (1997) ont classé les réservoirs environnementaux en 4 niveaux d'implication (élevé, modéré, faible et non démontré) dans la survenue d'une infection nosocomiale. 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 (Bégué, 1989).

La prévalence des infections nosocomiales impliquant des bactéries multi-résistantes à Gram négatif, n'a cessé d'augmenter dans de nombreux pays à travers le monde depuis 1980. Les bactéries multi-résistantes sont devenues endémiques dans de nombreux hôpitaux. Les micro-organismes responsables d'infection nosocomiales (IN) ont un réservoir soit humain représenté par la flore digestive, respiratoire, cutanée et vaginale, soit situé dans l'environnement (surfaces, eau, air, matériel, etc.) (Lucet et Astagneau, 1998).

Les entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) sont à l'origine d'infections potentiellement sévères à cause des prescriptions d'antibiotiques à large spectre. L'incapacité actuelle à endiguer cette nouvelle épidémie tient à plusieurs raisons : le vaste réservoir d'EBLSE (communautaires et nosocomiales), le non-respect strict des règles d'hygiène élémentaires et la prescription non rationnelle d'antibiotiques en ville comme à l'hôpital (Vodovar *et al.*, 2012).

Au XX^{ème} siècle, les progrès techniques et thérapeutiques ont permis d'envelopper des infections à germes variés, souvent opportunistes, sur des terrains fragilisés : nouveau-nés, immunodéprimés. Ces infections souvent sévères augmentent la mortalité et la morbidité des malades hospitalisés. (Bégué, 1989)

Il est très difficile de parler d'infections nosocomiales chez le patient cancéreux, car la définition de l'infection nosocomiale utilisée n'est pas toujours adaptée au patient cancéreux. De nombreux facteurs de risque spécifiques prédisposent le patient cancéreux aux complications infectieuses. Ces facteurs sont associés à la maladie, à ses traitements, à l'utilisation de cathéters centraux et à la dénutrition souvent associée au cancer. Chez le patient cancéreux, deux facteurs peuvent entraîner une altération du système immunitaire, le cancer et son traitement. Le facteur de risque majeur est la neutropénie. En effet, chez les patients avec un nombre de polynucléaires inférieur ou égal à 0,1 Giga/l pendant une durée d'une semaine et sans antibiotique de couverture, le risque infectieux est de 100 % (Viot *et al.*, 2000).

Chez le patient cancéreux, plusieurs mécanismes de défense immunitaire sont altérés simultanément et favorisent les infections par les germes saprophytes de la peau, des muqueuses et du tube digestif. L'altération de la flore normale endogène par l'antibiothérapie itérative, l'abrasion des muqueuses du tube digestif, les ruptures des barrières anatomiques, tout syndrome obstructif par prolifération tumorale ainsi que les hospitalisations répétées sont autant de facteurs de risque de survenue d'infection (Bégué, 1989).

L'environnement du patient à l'hôpital (air, eau, nourriture, plantes vertes...), les pathologies associées (diabète, cirrhose associée...), son hygiène de vie sont également liés à la survenue d'infection (Viot *et al.*, 2000).

Le dépistage des patients, du personnel et l'échantillonnage de l'environnement montre que les isolats résistants ne représentent qu'une faible proportion de la flore

résistante de l'écosystème hospitalier. Cette population de microorganismes résistants commensaux et environnementaux est un réservoir important d'infection chez les patients immunodéprimés (Bégué, 1989).

Les β -lactamines demeurent à l'heure actuelle les molécules les plus utilisées dans le traitement des infections dues aux bacilles à Gram négatif. Cette large utilisation est principalement liée à leur faible toxicité et à leur pouvoir bactéricide (Robin *et al.*, 2012).

La résistance des bacilles à Gram négatif aux antibiotiques est due à différents mécanismes : pompage de l'antibiotique à l'extérieur de la cellule à l'aide de pompes à efflux, modification de la cible de l'antibiotique, diminution de la perméabilité membranaire par réduction du nombre des porines et le cas classique est la production d'enzymes inactivant l'antibiotique comme l'hydrolyse des β -lactamines par les β -lactamases (Galleni *et al.*, 1995).

Ces enzymes peuvent être chromosomiques ou plasmidique et produites d'une manière inductible ou constitutive. Elles sont sécrétées dans l'espace périplasmique chez les bactéries à Gram négatif ou dans le liquide extracellulaire chez les bactéries à Gram positif (Philippon *et Arlet*, 2006).

Les deux classifications couramment utilisées pour « classer » les bêta-lactamases sont celle d'Ambler et Bush Jacoby, La classification structurale d'Ambler est basée sur la séquence peptidique du site enzymatique et distingue quatre classes. La classe A correspond aux « pénicillinases » inhibées par l'acide clavulanique ; la classe B correspond aux métallo- β -lactamases inhibées par l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) ; la classe C regroupe les « céphalosporinases » non inhibées par l'acide clavulanique ; la classe D correspond aux oxacillinase de sensibilité variable à l'acide clavulanique. Les enzymes des classes A, C et D sont des enzymes à sérine. En revanche, les enzymes de la classe B sont des métallo-bêta-lactamases. La classification fonctionnelle de Bush, Jacoby (2010) repose sur l'activité hydrolytique et la sensibilité des bêta-lactamases aux inhibiteurs. Elle rend compte de leur diversité fonctionnelle au sein des quatre classes structurales d'Ambler (Jacoby, 2010).

Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) sont des enzymes de classe A et D plasmidique (Jacoby, 2010) qui confèrent une résistance à toutes les pénicillines, aux

céphalosporines de 1^{re} et 2^{eme} génération et au minimum a une céphalosporine de 3/4^e génération (C3/4G) ou à l'aztréonam (Robin et *al.*, 2012).

De puis plusieurs années des travaux de recherche sur la caractérisation des mécanismes de résistance aux antibiotiques des souches de bacilles a Gram négatif isolées de différents milieux ont été réalisés au laboratoire d'écologie microbienne. Notre travail est relié à cette thématique. L'objectif de cette étude est l'évaluation du degré de contamination de l'environnement hospitalier au niveau du service d'oncologie de l'hôpital d'Amizour par des bactéries à Gram négatif multi-résistantes. Afin de développer ces aspects, nous avons adopté la méthodologie suivante :

- Isolement et identification des bacilles à Gram négatif à partir des surfaces de l'environnement hospitalier.
- Etude de la sensibilité de ces souches vis-à-vis de différentes familles d'antibiotiques.
- Détermination des phénotypes de résistance aux β -lactamines.

Matériel et méthodes

I. Prélèvements :

Des prélèvements de surfaces hospitalières les plus susceptibles de rentrer en contact avec l'ensemble du personnel médical ainsi que des patients au service d'oncologie de l'hôpital d'Amizour ont été effectués, durant la période allant du 15 au 30 mars 2013.

Le prélèvement a été réalisé par écouvillonnage en utilisant des écouvillons stériles préalablement humidifiés dans du bouillon nutritif, pour frotter les surface concernées (25 cm²) (Lebreton et Simon, 1998). Ils sont par la suite acheminés vers le laboratoire de microbiologie de l'Université de Bejaia pour être incubés à 37C° pendant 24 heures

Tableau N°I : Sites de prélèvement au niveau du service d'oncologie

Surfaces	Sites de prélèvement
Unité de préparation de la chimiothérapie	Paillasse, tables, lavabo, hotte face intérieure et extérieure, poignée de porte, interrupteur.
Salle Laboratoire	Poignée de porte, interrupteur, réfrigérateur, paillasse, placard et bain marie.
Salle de repos	Poignée de porte, interrupteur, robinet, lavabo, bureau, téléphone fixe et combiné, placard, radiateur, chaises, tableau d'affichage.
Couloir	Poignée de porte, boite à extincteur, bouton de climatiseur, radiateurs, lit d'urgence, bordure de fenêtre, prise de climatiseur.
Salles d'administrations de la chimiothérapie	Poignée de porte, poignée de fenêtre, interrupteur, drap, table, poche de sérum, téléviseur, poignée de placard, tensiomètre, chaises, radiateur, bordure du lit, masque à oxygène.
Sanitaire	Porte savon, robinet, lavabo, poignée de porte, interrupteur, chasse d'eau, cuvette.
Personnel	Mains du personnel.

