الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ YAHIA FARES DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie

Spécialité **:** ***Microbiologie appliquée***

THEME

Contribution à l'étude du pouvoir de formation des biofilms et de l'antibiorésistance des bactéries impliquées dans les infections nosocomiales au niveau de l'hôpital de Médéa.

Présentée : par

Hassini Walid **Mekkaoui Haroun** **Ali Mira Oussaid Yacine**

Devant le jury composé de :

Promotrice : Dr.Belkacem Imane	MCB	université de Médéa
Co-promoteur : Dr. Mokhtari	Docteur	EPH de Médéa
Examinarice : Dr. Siouda Wafae	MCB	université de Médéa
Présidente : Dr. Bouzidi Amel	MCB	université de Médéa

Promotion 2022

REMERCIEMENTS

Dieu merci, nous avons terminé ce modeste travail avec un très grand parcours de recherches et d'expériences entre notre laboratoire et l'hôpital.

Nous voudrons dans un premier temps remercier, le recteur et le personnel du département S.N.V.

Nous tenons à témoigner toutes nos reconnaissances aux personnes suivantes, pour leur aide dans la réalisation de ce mémoire:

Dr. BELKACEM Imane pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion.

Dr. MOKHTARI qui nous a accompagnés à l'hôpital de Médéa et ses pertinents conseils.

Nous adressons aussi nos vifs remerciements aux membres des jurys pour avoir voulu examiner et juger notre travail.

DÉDICACES

Nous tenons à dédier cet humble travail à :

- ***Nos chers parents pour leurs soutiens moraux et financiers.***
- ***Nos frères et sœurs.***
- ***Nos amis.***
- ***Toute la famille " ALI MIRA OUSSAID ".***
- ***Toute la famille " HASSINI ".***
- ***Toute la famille " MEKKAOUI ".***

Résumé

Les infections nosocomiales constituent un problème majeur de santé publique ces dernières années, dont le biofilm a un rôle comme cause d'infections nosocomiales sur les dispositifs médicaux. Les biofilms bactériens sont le résultat de l'évolution qui tend à favoriser les modes de vies résilients, résistants à de fortes pressions de l'environnement.

Le but de cette étude est de tester le profil de résistance des souches isolées à partir des surfaces hospitalières au niveau de l'hôpital de Médéa et leurs pouvoirs de formation de biofilm. Dans ce contexte nous avons réalisé une étude sur les prélèvements d'environnement hospitalier au niveau de l'hôpital de Médéa. Nous avons recueilli 30 prélèvements dont 32 souches ont été isolées et identifiées à partir des prélèvements recueillis.D'apŕès nos résultats, *Staphylococcus aureus* est l'espèce la plus isolée avec un taux de 19%. L'étude de L'antibiorésistance a sélectionné 16 souches résistantes. 11 souches sont des entérobactéries, 4 souches sont des *Staphylococcus aureus*, et une seule souche de *Pseudomonas aeruginosa*. Le pouvoir de formation de biofilm a été détecté par la méthode de rouge Congo et la coloration de Crystal violet en tubes où nous avons trouvé que les 32 souches sont formatrices de biofilm. Nous avons aussi optimisé la formation de biofilm par la méthode de plaque de culture de tissu. D'après ces résultats nous avons trouvé que dans les conditions de T 30°C, pH=8 et en utilisant un milieu de culture supplémentés de saccharose, la formation de biofilm a été plus élevée.

Mots clés : Infection nosocomiale, antibiorésistance , biofilm bactérien. *Pseudomonas aeruginosa*

Staphylococcus aureus, entérobactéries

Abstract

Nosocomial infections have been a major public health problem in recent years, of which biofilm has a role as a cause of nosocomial infections on medical devices. Bacterial biofilms are the result of evolution that tends to favor resilient lifestyles, resistant to strong environmental pressures.

The aim of this study is to test the antibiotic resistance of strains isolated from hospital surfaces at the Medea hospital and and their biofilm formation powers. In this context, we

carried out a study on samples from the hospital environment at the Medea hospital. We collected 30 samples of which 32 strains were isolated and identified from hospital environment samples, *Staphylococcus aureus* is the most isolated species with a rate of 19%. The antibiotic resistance study selected 16 resistant strains. 11 strains are *Enterobacteriaceae*, 4strains are *Staphylococcus aureus*, 1 strain is *Pseudomonas aeruginosa*. The biofilm-forming power was detected by Congo red method and Crystal violet staining in tubes where we found that the 32 strains are biofilm-forming. We also optimized biofilm formation by the tissue culture plate method. From these results we found that under the conditions of T 30°C, pH=8 and using a culture medium supplemented with sucrose, the formation of biofilm was higher.

Keywords: Nosocomial infection, antibiotic resistance, bacterial biofilm, *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, enterobacteriaceae.*

الملخص

تعتبر عدوى المستشفيات مشكلة صحية رئيسية في السنوات الأخيرة ، والتي يلعب فيها البيوفيلم دورًا مهما كسبب لعدوى المستشفيات داخل الأجهزة الطبية. البيوفيلم البكتيري هو نتيجة التطور الذي يميل إلى تفضيل أنماط حياة مرنة ومقاومة للضغوط البيئية الشديدة.

الهدف من هذه الدراسة هو اختبار مقاومة السلالات المعزولة من أسطح المستشفى في مستشفى المدية ضد المضادات الحيوية و قدرتها في تشكيل البيوفيلم. في هذا السياق، أجرينا دراسة على عينات مأخوذة من الوسط المستشفى في مستشفى المدية. قمنا بجمع 30 عينة منها 32 سلالة تم عزلها وتحديدها من عينات البيئة بالمستشفى ،حيث ان المكورات العنقودية الذهبية هي أكثر الأنواع عزلة بنسبة 19٪. دراسة مقاومة المضادات الحيوية حددت 16 سلالة مقاومة, 11 منها بكتيريا معوية, 4 مكورات العنقودية وسلالة واحدة من الزائفة الزنجارية.

تم الكشف عن البيوفيلم ة بطريقة أحمر الكونغو وطريقة التلوين بالكريستال البنفسجي في الأنابيب حيث وجدنا أن جميع السلالات الـ 32 لها القدرة على تشكيل البيوفيلم. قمنا أيضًا بدراسة تحسين تكوين البيوفيلم في لوحة زراعة الأنسجة, وجدنا ان درجه الحراره 30 ودرجة الحموضة = 8 واضافة السكروز الى وسط الزرع يكون تشكيل البيوفيلم كبير.

الكلمات المفتاحية: عدوى المستشفيات, مقاومة المضادات الحيوية, البيوفيلم البكتيري, المكورات العنقودية الذهبية, البكتيريا المعوية.

Table de matière

Dédicaces

Remerciments

Résumée

Abstract

الملخص

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction…….. *01*

Syntèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les infections nosocomiales

1 Historique……..... *05*

2 Définition ……..... *06*

3 Epidémiologie ……. *06*

4 Prévalence et incidence …… *06*

5 Types d'infections nosocomiales rencontrés …….. *07*

5.1 Les infections urinaires…….. *07*

5.2 Les infections du site opératoire …….. *07*

5.3 Les pneumopathies…… *07*

5.4 Les septicémies …… *07*

6 Chaine de transmission …….. *08*

6.1 Agent infectieux ……... *08*

6.2 Réservoir ou la source …….. *08*

6.3 Porte de sortie ……. *09*

6.4 Mode de transmission …….. *09*

6.5 Porte d'entrée ……. *09*

6.6 Hôte réceptif …….. *09*

7 Biofilm bactérien …….. *09*

7.1 Les biofilms positifs …… *10*

7.2 Formation des biofilms …… *11*

7.3 Facteurs favorisant la formation du biofilm …… *12*

7.4 Stratégies anti-biofilm …… *12*

Chapitre II : Agents responsables des infections nosocomiales

1. Micro-organismes responsables des infections nosocomiales …… *15*

1.1 Les Virus ……... *15*

1.2 Les champignons ……... *15*

1. 3 Parasite …….. *16*

1.4. Bactéries ……... *16*

2. Caractéristiques des bactéries nosocomiales ……... *17*

3. Les Bactéries gram positive ……. *17*

3.1 *Staphylococcus aureus*…….... *17*

3.2 *Streptococcus pneumoniae* (pneumocoque)…….. *17*

4. Les bactéries gram négatives ……... *18*

4.1 *Escherichia coli* ……. *18*

4.2 *Enterobacter sp: (E. aerogenes, cloacae)*…….... *18*

4.3 *Pseudomonas aeruginosa*…….... *18*

4.5 *Salmonella enterica* ……..… *18*

4.6 *Legionella sp (L. pneumophilaè)*……..…. *18*

5. La résistance aux antibiotiques …… *19*

6. Contamination par biofilm …… *19*

7. Résistance des biofilms aux antibiotiques ……... *19*

8. Relation entre biofilm et virulence…… *20*

CHAPITRE III : prévention des infections nosocomiales

1. Depuis 1988, une action continue et volontariste du ministère…… *22*

2. Renforcement du dispositif de lutte contre les infections nosocomiales ……. *22*

3. Contamination de l'environnement par les microorganismes …….. *23*

3.1 L'eau ……. *23*

3.2 L'air ……... *24*

3.3 Surfaces …….. *24*

4. Les différentes voies de transmission……. *25*

5. Prévention de la transmission par l'environnement …… *25*

5.1 Nettoyage de l'environnement hospitalier ……. *25*

5.2 Utilisation d'eau chaude/surchauffée ……. *27*

5.3 Désinfection du matériel utilisé par le patient ……..... *27*

5.4 Stérilisation ……... *28*
6. Prévention de la contamination croisée ……... *29*
7. Hygiènes de l'environnement hospitalier ……. *30*
7.1 Hygiène des personnels…….. *31*
7.2 Hygiènes des locaux……... *32*
7.3 Hygiène de matériels……..... *32*
7.4 Hygiène des denrées alimentaires…….. *32*
8. Prévention aux biofilms ……... *33*