II. Isolement :

Après incubation, 100 µl de la suspension estensemencée sur milieu Mc Conkey, additionnée de céftazidime (4µg /ml). Les boites sont incubées à 37 C° pendant 24h.

III. Identification :

L'identification des souches isolées est basée sur :

- Coloration de Gram.
- Caractères morphologiques : aspect, couleur et forme des colonies. (**Annexe II**)
- Tests biochimiques
 - Galerie classique (**Annexe III**)
 - Confirmation des souches d'*Acinetobacter baumannii* par Incubation a 44C°.
- Galerie API 20E :
 - ✓ On réunit fond et couvercle d'une boîte d'incubation et on répartit environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide et on place la galerie dans la boîte d'incubation.
 - ✓ On prélève quelques colonies et on prépare une suspension bactérienne.
 - ✓ On remplit les **tubes et cupules** des tests **CIT**, **VIP** et **GEL** avec la suspension bactérienne et on remplit **uniquement les tubes** (et non les cupules) des autres tests.
 - ✓ On réalise une anaérobiose dans les tests **ADH, LDC, ODC, H2S, URE** en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
 - ✓ On referme la boîte d'incubation qu'on incube à 37°C pendant 18 à 24 h.
 - ✓ Si 3 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).
 - ✓ Le test d'oxydase constitue le 21^{ème} test d'identification à noter sur la fiche des résultats.
 - ✓ L'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification Apident.
 - ✓ Si le nombre de tests positifs avant ajout des réactifs est inférieur à 3, on réincube la galerie 24 h de plus sans rajouter les réactifs. Après cette deuxième incubation, on révèle les tests nécessitant l'addition des réactifs.
 - ✓ l'identification est obtenue en suivant les recommandations du fabricant (**Annexe IV**).

IV. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques

La sensibilité des souches aux β -Lactamines et aux autres familles d'antibiotiques est testée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du Comité de L'Antibiogramme de la Société Française De Microbiologie (CA-SFM 2012).

Une suspension bactérienne est préparée en dissociant 3 à 5 colonies dans 5 ml d'eau physiologique. On ensemence par écouvillonnage les boîtes de gélose Mueller Hinton et on dépose les disques d'antibiotiques à tester. On incube les boîtes pendant 24h à 37°C.

Les différents antibiotiques testés durant cette étude sont rapportés dans le tableau ci-dessous.

Tableau N°II : Antibiotiques testés

FAMILLE	ANTIBIOTIQUE *	ABREVIATION	Charge ug/disque	R	S
β -LACTAMINE	AMOXICILLINE+ACIDE CLAVULANIQUE	AMC	20/10	< 16	\geq 23
	CEFTAZIDIME	CAZ	30	< 19	\geq 21
	CEFOTAXIME	CTX	30	< 23	\geq 26
	CEFOXITINE	FOX / CX	30	< 15	\geq 22
	IMIPENEME	IPM	10	< 17	\geq 24
	AZTREONAM	ATM	30	< 21	\geq 23
PHENICOLES	CHLORAMPHENICOL	C	30	< 19	\geq 23
CYCLINES	TETRACYCLINE	TE	30	< 17	\geq 19
AMINOSIDES	AMIKACINE	AK	30	< 15	\geq 17
	TOBRAMYCINE	TOB	30	< 16	\geq 18
QUINOLONE	ACIDE NALIDIXIQUE	NA	30	< 15	\geq 20
SULFAMIDE	TRIMETHOPRIME-SULFAMETOXAZOLE	TR	1.25/23.75	< 10	\geq 16
RIFAMPICINE	RIFAMPICINE	RIF/RA	5	< 14	\geq 19

S : sensibles - R : Résistants. * marque des antibiotiques : HIMEDIA

V. Détection des phénotypes de résistance

La production d'une β -lactamase à spectre étendu (BLSE) est détectée par l'épreuve de synergie (DD-test) qui consiste à placer des disques de céfotaxime, céftazidime, cefoxitine, aztréonam, à une distance de 20 mm centre à centre d'un disque d'augmentin (amoxiciline/clavulanate). L'augmentation de la zone d'inhibition et l'apparition d'une image de synergie entre les disques de céftazidime, céfotaxime et/ou aztréonam indique la production d'une BLSE (Jarlier *et al.*, 1988).

Chez les souches productrices de céphalosporinases, la présence d'une BLSE peut être masquée par l'induction de la céphalosporinase par l'acide clavulanique. Dans ce cas, le DD-test est réalisé sur la gélose Mueller Hinton additionnée de cloxacilline avec une concentration finale de 250 $\mu\text{g/ml}$ (Giraud-Morin et Fosse, 2008).

Résultats

I. Souches bactériennes

Au cours de notre étude qui s'est déroulée pendant la période allant du 15 Février au 15 Avril 2013, un total de 100 prélèvements ont été réalisés sur différentes surfaces au niveau du service d'oncologie de l'hôpital d'Amizour.

Tableau N°III : Répartition des prélèvements par site

Site de prélèvements	Nombre de prélèvements
Salle d'administration de la chimiothérapie N°5 -femme-	20
Salle d'administration de la chimiothérapie N°4 -femme-	12
Salle d'administration de la chimiothérapie N°3 -homme-	12
Le personnel médical	11
Couloir	9
Sanitaire	8
Salle de repos du personnel	8
Salle d'évacuation	7
Unité de préparation de chimiothérapie	7
Salle laboratoire	6

Au total, 56 souches de bacilles a Gram négatif ont été sélectionnées sur la gélose Mac Conkey additionnées de la céftazidime à 4µg /ml

Après l'étude de la sensibilité de ces souches vis-à-vis de la céftazidime et de la céfotaxime par la méthode d'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton, seule 20 souches ont été retenus sur la base de leur résistance à ces deux molécules.

L'identification des souches, a révélé 9 *Enterobacter cloacae*, 8 *Acinetobacter baumannii*, 2 *Escherichia coli* et une seule souche de *Klebsiella pneumoniae*, la répartition des souches résistantes par espèces est présentée dans la figure N°1.

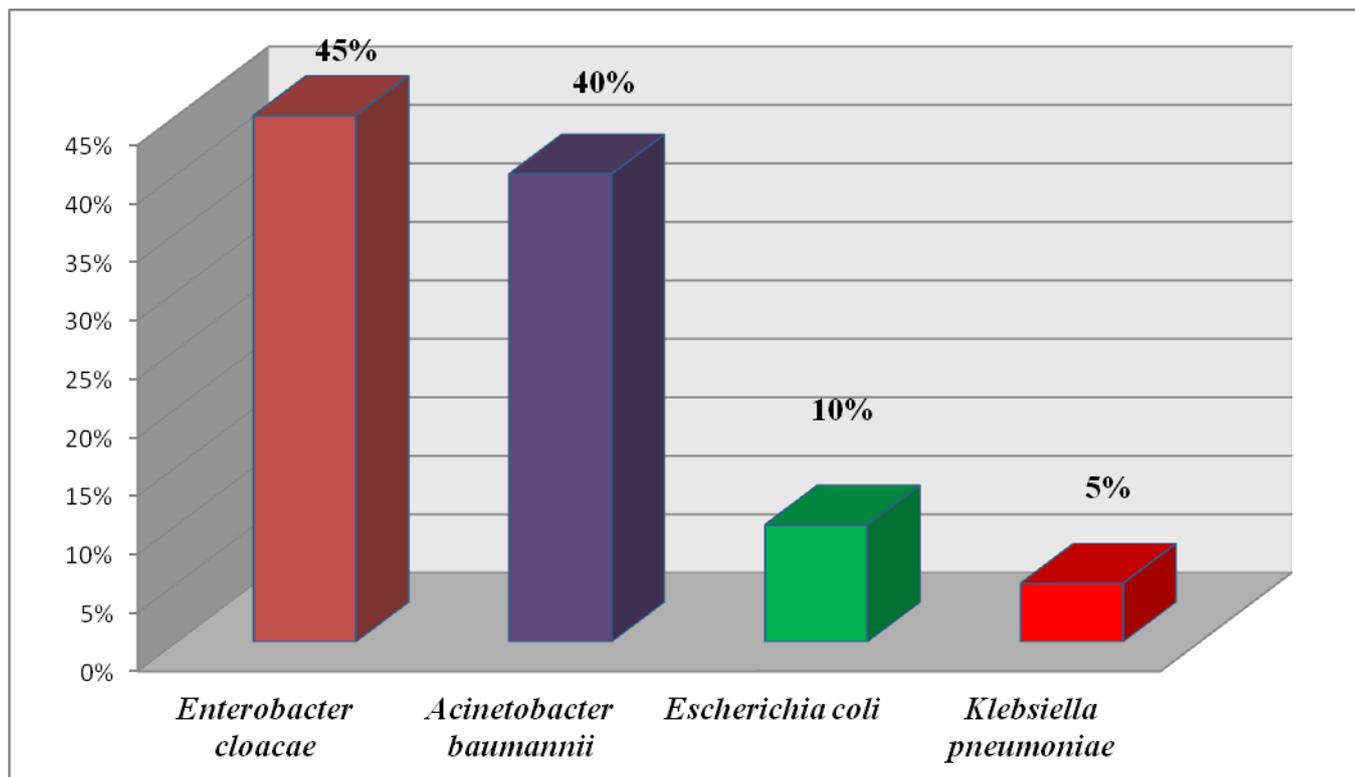


Figure N°1 : Répartition des souches résistantes par espèces.