Matériel et méthodes

1. Cadre et lieu d'étude …… *35*
2. L'échantillonnage……. *35*
3. Prélèvement…….. *35*
4. Enrichissement …… *36*
5. Isolement et purification des souches bactériennes ……... *37*
5.1 Présentation des milieux de cultures ……. *37*
5.1.1 La gélose nutritive …….. *37*
5.1 2 La gélose MacConkey …… *37*
5.1.3 La gélose Chapman …… *37*
5.1.4 La gélose hektoen …….. *37*
5.1.5 la gélose salmonella-shigella …….. *37*
5.1.6 La gélose au cétrimide……. *38*
6. Identification …… *38*
6.1 Identification macroscopique …… *38*
6.2 Identification microscopique …… *38*
6.3 Identification biochimique…… *38*
6.3.1 Recherche des entérobactéries …… *38*
6.3.2 Recherche des *pseudomenas*…… *39*
6.3.3 Recherche des Staphylocoques ……. *39*
7. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques……. *40*
8. Conservation des souches…….. *43*
9. Mise en évidence de la formation de biofilm……. *43*
9.1 La méthode du Rouge Congo …… *43*
9.2 La méthode de crystal violet (en tubes) ……. *43*

10. Optimisation de la formation de biofilm …… *44*
11. Traitement statistique des résultats……. *46*

Résultats et discussion

1. Identification des isolats ……. *48*
1.1 Résultats de l'enrichissement …… *48*
1.2 Étude macroscopique …… *48*
1.3 Etude microscopique …… *50*
1.4 Identification des entérobactéries. …… *51*
1.5 Identification des *pseudomonas*…….. *53*
1.6 Identification des staphylocoques …….. *54*
2. Résistance des souches aux antibiotiques …… *57*
2.1 Antibiogrammes ……..... *57*
2.2 Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques …… *60*
3. Détermination de la formation de biofilm…….……... *63*
3.1 la méthode de culture sur gélose rouge congo…….……... *63*
3.2 Formation de biofilm par la méthode de Crystal violet (en tubes) …….…….. *64*
4. Optimisation de la formation de biofilm par la Technique de plaque de Culture de Tissu (TCP) ……..…… *67*
CONCLUSION …….. *76*
REFERANCE BIBLIOGRAPHIQUE
ANNEXES

Liste des tableaux

Tableau 01 :	mesures de la désinfection à l'eau chaude.	27
Tableau 02 :	principales méthodes de stérilisation.	29
Tableau 03 :	spectre d'activité des principaux désinfectants.	30
Tableau 04 :	les sites de prélèvement d'environnement hospitalier.	35
Tableau 05 :	Les antibiotiques testés contre les *entérobactéries*.	41
Tableau 06 :	les antibiotiques testés contre *Staphyloccocus*.	41
Tableau 07 :	les antibiotiques testés contre *Pseaudomenas arguinosa*.	42
Tableau 08 :	les paramètres utilisés dans le test de formation de biofilm par la méthode de (TCP).	45
Tableau 09 :	résultats de l'observation macroscopique.	48
Tableau 10 :	résultats de l'observation microscopique.	50
Tableau 11 :	résultats des tests biochimiques.	51
Tableau 12 :	Répartition des prélèvements positifs selon les différents services.	55
Tableau 13 :	Répartition des prélèvements selon les sites de prélèvement.	56
Tableau 14 :	Répartition de souches résistantes par espèces.	59
Tableau 15 :	Répartition des souches résistantes.	60

Liste des figures

Figure 01 :	Chaine de transmission de l'infection.	08
Figure 02 :	Les différentes étapes de la formation d'un biofilm.	11
Figure 03 :	Récapitulatif de la méthodologie de l'identification.	40
Figure 04 :	Principe des techniques de quantification des biofilms en microplaque.	44
Figure 05 :	Résultats de l'enrichissement après incubation de 48h.	48
Figure 06 :	Aspect d'*Entetrobacter* sur Mac Conkey.	49
Figure 07 :	Aspect d'E. *coli* sur Mac Conkey.	49
Figure 08 :	Aspect de *Klebsiella.*	49
Figure 09 :	Aspect de *Staphyloccocus aureus* sur Chapman.	50
Figure 10 :	Cocci Gram (+) à partir de l'échantillon N° 16.	50
Figure 11 :	Bacille à Gram (-) à partir de l'échantillon N°1.	51
Figure 12 :	Galerie biochimique classique pour *E. coli.*	52
Figure 13 :	Galerie biochimique classique pour *Shigella.*	52
Figure 14 :	Galerie biochimique classique pour *Proteus vulgaris*.	52
Figure 15 :	Galerie biochimique classique pour *Klebsiella.*	53