Les entérobactéries représentent à eux seules 60% des souches isolées avec 45% *Enterobacter cloacae*, 10% *Escherichia coli* et 5% *Klebsiella pneumoniae* et 40% des souches isolées sont des *Acinetobacter baumannii*, les différents sites d'isolement sont donnés dans le tableau suivant.

Tableau N° IV : Répartition des souches résistantes selon les sites d'isolement

CODE	Souches	Salles	Date	Sites de prélèvement
4A	<i>Enterobacter cloacae</i>	Salle d'administration de la chimiothérapie N°5 -femme-	17/02/2013	Drap N°1
04 B	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Salle d'administration de la chimiothérapie N°5 -femme-	17/02/2013	Drap N°1
10 B	<i>Enterobacter cloacae</i>	Salle d'administration de la chimiothérapie N°5 -femme-	17/02/2013	Drap N°2
10 C - RC	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Salle d'administration de la chimiothérapie N°5 -femme-	17/02/2013	Drap N°2
12	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Salle d'administration de la chimiothérapie N°5 -femme-	17/02/2013	Drap N°3
19	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Salle d'administration de la chimiothérapie N°5 -femme-	17/02/2013	Table N°4
20 - A	<i>Enterobacter cloacae</i>	Salle d'administration de la chimiothérapie N°5 -femme-	17/02/2013	Drap N°5
27 A	<i>Enterobacter cloacae</i>	Salle d'administration de la chimiothérapie N°4 -femme-	17/02/2013	Poche de sérum
33	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Salle d'administration de la chimiothérapie N°4 -femme-	17/02/2013	Drap N°3
34 A	<i>Enterobacter cloacae</i>	Salle d'administration de la chimiothérapie N°4 -femme-	17/02/2013	Radiateur
35	<i>Enterobacter cloacae</i>	Salle d'administration de la chimiothérapie N°3 -homme-	18/02/2013	Poignée de porte
38 - B	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Salle d'administration de la chimiothérapie N°3 -homme-	18/02/2013	Poignée de placard
46	<i>Escherichia coli</i>	Salle d'administration de la chimiothérapie N°3 -homme-	18/02/2013	Radiateur
48	<i>Acinetobacter baumannii</i>	sanitaire	18/02/2013	Poignée du robinet
49	<i>Acinetobacter baumannii</i>	sanitaire	18/02/2013	Lavabo
54	<i>Escherichia coli</i>	sanitaire	18/02/2013	Cuvette
66 A	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Couloir	18/02/2013	Lit d'urgence
80 A	<i>Enterobacter cloacae</i>	salle de repos du personnel	18/02/2013	Robinet et lavabo
83	<i>Enterobacter cloacae</i>	salle de repos du personnel	18/02/2013	Placard
98 A	<i>Enterobacter cloacae</i>	salle de repos du personnel	18/02/2013	Bureau

D'après le tableau précédant, le taux de contamination est principalement important au niveau des sanitaires avec 37.5% et cela est probablement dû a un manque d'hygiène, mais aussi au niveau des salles d'administration de la chimiothérapie avec un taux de contamination est de 35% pour la salle N°5 vue que c'est la plus grande possédant 8 lits et accueillant un plus grand nombre de patients et un taux de 25% pour les salles N°4 et N°3, une importante fréquence est retrouvée dans les draps 53%, cela est probablement dû au contact directe et prolongé avec les patients. La salle de repos du personnel et le couloir présentent un taux de contamination de 26.66 et de 11.11% respectivement, la transmission des bactéries multirésistantes (BMR) s'effectue le plus souvent de façon manuportée par l'intermédiaire du personnel soignant. Cela peut être la cause de la présence des ces souches dans la salle de repos du personnel et dans le couloir.

A noter qu'aucun BGN-résistants n'as été isolé au niveau de la salle d'évacuation, la salle laboratoire ainsi que sur l'ensemble des mains du personnelle médical.

II. Sensibilité des souches aux antibiotiques :

La sensibilité des 20 souches aux antibiotiques est donnée dans le tableau V.

Tableau N° V : Sensibilité des souches aux antibiotique (Interprétation en catégories cliniques selon le CA-SFM 2010)

CODE	souches	CTX	CAZ	ATM	CX	AMC	TE	C	AK	NA	RA/RIF	TOB	TR	Synergie
4A	<i>Enterobacter cloacae</i>	28 (S)	6 (R)	14 (R)	14 (R)	24 (S)	18 (I)	18 (R)	18 (S)	6 (R)	14 (I)	22 (S)	6 (R)	-
04B	<i>Acinetobacter baumannii</i>	21 (R)	24 (S)	26 (S)	17 (I)	6 (R)	26 (S)	34 (S)	32 (S)	24 (S)	22 (S)	32 (S)	6 (R)	-
10B	<i>Enterobacter cloacae</i>	28 (S)	6 (R)	14 (R)	8 (R)	23 (S)	26 (S)	21 (I)	29 (S)	6 (R)	23 (S)	24 (S)	29 (S)	-
10CRC	<i>Acinetobacter baumannii</i>	14 (R)	6 (R)	6 (R)	9 (R)	9 (R)	9 (R)	38 (S)	34 (S)	6 (R)	30 (S)	36 (S)	40 (S)	-
12	<i>Acinetobacter baumannii</i>	9 (R)	18 (R)	21 (I)	6 (R)	6 (R)	23 (S)	9 (R)	24 (S)	23 (S)	19 (S)	28 (S)	6 (R)	-
19	<i>Acinetobacter baumannii</i>	24 (I)	6 (R)	12 (R)	20 (I)	24 (S)	28 (S)	25 (S)	30 (S)	6 (R)	28 (S)	26 (S)	6 (R)	-
20A	<i>Enterobacter cloacae</i>	22 (R)	6 (R)	6 (R)	9 (R)	13 (R)	24 (S)	22 (I)	26 (S)	16 (I)	16 (I)	26 (S)	6 (R)	-
27A	<i>Enterobacter cloacae</i>	26 (S)	16 (R)	23 (S)	13 (R)	18 (I)	28 (S)	26 (S)	30 (S)	12 (R)	23 (S)	30 (S)	6 (R)	-
33	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	6 (R)	10 (R)	15 (R)	22 (I)	6 (R)	6 (R)	11 (R)	25 (S)	6 (R)	6 (R)	14 (R)	6 (R)	-
34A	<i>Enterobacter cloacae</i>	32 (S)	18 (R)	28 (S)	10 (R)	25 (S)	18 (I)	30 (S)	30 (S)	24 (S)	18 (I)	30 (S)	14 (I)	-
35	<i>Enterobacter cloacae</i>	19 (R)	20 (I)	22 (I)	9 (R)	6 (R)	25 (S)	12 (R)	26 (S)	25 (S)	16 (I)	26 (S)	16 (S)	-
38B	<i>Acinetobacter baumannii</i>	25 (I)	6 (R)	6 (R)	12 (R)	12 (R)	24 (S)	28 (S)	35 (S)	6 (R)	35 (S)	40 (S)	34 (S)	-
46	<i>Escherichia coli</i>	27 (S)	6 (R)	6 (R)	20 (I)	23 (S)	24 (S)	20 (I)	24 (S)	6 (R)	24 (S)	20 (S)	24 (S)	+
48	<i>Acinetobacter baumannii</i>	18 (R)	19 (R)	21 (I)	7 (R)	6 (R)	22 (S)	9 (R)	25 (S)	23 (S)	12 (R)	30 (S)	13 (I)	-
49	<i>Acinetobacter baumannii</i>	17 (R)	6 (R)	11 (R)	6 (R)	18 (I)	6 (R)	24 (S)	13 (R)	6 (R)	19 (S)	22 (S)	27 (S)	-
54	<i>Escherichia coli</i>	9 (R)	7 (R)	16 (R)	20 (I)	6 (R)	9 (R)	25 (S)	23 (S)	6 (R)	6 (R)	16 (I)	6 (R)	+
66A	<i>Acinetobacter baumannii</i>	23 (I)	14 (R)	22 (I)	11 (R)	6 (R)	20 (S)	20 (I)	26 (S)	20 (S)	18 (I)	26 (S)	12 (I)	-
80A	<i>Enterobacter cloacae</i>	22 (R)	6 (R)	17 (R)	14 (R)	10 (R)	15 (R)	30 (S)	26 (S)	16 (I)	32 (S)	34 (S)	24 (S)	-
83	<i>Enterobacter cloacae</i>	26 (S)	6 (R)	6 (R)	8 (R)	25 (S)	30 (S)	26 (S)	32 (S)	10 (R)	29 (S)	32 (S)	6 (R)	-
98A	<i>Enterobacter cloacae</i>	23 (I)	6 (R)	6 (R)	10 (R)	16 (I)	16 (R)	20 (I)	28 (S)	9 (R)	19 (S)	24 (S)	6 (R)	-

Légende : Céfotaxime (CTX), Céfotazidime (CAZ), Aztréonam (ATM), Cefoxitine (CX/FOX), Acide nalidixique (NA), Amikacine(AK), Tétracycline(TE), Triméthoprim (TR), Tobramycine(TOB), Amoxiciline+Acide Clavulanique (AMC), Chloramphénicol (C), Rifampicine (RIF/RA).

a- Sensibilité des souches aux β -lactamines :

Une forte résistance au β -lactamine est observée, Toutes les souches isolées sont résistantes a la cefoxitine, elles présentent un taux de résistance de 95% au céftazidime, 85% a l'aztréonam et 70% des souches sont respectivement résistantes au céfotaxime et a l'amoxiciline+acide clavulanique.

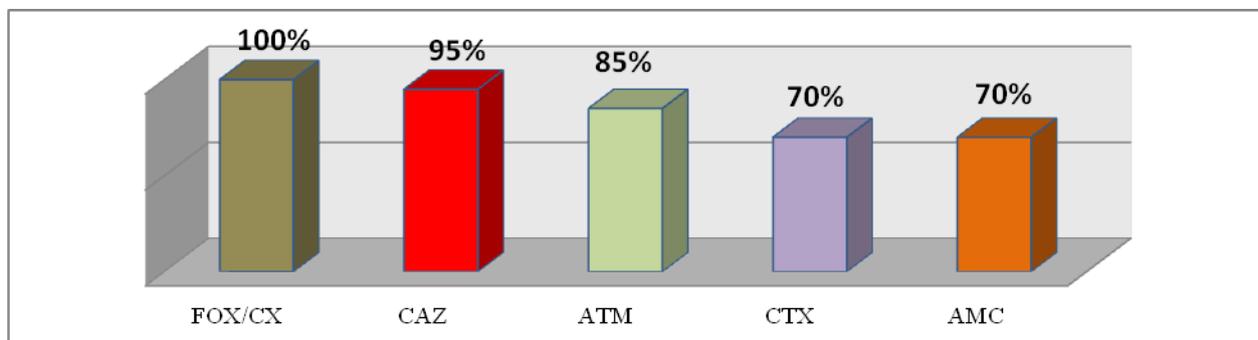


Figure N°2 : Taux de résistance des souches aux β -lactamines.

a- Sensibilité des souches aux autres familles d'antibiotiques

Concernant les autres familles d'antibiotiques, on observe un taux de résistance élevé à l'acide nalidixique, au triméthoprime et au chloramphénicol avec respectivement 70, 65 et 50%, les souches sont résistantes a la tétracycline et de la rifampicine avec un taux de 40%.

La tobramycine et l'amikacine gardent une bonne activité sur les souches, puisque deux souches sont résistantes à la tobramycine et 1 seule est retrouvée résistante à l'amikacine.

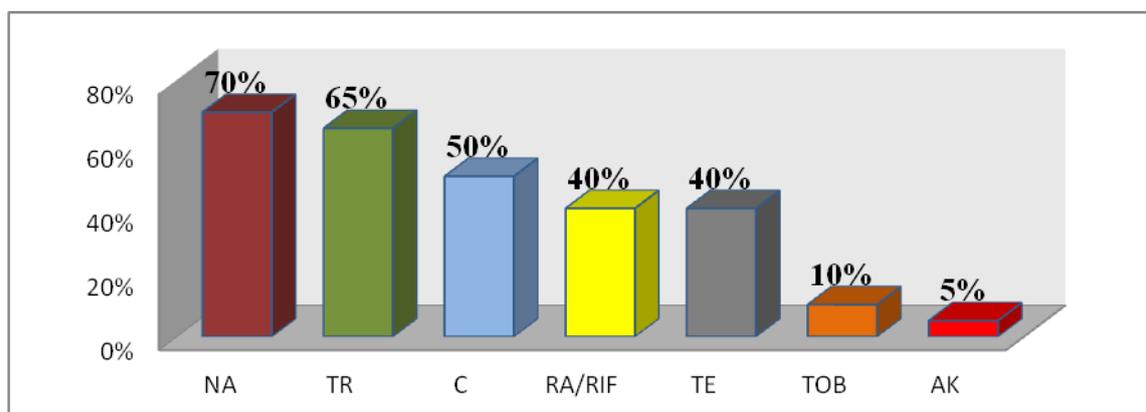


Figure N°3 : taux de résistance des souches autres familles d'antibiotiques

Les taux de résistance des souches par espèces aux antibiotiques sont présentés dans la figure N°4.