Figure 16 :	Galerie biochimique classique pour *Entetrobacter*.	53
Figure 17 :	Aspect macroscopique de *Pseaudomenas arguinosa* productrice de la pyocyanine.	54
Figure 18 :	Coagulasse négative.	54
Figure 19 :	Coagulasse positive.	54
Figure 20 :	Répartition des prélèvements positifs.	55
Figure 21 :	Répartition des souches identifiées dans les différents services.	57
Figure 22 :	Résultat de l'antibiogramme pour *Proteus.*	58
Figure 23 :	Résultat de l'antibiogramme pour *Staphyloccocus aureus.*	58
Figure 24 :	Résultat de l'antibiogramme pour *Entetrobacter.*	58
Figure 25 :	Taux de résistance des *Pseaudomenas arguinosa* aux différents antibiotiques testés.	60
Figure 26 :	Taux de résistance (%) des entérobactéries isolées aux différents antibiotiques testés.	61
Figure 27 :	Taux de résistance (%) des souches de Staphylocoques isolées aux différents antibiotiques testés.	62
Figure 28 :	Taux de résistance (%) des bacilles gram négative isolées aux différentes familles d'antibiotiques testés.	62
Figure 29 :	Taux de résistance (%) des souches de *Staphyloccocus* isolées aux différentes familles d'antibiotiques testés.	63
Figure 30 :	Aspect macroscopique des colonies sur le milieu RCA (gélose rouge Congo).	63
Figure 31 :	Fréquence des différents aspects macroscopiques des souches testées à la formation de slim.	64

Figure 32 :	La formation de biofilm par la méthode de Crystal violet. Tube	65
Figure 33 :	Evaluation de la formation de biofilm par La méthode de Crystal violet (en tubes) de toutes les souches étudiées.	66
Figure 34 :	Résultats montrant l'aspect des microplaques en présence de différentes concentrations des sucres supplémentées.	67
Figure 35 :	Résultats montrant l'aspect des microplaques dont le PH de milieu est modifié.	68
Figure 36 :	Effet de glucose et saccharose additionné dans le milieu BHI sur la formation des biofilms.	69
Figure 37 :	Effet de PH de milieu sur la formation de biofilm dans le BHI.	70
Figure 38 :	L'effet des températures (37°C, 30°C et 25°C) sur la formation de biofilm dans le milieu BHI.	71

Lists des abbreviations

- **IN :** Infection nosocomiale
- **DM:** Dispositif médicale
- **ASPC:** Agence de la santé publique du Canada
- **EPS:** Substance polymérique extracellulaire
- **VRS:** Virus respiratoire syncytial
- **VHB:** Virus de l'hépatite B
- **VHC:** Virus de l'hépatite C
- **VIH:** Virus l'immunodéficience humaine
- **PVVIH:** Personnes vivant avec le VIH
- **BMR:** Bactérie multi-résistantes
- **CLIN:** COMITÉ DE LUTTE CONTRE LES INFECTIONS NOSOCOMIALES
- **EOH:** Equipe opérationnelle d'hygiène hospitalière
- **CCLIN:** Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales
- **SS:** Salmonella-Shigella
- **TSI :** Triple Sugar Iron
- **CMI:** Concentration minimale inhibitrice.
- **CRA:** Congo Red Aggar
- **PIA:** Polysaccharide intercellular adhesin
- **BHI:** Bouillon Cœur Cervelle
- **PBS:** Tampon phosphate salin
- **TCP:** Méthode de plaque de culture de tissus
- **DO:** Densitant optique
- **SPSS:** Statistical Package for the Social Sciences

Introduction

À l'échelle mondiale, les infections nosocomiales représentent aujourd'hui un problème majeur de santé publique. Elles constituent des complications préoccupantes de l'hospitalisation. Selon les statistiques étrangères, essentiellement américaines, 5 à 7 % des malades hospitalisés contractent une infection nosocomiale **(Berthelot, P et al., 2005).**

En milieu hospitalier, les surfaces sont régulièrement colonisées par des microorganismes : Ces microorganismes sont d'origines diverses et peuvent être issus de patients, du personnel soignant ou des visiteurs. Ces surfaces constitueraient donc une niche écologique de bactéries multirésistantes pouvant être un réservoir à partir duquel des d'infections nosocomiales peuvent se développer **(FAYE-KETTÉ, H., 2010)**.

La découverte des antibiotiques modifia radicalement les perceptions et les moyens d'actions face aux infections : à un microbe, un antibiotique correspondait, l'équation était simple. Mais, du fait probablement des prescriptions abusives et de l'automédication, et ce dès les années 50 et 60, de nombreuses publications constataient une proportion croissante de germes résistants aux antibiotiques – ce semi-échec sera sûrement l'élément moteur de la construction organisationnelle de la lutte contre l'infection nosocomiale **(Ellenberg, E. 2005).**

Dans la nature, environ 90 % des bactéries adoptent un mode de vie en biofilm. Les biofilms sont des communautés de microorganismes, composées de bactéries et/ou moisissures de diverses espèces, se développant sur des surfaces. La préoccupation principale des hôpitaux en regard des biofilms est directement liée à leur implication dans diverses pathologies infectieuses. Depuis les travaux pionniers de William Costerton dans les années 1980, une littérature abondante documente la problématique des infections à biofilms **(Vanzieleghem, T et Delmée, M., 2020)**.

Donc il y'a Deux particularités très importantes des infections nosocomiales sont : l'antibiorésistance des germes responsables qui rendent leur traitement extrêmement difficile et leur transmissions plus facile, et la formation de biofilm qui est difficile à éradiquer en raison de leur mécanisme d'échappement à la pénétration des anticorps et de leur tolérance à des doses élevées d'antibiotiques.

Notre travail a pour objectif d'Identifier les souches isolées a partir les surfaces hospitalières et la mise en évidence de leur résistance aux antibiotiques ainsi que leur pouvoir de formation du biofilm.

Ce mémoire est scindé en deux parties :

La partie bibliographique : cette partie inclut trois points traitant les titres suivants : généralités sur les infections nosocomiales, agent responsables des infections nosocomiales et prévention des infections nosocomiales.

La partie expérimentale : elle comporte le matériel et méthodes et les techniques adoptées dans cette partie. Les résultats sont présentés avec des interprétations ainsi qu'une discussion et une conclusion.

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les infections nosocomiales

Chapitre I : généralités sur les infections nosocomiales

1-Historique :

Au XIXe siècle, la fièvre puerpérale et les infections post-opératoires étaient le quotidien de l'hôpital. Ce sujet « déchaînait des bagarres épiques à l'académie de médecine ». Les épidémies provenaient pour une grande part d'une méconnaissance complète des mesures d'hygiène et d'une transmission d'un malade à l'autre par les mains du personnel soignant **(Le Rat, C., 2010)**.

À Paris, à la clinique du sport, prospère une épidémie post opératoire d'une bactérie vivant dans l'eau, le Xénopi. Un défaut de respect des règles de qualité de l'eau et lié au matériel, est alors identifié dans la clinique. Dans cette histoire, on note que, grâce aux structures de surveillance précédemment mises en place, des informations alarmantes sont connues dès 1993 ; le C.CLIN de Paris Nord avait provoqué une alerte sur deux cas de patients repérés comme patients infectés par le Xénopi dans une même clinique **(Rambaud, C., 2008)**.

En 1874, Louis Pasteur déclarait, devant l'Académie des Sciences : « Si j'avais l'honneur d'être un chirurgien, jamais je n'introduirais dans le corps de l'homme un instrument quelconque sans l'avoir fait passer dans l'eau bouillante ou mieux encore dans la flamme » **(Ellenberg, E. 2005)**. Et cela indique sa conscience de la gravité de l'affaire.

Il ne faut pas supposer que l'histoire des maladies nosocomiales n'a commencé qu'avec l'épidémie de légionellose à l'Hôpital Pompidou ou celle de xenopi à la Clinique du sport - loin de là - mais il est vrai qu'elle a tragiquement rebondi ces dernières années. En fait, l'adjectif "hôpital" est utilisé depuis au moins le 18ème siècle - comme en témoignent de nombreux dictionnaires médicaux. De la « pourriture d'hôpital » à « l'infection nosocomiale », la question a été évoquée tout au long de l'histoire des hôpitaux. Dès le XVIIIe siècle, l'Ecossais John Pringle (1707-1782) fait les premières constatations des "infections nosocomiales" et introduit d'importantes réformes sanitaires dans les hôpitaux militaires. En 1788, Tenon (1724-1816) s'intéresse dans ses Mémoires sur les hôpitaux de Paris, des « fièvres des hôpitaux », et il prônait, pour les combattre, la mise en place de mesures effectives d'hygiène hospitalière **(Ellenberg, E., 2005)**.

2-Définition :

L'hospitalisme infectieux, dites infection nosocomiale, résonne dans le monde sanitaire actuel. En grec nosokomeion, l'infection nosocomiale désigne une maladie infectieuse contractée en milieu de soins, soit par les soignants du fait de leurs activités, soit par les patients. Dans ce dernier cas, l'infection est considérée comme nosocomiale s'il est prouvé que le patient a été admis sans infection et que 48 heures se sont écoulées depuis l'admission jusqu'au premier symptôme **(Amiel, C., 2005)**.

3-Epidémiologie :

La fréquence globale des infections associe aux soins mesurée par des études internationales, variée de 5 à 10 % des hospitalisations **(Hamza, R., 2010)**.

Selon L'enquête nationale de prévalence Française 2006 des infections nosocomiales, la prévalence des patients infectés était de 4,97 % et celle des infections nosocomiales de 5,38 %. Les sites infectieux les plus fréquents étaient l'infection urinaire 30 %, la pneumopathie 15 % et l'infection du site opératoire 14 % **(Thiolet, JM., 2007)**

Les principaux micro-organismes responsables des infections nosocomiales étaient *Escherichia coli* (25 %), *Staphylococcus aureus* (19 %, dont 52 % résistants à la méticilline, SARM) et *Pseudomonas aeruginosa* (10 %, dont 25 % résistant au ceftazidime) **(Thiolet, JM., 2007)**.

Selon une étude menée dans 27 hôpitaux en Algérie, en Égypte, en Italie, au Maroc et en Tunisie, les services de réanimation avaient la prévalence la plus élevée (24,8 %), suivies de la pédiatrie (11,3 %). Les taux de prévalence dans les services de chirurgie, d'obstétrique-gynécologie et de médecine étaient respectivement de 8,0 %, 7,7 % et 7,6 % **(K, Amazian, *et al.*, 2010)**.