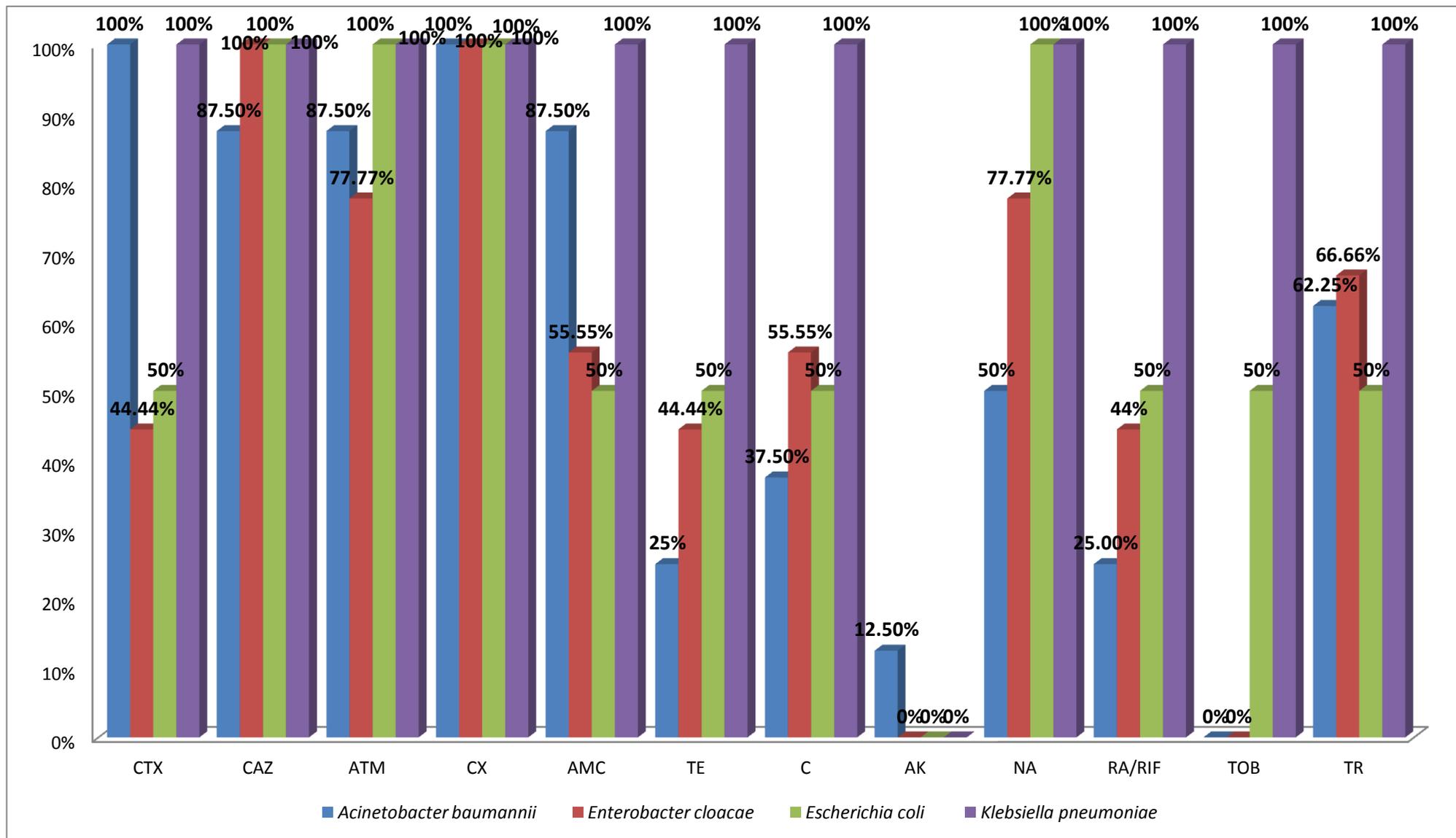


Figure N°5 : Taux de résistance des souches par espèces aux antibiotiques

La figure ci-dessus montre que toutes les souches d'*Escherichia coli* sont résistantes à la Céfotaxime, la ceftazidime, l'aztréonam et à l'acide nalidixique, ces souches présentent un taux de résistance de 50% respectivement pour cefotaxime, amoxicilline+acide, clavulanique, tetracycline, chloramphenicol, rifampicine, tobramycine, les deux souches d'*Escherichia coli* sont sensibles à l'amikacine.

100% des souches d'*Enterobacter cloacae* résistent à la ceftazidime et à la céftazidime et présentent une forte résistance à l'acide nalidixique et à l'aztréonam avec un taux de 77,77%. Aucune souches n'est résistante à la tobramycine ni à l'amikacine. Il est à signaler qu'*Enterobacter cloacae* est naturellement résistant à la ceftazidime.

La souche de *Klebsiella pneumoniae* présente une multi-résistance vis-à-vis de la totalité des antibiotiques testés sauf pour l'Amikacine, on remarque qu'elle est résistante à la ceftazidime et présente une BLSE négative, notre souche *Klebsiella Pneumoniae* présente probablement une AmpC plasmidique acquise.

Les souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées sont 100% résistantes à la ceftazidime et au céfotaxime, elle sont résistantes à un taux de 87.50% à la céftazidime, l'aztréonam et à l'Amoxicilline+Acide clavulanique, une seule souche est résistante à l'amikacine et tous les *Acinetobacter baumannii* isolés sont sensibles à la tobramycine.

III-Détermination des phénotypes de résistance

Le DD-test effectué pour les souches résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération(C3G) sur gélose Mueller Hinton a révélé la présence d'une image de synergie (figure 5) chez les deux souches d'*Escherichia coli* ce qui indique la présence probable d'une BLSE chez ces souches (Tableau V).

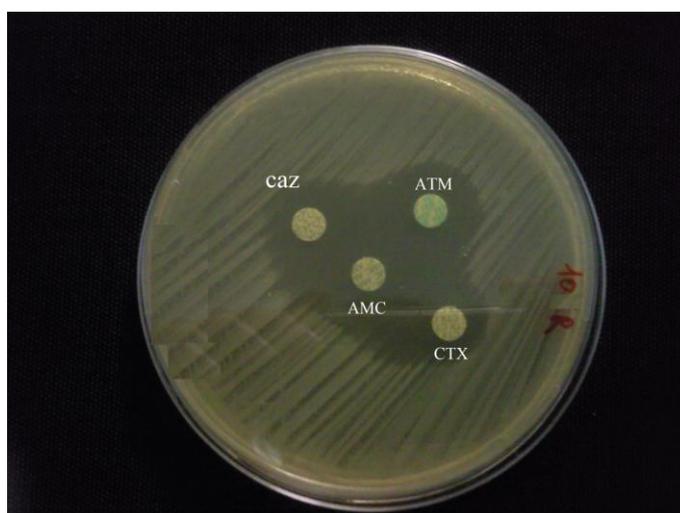


Figure N°5 : image de synergie obtenue

Le DD-test sur gélose Mueller Hinton à la cloxacilline effectué pour les souches résistantes à la cefoxitine (Tableau V) a permis d'obtenir les résultats suivants : 9 souches d'*Enterobacter cloacae* qui sont hyperproductrices de leur céphalosporinase avec une image de synergie, 8 souche d'*Acinetobacter baumannii* qui possédant une hyperexpression de leur céphalosporinase chromosomique et 1 souche de *Klebsiella pneumoniae* qui est probablement productrices d'AmpC plasmidique.

IV. Indice de multi-résistance (IMR)

L'indice de la multi-résistance aux antibiotiques est calculé selon le rapport du nombre d'antibiotiques auxquels la souche est résistante sur le nombre total d'antibiotique testés. Cet indice nous renseigne sur la multi-résistance de la souche. On note d'après le tableau N°V que les 20 souches étudiées expriment une résistance vis-à-vis de 4 à 11 antibiotiques. L'indice de multi-résistance des souches varie de 0,33 à 0,91. La souche de *K. pneumoniae* possède l'indice de résistance le plus élevé.

Tableau N°VI : Phénotype de résistance aux β -lactamine

CODE	Souches	DD teste	DD-teste + cloxa	IMR	Phénotype
4A	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	0,66	BLSE+AmpC
04B	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	+	0,33	AmpC
10B	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	0,41	BLSE+AmpC
10CRC	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	+	0,58	AmpC
12	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	+	0,50	AmpC
19	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	+	0,50	AmpC
20A	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	0,75	BLSE+ / AmpC
27A	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	0,41	BLSE+ / AmpC
33	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	0,91	BLSE+ / AmpC
34A	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	0,41	BLSE+ / AmpC
35	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	0,58	BLSE+ / AmpC
38B	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	+	0,5	AmpC
46	<i>Escherichia coli</i>	+	Nd	0,41	BLSE +
48	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	+	0,66	AmpC
49	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	+	0,66	AmpC
54	<i>Escherichia coli</i>	+	Nd	0,83	BLSE +
66A	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	+	0,58	AmpC
80A	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	0,58	BLSE+ / AmpC
83	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	0,41	BLSE+ / AmpC
98A	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	0,75	BLSE+ / AmpC

La distribution des souches productrices de BLSE au sein du service d'oncologie se caractérise par un taux important de 33,33% sur les draps des différentes Salle d'administration de la chimiothérapie, un taux de 16.66% est retrouvé au niveau des radiateurs des même salles et 8.33% des souches sont retrouvées équitablement entre la poche du sérum, poignée de porte, cuvette, robinet, placard et bureau.