4-Prévalence et incidence :

Le monde est conscient des infections nosocomiales qui touchent aussi bien Les pays développés que les pays pauvres en ressources. Les infections contractées en milieu médical C'est l'une des principales causes d'augmentation de la mortalité et de la morbidité des patients. À tout moment, plus de 1,4 million de personnes dans le monde souffrent de

complications d'Infection nosocomiale. Les Fréquences maximale signalées dans les hôpitaux des régions de la Méditerranée orientale et de l'Asie du Sud-est (11,8 % et 10,0 %, respectivement), et la prévalence atteignait 7,7% en Europe et 9,0% dans le Pacifique occidental **(Ducel, G, *et al.*, 2002)**.

5. Types d'infections nosocomiales rencontrés :

5.1 Les infections urinaires :

Liées à un sondage vésical à demeure définies selon des critères microbiologiques uroculture quantitative positive

Bactéries responsables : - normale (*Escherichia coli*)

- acquise à l'hôpital (*Klebsiella* multi résistantes). **(Kissira, I., 2014).**

5.2 Les infections du site opératoire :

On distingue pour cette catégorie les infections de la plaie opératoire (plutôt superficielle à l'origine) et les infections profondes touchant les organes. Les chirurgies visant à la mise en place d'une prothèse ou bien pour une transplantation peuvent causer des IN d'apparitions très tardives, jusqu'à un an après l'opération **(Monnet, T., 2011).**

5.3-Les pneumopathies :

Celles-ci sont en majorité associées à la mise en place d'une ventilation mécanique, ce qui constitue un réel fléau au sein des unités de soins intensifs. **(Monnet, T., 2011).**

5.4Les septicémies :

L'utilisation de DM (dispositifs médicaux) est associée à la plupart des cas de septicémies nosocomiales, que ce soient les dispositifs intra-vasculaires (comme les chambres de perfusion veineuse) ou les cathéters centraux ou périphériques **(Monnet, T., 2011).**

6. Chaine de transmission :



Figure 1 : chaine de transmission de l'infection **Selon l'Agence de la santé publique du Canada (ASPC., 2014).**

Une infection résulte d'une interaction entre un agent infectieux et un hôte ré-ceptif.
Cette interaction survient pas contact entre l'agent et l'hôte et elle est affectée par l'environnement. Casser la chaîne en interrompant la transmission**.**

6.1 Agent infectieux :

C'est un microorganisme transmissible. Il peut être une bactérie, un virus, un champignon, un parasite ou un prion. Il appartient soit à la flore endogène (microorganismes de l'individu) ou à la flore exogène (Source externe de l'usager) (**CINQ)**.

6.2 Réservoir ou la source :

C'est un usager, travailleur de la santé ou visiteur pouvant présenter une infection active, être asymptomatique, en période d'incubation d'une maladie infectieuse, être colonisé transitoirement ou de façon chronique par un microorganisme pathogène.

Les microorganismes peuvent se retrouver sur la peau, dans le sang, les liquides biologiques, les excrétions, les sécrétions, etc.

L'environnement inanimé ou le matériel de soins partagé d'un usager à l'autre peuvent également être un réservoir et constituer une source d'infections nosocomiales **(CINQ)**.

6.3 Porte de sortie :

La porte de sortie est passage par lequel un agent infectieux quitte le réservoir. La porte de sortie peut être le système respiratoire, l'appareil uro-génital, le système gastro-intestinal, la peau/muqueuse, le sang ou la transmission d'une maladie entre la mère et son enfant pendant la grossesse (transplacentaire) **(CINQ)** .

6.4 Mode de transmission :

C'est un moyen que prend l'agent infectieux, en partant de la source, pour atteindre l'hôte réceptif. **(CINQ).**

6.5 Porte d'entrée :

La porte d'entrée est le chemin par lequel un agent infectieux pénètre dans l'hôte. La porte d'entrée peut être via le système respiratoire, l'appareil uro-génital, le système gastrointestinal, la peau/muqueuse, la voie parentérale ou transplacentaire**..**

6.6 Hôte réceptif :

Personne réceptive à l'égard de l'agent infectieux (microorganisme) soit, par exemple, parce que son système immunitaire est affaibli ou qu'elle ne possède pas les anticorps nécessaires pour lutter contre l'infection, ou qu'elle présente des récepteurs cellulaires appropriés pour accueillir l'agent **(CINQ).**

7. Biofilm bactérien :

Le biofilm est généralement défini comme des communautés de cellules microbiennes associées à une surface enfermées dans une matrice extracellulaire, cette dernière est formée

de biopolymères, généralement polysaccharidique et protéiques, permettant de piéger les nutriments nécessaires à la suivie des micro-organismes **(Lé, Virginie., 2008**).