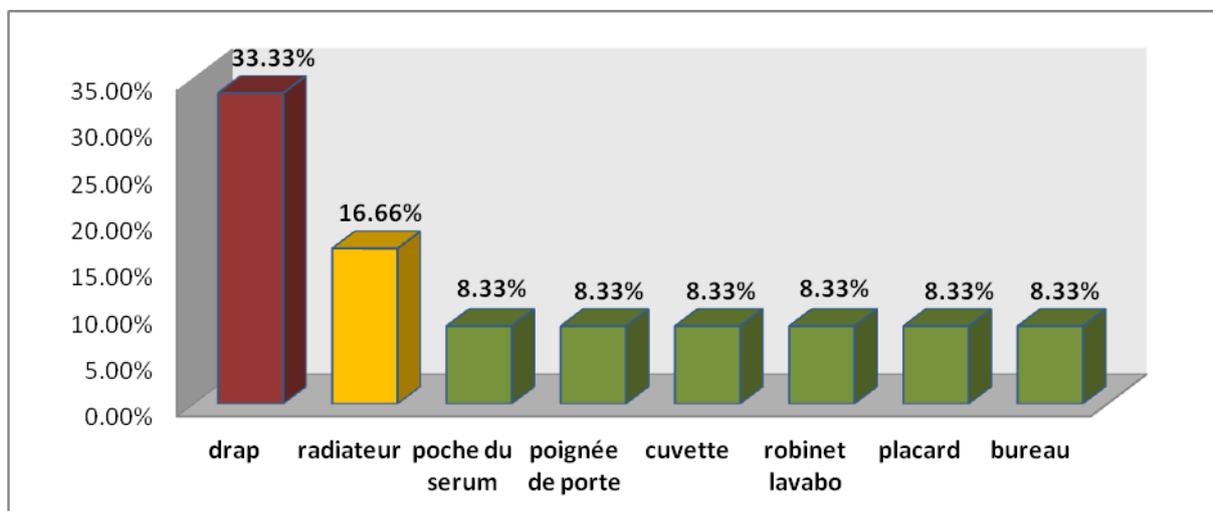


Figure N°6 : Répartition des souches productrices de BLSE selon les sites d'isolement

Discussion

Au cours de notre étude nous avons évalué le taux de contamination des surfaces hospitalières par les bacilles à Gram négatif résistants aux C3G. Cette étude comporte certaines limitations. Tout d'abord, le nombre de prélèvements analysés et le nombre d'isolats obtenu sont relativement faibles et enfin la période d'exécution est limitée à un mois. Mais cela n'empêche pas que les résultats obtenus offrent des informations importantes concernant la contamination de diverses surfaces par des BGN résistants aux antibiotiques.

L'analyse microbiologique effectuée a permis de conclure que 20% des prélèvements contenait des bacilles à Gram négatif multi-résistants, 12 souches d'entérobactéries et 8 souches d'*Acinetobacter baumannii* ont été isolées. Cela confirme que ces BGN sont présents dans l'environnement hospitalier ce qui fait de ce dernier un réservoir potentiel d'infection pour les patients (Talon, 1999).

Notre étude nous a permis d'isoler 45% d'*E.cloacae*, 40% d'*Acinetobacter baumannii*, 10% d'*E. coli* et 5% de *K. pneumoniae*. Une étude similaire a été réalisée en Allemagne sur la distribution des bactéries multirésistantes dans le milieu hospitalier a rapporté des taux de 11% d'*E.cloacae*, 11% *Acinetobacter sp*, 4,4% d'*E.coli* et 3,7% de *K. pneumoniae*, (Lemmen et al., 2004). Une autre étude a été réalisée au Cote d'Ivoire plus récemment, cette dernière a donné les résultats suivants : 11.8% de *K. pneumoniae*, 5.6% *Enterobacter*, 0.7% d'*Escherichia coli* et de 31,5% d'*Acinetobacter sp*. (Méité et al., 2010).

La très grande majorité des souches d'entérobactéries productrices de BLSE dont les souches d'*E.coli*, sont résistantes à d'autres familles d'antibiotiques que les β -lactamine notamment les fluoroquinolones à la tétracycline, aminosides (Lefort et Chanoine, 2012).

Dans cette étude, les souches d'entérobactéries ont montré une résistance élevée à l'acide nalidixique (83.33%), au triméthoprime (66.66%) et à la tétracycline (50%). Nous avons aussi constaté que toutes les souches d'entérobactéries sont résistantes à la céftazidime et à la cefoxitine, (83.33%) résistantes à l'aztréonam. La tobramycine et l'amikacine gardent une bonne activité sur les souches, puisqu'une seule souche est résistante à la tobramycine, et le taux de résistance est nul pour l'amikacine.

La production de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) chez les BGN est considéré comme le mécanisme de résistance le plus fréquemment rencontrée chez les souches résistantes aux C3G. Dans les années précédentes, des BLSE (de type SHV et TEM) préférentiellement portées par *Klebsiella pneumoniae* et d'*Enterobacter aerogenes* diffusaient

de manière épidémique au sein des structures hospitalière (Lucet et Birgand., 2011) plus récemment de nouvelle BLSE non dérivées des pénicillinases ont émergé comme les céfotaximase de type CTX-M et les ceftazidimase de type PER, GES et VEB c'est chez *E.coli* que la progression est la plus nette passant de moins de 10% en 1995 à 55% en 2008 (Mariani et al.,2012).

Le taux de distribution des souches productrices de BLSE au sein du service d'oncologie se caractérise par un taux important au niveau des draps avec 33.33 %, 16.66% est retrouvé sur les radiateurs et 8.33% des souches sont retrouvées équitablement entre la poche du sérum, poignée de porte, cuvette, robinet, placard et bureau, ces résultats se concorde avec ceux trouvé par Méité et al., en 2010.

La détermination des phénotypes de résistance a donné les résultats suivant : 02 souches *E.coli* BLSE, 09 *Enterobacter cloacae* hyperproductrices de leur AmpC en association avec une BLSE, 08 *Acinetobacter baumannii* hyperproductrices de leur AmpC chromosomique, et une *Klebsiella pneumoniae* productrices de son AmpC plasmidique en association avec une BLSE et les 8 souches d'*Acinetobacter baumannii* ne sont pas résistantes à l'imipénème, le type définitif de BLSE ne peut être déterminé qu'après amplification par PCR.

Le pourcentage d'*A. Baumannii* à 40% reste inquiétant vu qu'il s'agit du type même d'espèce bactérienne responsable d'infection nosocomiale, il est habituellement très pathogène pour l'homme, il représente 5 à 10% des infections nosocomiales, la production à un niveau élevé de la céphalosporinase naturelle chez *A. baumannii*, explique que certaines souches soient alors résistantes aux céphalosporines de 3ème génération (Nordmann, 2004).

Les souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées ont montré une résistance importante au β -lactamines, Nous avons constaté que la totalité des souches sont résistantes à la céfotaxime et à la cefoxitine, (87.5%) sont résistantes à la céftazidime, à l'amoxicilline + acide clavulanique et à l'aztréonam.

Dans les années 1970, les *Acinetobacter* étaient sensibles à la majorité des antibiotiques : β -lactamines, aminosides, tétracyclines, quinolones,...etc. Aujourd'hui, *Acinetobacter baumannii* est considéré comme l'un des bacilles à Gram négatif les plus résistants à l'ensemble des antibiotiques, *Acinetobacter baumannii* peut exprimer, avec un niveau de production variable, une bêta-lactamase de type céphalosporinase susceptible

d'inactiver les aminopénicillines et les céphalosporines de première et deuxième génération, Les C3G et l'aztréonam n'ont souvent qu'une faible activité ; 60 à 80 % des souches sont également résistantes aux uréidopénicillines par production d'une pénicillinase (TEM1, TEM2, CARB5). L'acide clavulanique actif sur les pénicillinases n'est généralement pas suffisant pour restaurer une bonne activité thérapeutique, La céftazidime est la céphalosporine reste la plus active, mais 40 à 80 % des souches sont actuellement résistantes à cet antibiotique par production d'une céphalosporinase dé réprimée. (Annie et Maurice., 2013).

Acinetobacter est naturellement résistant à bas niveau au triméthoprime, La résistance à haut niveau est due à un gène de résistance placé sur un plasmide (Annie et Maurice., 2013), nos souches isolées présentes une résistance de 62,25 % a la triméthoprime.

La rifampicine possède une activité intéressante sur *Acinetobacter*, mais les risques de mutation vers la résistance sont élevés Son utilisation ne peut être intéressante qu'en association avec une autre molécule (Laure et Guillou., 2004).

Nos résultats montrent que nos souches d'*Acinetobacter baumannii* présentent une résistance de 25% à la rifampicine

La résistance aux fluoroquinolones est apparue très rapidement après l'introduction des nouvelles quinolones en pratique clinique. La fréquence de la résistance à l'acide nalidixique était déjà de 78 % en 1985. Entre 1985 et 1995, Les mécanismes de résistance aux quinolones sont liés à une ou des mutations sur l'ADN gyrase. Ces mutations semblent intervenir sur les résidus Gly-81, Ser-83, Ala-84, dont les substitutions chez *Escherichia coli* s'accompagnent également de la résistance aux fluoroquinolones. (Laure et Guillou., 2004)

Nos résultats montrent que nos souches d'*Acinetobacter baumannii* présentent une résistance de 50% à l'acide nalidixique.

Les souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées présentent un faible taux de résistance a l'amikacine de 12.50%, mais toutes les souches sont sensibles a la tobramycine, La résistance à l'amikacine est plasmidique et transférable par conjugaison La résistance à l'amikacine et à la tobramycine est en augmentation (Annie et Maurice., 2013). Mais La présence de ce gène (AAC (6')-I_g) n'implique pas systématiquement l'expression phénotypique de la résistance (Laure et Guillou., 2004).

La Résistance à l'imipénème est un Mécanismes récents de faible fréquence mais possèdent un impacte important du fait des implications épidémiques vue que l'imipénème est le traitement de référence des infections à *Acinetobacter*, Plusieurs types d'enzymes ont été décrits. Les plus fréquents sont : ARI-1 (OXA-23) et ARI-2, ces enzymes n'ont pas les caractéristiques des métalloenzymes classiquement décrites dans la résistance à l'imipénème (Annie et Maurice., 2013). Toutes nos souches d'*Acinetobacter baumannii* sont sensibles à l'imipénème.

Conclusion

Notre étude a montré que les bacilles à Gram négatif sont omniprésents sur les surfaces de l'environnement hospitalier, cette étude a attiré une attention particulière sur le degré de contamination des surfaces à proximité des patients (draps, tables, placard, robinet), ce qui les place en ligne de mire vis-à-vis des infections nosocomiales.

Sur les 100 prélèvements effectués, 20 souches de bacilles à Gram négatif résistantes ont été isolées et identifiées, dont 8 *Acinetobacter baumannii*, 9 *Enterobacter cloacae*, 2 *Escherichia coli*, une seule souche de *Klebsiella pneumoniae*.

Ces souches ont montré une résistance importante aux différents antibiotiques testés et cela est probablement dû à une production de BLSE chez les entérobactéries ainsi qu'à la production d'une oxacillinase dans le cas des souches d'*Acinetobacter baumannii*.

Ces résultats ont appuyé l'hypothèse que les surfaces puissent servir de réservoirs de microorganismes multi-résistants et donc présentent un risque important dans la transmission des infections nosocomiales, plus particulièrement dans le cas des patients immunodéprimés.

Aujourd'hui plus que jamais, la maîtrise de la dissémination des BGN doit passer par l'éducation du personnel en matière d'hygiène, la désinfection des surfaces en milieu hospitalier, le respect des procédures de lavage des mains, ainsi qu'une politique cohérente d'hygiène notamment dans les services à forte prévalence. Ces recommandations sont utiles et constituent un des facteurs contribuant à l'amélioration de la qualité de la prise en charge des patients.

Ainsi, notre travail mérite d'être exploité et complété par :

- L'étude moléculaire pour déterminer les mécanismes impliqués dans cette résistance.
- L'élargissement de l'étude sur toute la flore environnementale pour inclure les bactéries à Gram positif
- L'extension de la zone d'étude sur l'ensemble du personnel médical et sur les patients à risque potentiel, pendant une période plus longue
- Interpréter le lien entre la contamination de l'environnement hospitalier, et les infections nosocomiales.
- Relier le portage des BMR chez les immunodéprimés et les BMR retrouvés dans l'environnement hospitalier.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

Annie-M. and Maurice-R. (2013). Nosocomial Infections in the Immunocompromised Adult. *The American Journal of Medicine*.**3**,398-404.

Bégué P. (1989). Conduite générale du traitement dans l'infection nosocomiale de l'enfant. *Médecine et maladies infectieuses. Bis*. **10**: 511-514.

Coullioud D., Van der Auwera P., Viot M. and Lassset C. (1993). Prospective multicentric study of the etiology of 1051 bacteremic episodes in 782 cancer patients. Fench- Belgian Study Club infectious Diseases in Cancer. *support Care Cancer*. **1**, 34-46.

Galleni M, Lamotte-Brasseur J, Raquet X, Dubus A, Monnaie D, Knox J.R. & J.- M.Frère. (1995). The enigmatic catalytic mechanism of active-site serine β -lactamases. *Biochem Pharmacol*. **49**: 1171-1178

Giraud-Morin C. and Fosse T. (2008). Evolution récente et caractérisation des entérobactéries productrices de BLSE au CHU de Nice (2005-2007). *Pathologie biologie*. **56**: 417-423.

Guillaume K., Podglajen I., Vaupré S., Colardelle N., Buu-Hoï A. and Gutmann L.(2004). molecular epidemiology of extended-spectrumbeta-lactamase-producing enterobacteriaceae isolated from environmental and clinical specimens in a cardiac surgery intensive care unit. *Infection Control Hospita Epidemiology*. **25**:852-855.

Henriques I.S., Fonseca F., Alves A., Saavedra M.J. and Correia A., (2006). Occurrence and diversity of integrons and β -lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. *Research in Microbiology*. **157**, 938–947.

Jacoby G.A. and Bush K. (2010). Updated Functional Classification of β -Lactamases. antimicrobial agents and chemotherapy. *Rev*.**54**: 969–976.

Jarlier V.,Nicolat M.H.,Fournier G.and PhiliponA.(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

Lebreton-Doussaud V. and Simon L. (1998). Assurance qualité des préparations stériles : évaluation des techniques de prélèvements microbiologiques sur des surfaces. *Journal de Pharmacie Clinique*. 17 Suppl.4: S227-31,

Lefort A. and Nicolas-Chanoine MH.2012.Les enterobacteries productrices de b-lactamases à spectre étendu(BLSE)et céphalosporines de troisième génération en 2012. *journal de anti-infectieux*.**14**, 51-57.

Lemmen S W., Häfner H., Zolldann D., Stanzel S. and Lütticken R. (2004). Distribution of multi-resistant Gram-negative versus Gram-positive bacteria in the hospital inanimate environment. *Journal of Hospital Infection*. **56**, 191–197.

Lucet J C. and Astagneau P. (1998). Infections nosocomiales et environnement hospitalier. Edition : Flammarion. Médecine-Sciences. Paris. 06p.

Lucet J C. and birgand G. (2011). Les bacilles à Gram négatif multi-résistants : ou va-t-on ?. *journal des anti-infectieux*. **13**, 122-132.

Mariani-kurkjian P., Doit C. and Bingen E. (2012). Enterobacteries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu en pédiatrie. *Archive de pediatrie*. **19**, 93-96.

Méité S., Boni-Cissé C., Monemo P., Mlan Tanoa Ap., Faye-Ketté H. And Dosso H. (2010). Surveillance microbiologique des surfaces au niveau d'un etablissement hospitalierde niveau Tertiaire : Exemple du CHU Deyopougou, Abidjan, Cote d'ivoire. *pharmacologie biologie*.**11**, 73-81.

Nordmann P. (2004). *Acinetobacter baumannii*,le pathogène nosocomial par excellence. *Pathologie biologie*. **52**,301-303.

Phillippon A, Arlet G. (2006). β -lactamases de bacilles à Gram négatif: le mouvement perpetuel. *J Ann Biologie Clinique*. **64**, suppl 1: S37-51.

Robin F., Gibold L. and Bonnet R. (2012). Résistances naturelles et acquises aux β -lactamines chez les entérobactéries: comment les identifier en pratique quotidienne ?.*Revue francophone des laboratoires*.**445**, 12.

Talon D. (1999). The role of the hospital environment in the epidemiology of multi-resistant bacteria. *Journal of Hospital Infection*. **43**: 13–17.

Viot M., blanc-vincent M P., Béal J., Biron P., Boutard P., Bussy Malgrange V., Crokaert F., Escande M C., Fuhrmann C., Lesimple P., Pény J., Pottcher B., Raveneau J., Senet J M. and Thyss A. (2000). Infection et cancer: notion générales et questions actuelles. *La presse médicale*. **29** : 1630-33

Vodovar D., Marcadé G., Raskine L., Malissin I., and Mégarbane B. (2012). Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi : épidémiologie, facteurs de risque et mesures de prévention. *la revue de médecine interne*. **10** : 4457-7.

Weber D J., Rutala W A., Miller M B., Huslage K. and Sickbert-Bennett M. (2010). Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care associated pathogens: Norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. *Am J Infect Control*. **38**, 25-33.