Les biofilms, Bien que bénéfiques dans la plupart des environnements, les biofilms bactériens se développant sur des implants ou lors d'infections chroniques constituent des réservoirs de pathogènes à l'origine de nombreuses infections nosocomiales **(Lebeaux, et Jean-Marc., 2012).**

La majorité des espèces bactériennes étudiées en laboratoire forment des biofilms. Les bactéries modèles les plus étudiées sont *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Vibrio cholerae*. Ces bactéries pathogènes ou commensales à Gram négatifs sont facilement manipulables et ont permis l'identification et l'étude de nombreux facteurs moléculaires impliqués dans la formation des biofilms. Plusieurs équipes travaillent également avec la bactérie à Gram positif *Staphylococcus aureus* qui est impliquée dans de nombreuses infections nosocomiales. **(Roux et Jean-Marc., 2006).**

7.1 Les biofilms positifs :

Le plus souvent inoffensifs, les biofilms jouent un rôle écologique capital et contribuent très largement au bon fonctionnement de la plupart des écosystèmes en participant notamment au cycle du carbone, de l'eau.

Les biofilms jouent aussi un rôle essentiel dans de nombreux processus **:**

-le traitement de nos eaux usées s'effectue grâce à l'utilisation empirique de l'activité épuratrice des biofilms bactériens.

- Ils contribuent à la production et à la dégradation de la matière organique,

- recyclage de l'azote, du soufre et de nombreux métaux.

La flore commensale humaine peut être considérée comme un biofilm qui protège son hôte contre les attaques des bactéries pathogènes.

Dans l'industrie, les biofilms servent au traitement des déchets par un mécanisme appelé « bioremédiation » **(Roux et Jean-Marc., 2006).**

Domaine alimentaire, la production du vinaigre et dans la production d'éthanol dans des réacteurs disposés verticalement**. (POUR, M., 2017).**

7.2 Formation des biofilms :

On distingue cinq étapes dans le mécanisme de formation des biofilms.

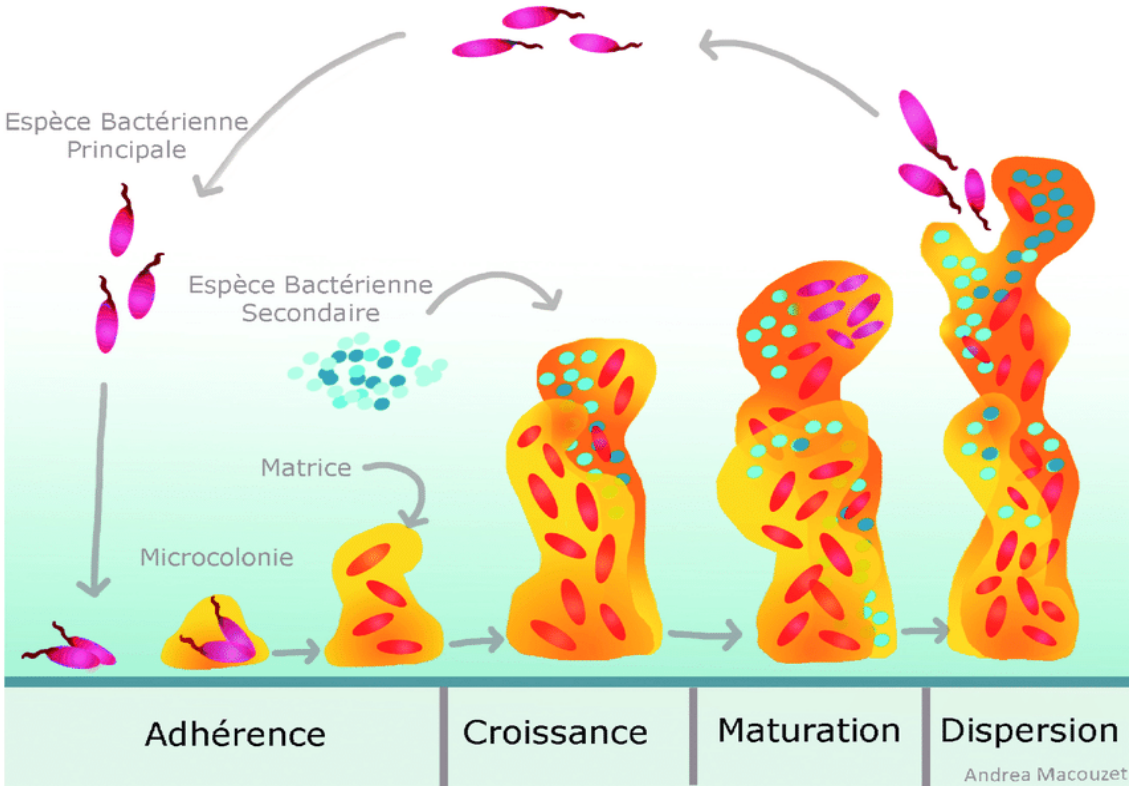


Figure 2 : Les différentes étapes de la formation d'un biofilm.

(Yannick *et al*., 2014).

1. la phase de transport et d'attachement des cellules vers un substrat, ainsi que la création de ce qu'on appelle un film de conditionnement ;

2. l'adhésion des cellules de façon réversible avec la production d'EPS

3. le début de la croissance microbienne et de l'´évolution de l'architecture du biofilm avec le d´développement des micro-colonies primaires ;

4. la maturation du biofilm avec le développement des colonies ;

5. le détachement microbien ou le détachement de colonies de biofilm en réponse aux conditions hydrodynamiques.