Annexes

Annexe I

Composition des milieux de culture et Réactifs utilisés

Gélose Mac Conkey

Peptone de caséine.....	17(g/l)
Peptone de viande.....	03(g/l)
Lactose.....	10(g/l)
Mélange de sels biliaires.....	1,5(g/l)
Chlorure de sodium.....	05(g/l)
Rouge neutre.....	0,03(g/l)
Cristal violet.....	0,001(g/l)

pH= 7,4

Gélose Mueller Hinton

Infusion de viande de bœuf.....	3(g/l)
Hydrolysate de caséine.....	17,5(g/l)
Amidon.....	1,5(g/l)
Agar.....	17(g/l)

pH= 7,4

Milieu de Citrate de Simmons

Citrate de sodium.....	02 (g/l)
Chlorure de sodium.....	05(g/l)
Sulfate de magnésium.....	0,2(g/l)
Phosphate mono ammoniac.....	01 (g/l)
Phosphate bipotassique.....	01(g/l)
Bleu de bromothymol.....	0,08(g/l)
Agar.....	15(g/l)

pH= 7,1

Gélose de conservation

Extrait de viande	5(g/l)
Peptone	10(g/l)
NaCl.....	5(g/l)
Agar	10(g/l)

pH=7,3

Milieu de Triple Sugar Iron (TSI)

Extrait de viande de bœuf.....	03(g/l)
Extrait de levure.....	03(g/l)
Peptone tryptique.....	20(g/l)
Chlorure de sodium.....	05(g/l)
Citrate ferrique.....	0.3(g/l)
Thiosulfate de sodium.....	0,3(g/l)
Lactose.....	10(g/l)
Glucose.....	01(g/l)
Saccharose.....	10(g/l)
Rouge de phénol.....	0,05(g/l)
Agar.....	12(g/l)

pH= 7.4

Milieu Clark-Lubs

Peptone tryptique de viande.....	05(g/l)
Phosphate bipotassique.....	05(g/l)
Glucose.....	06(g/l)

pH= 7

Bouillon nitraté

Infusion cerveau-cœur.....	25(g/l)
Nitrate de potassium.....	10(g/l)

pH= 7,4

Eau peptonée

Peptone exemple d'indole.....	15(g/l)
Chlorure de sodium.....	05(g/l)

PH= 7,2

Bouillon nutritif

Peptone de viande.....	4,3(g/l)
Peptone de caseine.....	05(g/l)
Chlorure de sodium.....	6,4(g/l)

pH=7,5

L'eau physiologique

NaCl.....	9(g/l)
-----------	--------

pH= 7,4

Réactifs de Kovacs

Para-dimethyl-amino-benzaldéhyde	10ml
Alcool isoamylique	150ml
Acide chlorhydrique	50ml

Réactifs de Voges-Proskauer I et II

VPI : Soude caustique (NaOH)	6g
VPII : Alphanaphtol Alcool 95°C	100ml

Rouge de methyl

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

Réactif de Griess I (NRI)

Acide parasulfanilique8g

Acide acétique 5N.....1L

Réactif de Griess II (NRII)

A-naphtylamine6g

Acide acétique 5N1L

Annexe II

Caractères morphologiques des souches isolées

Souches	Couleur	Forme	Aspect
<i>Enterobacter cloacae</i>	rose	large	muqueuse /Plate
<i>Acinetobacter baumannii</i>	translucide	moyenne	muqueuse/bombé
<i>Escherichia coli</i>	rouge	petite	Légèrement bombé
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	rose	Grosse	muqueuse/bombé

Annexe III

Résultats de la Galerie biochimique classique

Code	Citrates De Simmons	TSI					B. nitraté	Eau peptonné exon d'indol	Clark et Lubs	
		GLU	SAC	LAC	GAZ	H2S			VP	RM
4A	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
04 B	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
10 B	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
10 C - RC	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
12	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
19	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
20 - A	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
27 A	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
33	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
34 A	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
35	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
38 - B	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
46	-	+	+	+	+	-	+	44+/37+	-	+
48	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
49	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
54	-	+	+	+	+	-	+	44+/37+	-	+
66 A	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
80 A	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
83	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
98 A	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-

Annexe IV

Recommandation pour la lecture de la galerie API20.

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
ONPG	2-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0,223	β-galactosidase (Ortho NitroPhényl-βD-Galactopyranosidase)	incolore	jaune (1)
<u>ADH</u>	L-arginine	1,9	Arginine DiHydrolase	jaune	rouge / orangé (2)
<u>LDC</u>	L-lysine	1,9	Lysine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
<u>ODC</u>	L-ornithine	1,9	Omithine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
<u>CIT</u>	trisodium citrate	0,756	utilisation du CITrate	vert pâle / jaune	bleu-vert / bleu (3)
<u>H₂S</u>	sodium thiosulfate	0,075	production d'H ₂ S	incolore / grisâtre	dépôt noir / fin liseré
<u>URE</u>	urée	0,76	UREase	jaune	rouge / orangé (2)
TDA	L-tryptophane	0,38	Tryptophane DésAminase	jaune	<u>TDA / immédiat</u> marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	0,19	production d'INDole	incolore vert pâle / jaune	<u>JAMES / immédiat</u> rose
<u>VP</u>	sodium pyruvate	1,9	production d'acétoïne (Voges Proskauer)	incolore / rose pâle	<u>VP 1 + VP 2 / 10 min</u> rose / rouge (5)
<u>GEL</u>	gélatine (origine bovine)	0,6	Gélatinase (GELatine)	non diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	1,9	fermentation / oxydation (GLUcose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune / jaune gris
MAN	D-mannitol	1,9	fermentation / oxydation (MANnitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
INO	inositol	1,9	fermentation / oxydation (INOsitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
SOR	D-sorbitol	1,9	fermentation / oxydation (SORbitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
RHA	L-rhamnose	1,9	fermentation / oxydation (RHAmnose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
SAC	D-saccharose	1,9	fermentation / oxydation (SACcharose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
MEL	D-melibiose	1,9	fermentation / oxydation (MELibiose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
AMY	amygdaline	0,57	fermentation / oxydation (AMYgdaline) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
ARA	L-arabinose	1,9	fermentation / oxydation (ARAbinose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
OX	(voir notice du test oxydase)		cytochrome-OXYdase	(voir notice du test oxydase)	

Résumé

Objectif : caractérisation des phénotypes de résistances des souches de bacilles à Gram négatif isolées des surfaces de l'environnement hospitalier de l'hôpital d'Amizour.

Méthode : 100 prélèvements ont été effectués à partir de l'environnement hospitalier de l'hôpital d'Amizour. L'isolement a été fait sur gélose Mac Conkey additionnée de céftazidime (4µg / ml). Les souches sélectionnées ont été identifiées et testées vis-à-vis de 13 antibiotiques de différentes familles. Les phénotypes de résistance aux β-lactamines ont été étudiés.

Résultats : 20 souches de BGN résistantes à la céftazidime ont été identifiées incluant 09 souches d'*Enterobacter cloacae*, 08 souches d'*Acinetobacter baumannii*, 02 souches d'*Escherichia coli* et une souche *Klebsiella pneumoniae*. L'étude de la sensibilité de ces souches vis-à-vis du céfotaxime, céftazidime, cefoxitine et aztréonam a permis de déduire les phénotypes suivant : 02 souches *E.coli* BLSE, 09 *Enterobacter cloacae* hyperproductrices de leur AmpC en association avec une *BLSE*, 08 *Acinetobacter baumannii* avec une hyperexpression de leur AmpC, et une *Klebsiella pneumoniae* productrices de son AmpC en association avec une *BLSE* et 8 souches d'*Acinetobacter baumannii* non résistantes à l'imipénème.

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

Abstract:

Objective: The aim of this study was the phenotypic characterization of the resistance on Gram negative bacilli strains isolated from the surfaces of Amizour's hospital environment.

Methodology: 100 samples were obtained from AMIZOUR hospital. Isolation was performed on Mac Conkey agar supplemented with 4 µg/ml of Ceftazidime. The selected strains were identified and their susceptibility was tested against 13 antibiotics. Their resistance phenotypes were determined.

Results: 20 ceftazidime resistant GNB strains were identified including 09 *Enterobacter cloacae*, 08 *Acinetobacter baumannii*, 02 *Escherichia coli* and 01 *Klebsiella pneumoniae* strain. These were resistant to CTX, CAZ, CX and all the *Acinetobacter baumannii* were not resistant to IMP. Resistance phenotypes included 09 *Enterobacter cloacae* with overproduction of AmpC associated to ESBL, 08 strains of *Acinetobacter baumannii* with overexpression of AmpC, 02 strains of *E.coli* with ESBL and one strain of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC with association to *ESBL*.

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