Suite au détachement, les microorganismes (ou colonies) sont disperses à nouveau dans le milieu environnant, où ils peuvent coloniser d'autres portions de la surface. **(Medeiros, A., 2016).**

7.3 Facteurs favorisant la formation du biofilm :

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe, sous l'influence de nombreux facteurs, notamment les caractéristiques de la surface, les caractéristiques du milieu, et les propriétés des bactéries. **(POUR, M., 2017).**

- Les caractéristiques de la surface : la rugosité, la texture, la présence préalable d'un film protéique recouvrant la surface, la présence d'aspérités et d'hydrophobicités.

- Les caractéristiques du milieu : le pH, la température, la vitesse du flux, la présence d'un flux laminaire ou non, le fer, les nutriments, les cations (Ca^{2+}, Fe^{3+}, Na^{2+},...), la source de carbone disponible, la disponibilité du milieu en oxygène et la présence d'agent antimicrobien.
- Les propriétés des bactéries : la production d'exopolysaccharides, la présence de fimbriae et des flagelles, et l'hydrophobicité de la surface de la bactérie. De bonnes conditions nutritives sont nécessaires aux étapes de formation du biofilm, alors que les phases de développement tardives sont possibles dans des conditions nutritives peu favorables. Ainsi, le type de biofilm dépend des conditions nutritives, ce qui suggère une facilité de remodelage des biofilms**. (Pour, M., 2017).**

7.4 Stratégies anti-biofilm :

Plusieurs moyens et stratégies contre la formation de biofilm ont été développés :

- L'hygiène reste le moyen classique qui permet d'éviter la contamination microbienne et donc l'adhésion et la formation ultérieure de biofilm.

- Des peintures anti-adhérentes, sans biocide, généralement à bases de silicone ou de fluoropolymére sont utilisées afin de limiter l'effet des forces d'adhésion des microorganismes aux surfaces.

- Ces dernières années et vu la capacité des micro-organismes d'adhérer aux différentes surfaces, des options de lutte alternatives sont utilisés telles que les composés naturels (N-heptylsulfanylacétyl-l-homosérinelactone extrait d'ail, les nouveaux produits chimiques

(Tween 20 et Triton X-100) (Chen et stewart, 2000) et les métaux inorganiques comme le cuivre et les alliages de cuivre (le cupronickel, le cuivre-nickel-zinc et le bronze) .

- Récemment, des stratégies basées sur l'utilisation des enzymes bactériennes comme la dispersine B (capable de dégrader le polymère de N-acétyl-glucosamine de la Synthèse bibliographique 11 matrice du biofilm) et des bactériophages ont également montré une capacité de lutter contre la formation des biofilms **(Bebour Hiba Et Hanadi., 2021).**

Chapitre II : Agents responsables des infections nosocomiales

Chapitre II : agents responsables des infections nosocomiales

1. Micro-organismes responsables des infections nosocomiales :

Des agents pathogènes très divers peuvent être à l'origine d'infections nosocomiales. Les agents infectieux varient selon les populations de patients et les types d'établissements de santé, d'un établissement à l'autre et d'un pays à l'autre. **(OMS)**

Les agents infectieux, à l'origine des maladies infectieuses, sont des micro-organismes observables pour la plupart, au microscope. Les plus fréquemment rencontrés sont les bactéries et les virus, mais certains parasites et champignons peuvent aussi constituer des agents infectieux pour l'homme (ex : agent du paludisme et agent des candidoses) **(Benfreha et TemmourI, H., 2014).**

1.1 Les Virus :

Plusieurs virus peuvent être transmis en milieux hospitaliers, les principaux sont par ordre :

-Les Rotavirus : De transmission féco-orale par les aliments et les eaux souillés, et par contact humain, ils sont responsables de diarrhées infantiles.
-Le virus respiratoire syncytial (VRS) : Responsables des atteintes ORL et pulmonaires chez l'enfant, il est transmis par voie aérienne.
- Le virus de la grippe : Il atteint surtout les sujets âgés dans les centres médicalisés ; il se transmet par voie aérienne et entraîne des atteintes du rhinopharynx, de la trachée et des bronches.
-Les Virus de l'hépatite B (VHB), de l'hépatite C (VHC), de l'immunodéficience humaine (VIH), des fièvres hémorragiques. Ils sont incriminés dans les services d'hémodialyse, lors de la transfusion sanguine et greffes d'organes.

-Autres (varicelle, rougeole) : Ils sont aussi incriminés chez les PVVIH. **(Kissira, I., 2014).**

1.2 Les champignons :

Parmi les autres micro-organismes impliqués dans les infections nosocomiales, les levures et surtout les champignons filamenteux environnementaux (*Aspergillus* spp.) sont très

bien adaptés à la survie et la multiplication dans l'environnement. **(Quincampoix et Mainardi., 2001)**

- *Aspergillus* spp :

Habitat préférentiel: Environnemental (végétaux, sol, poussières)

Principales pathologies nosocomiales : chez l'immunodéprimé (SIDA, transplantés) (**Pozzetto, B., 2009).**

1. 3 Parasite :

Certains parasites comme *Cryptosporidium sp* et *Giardia sp,* Peuvent contaminer une grande variété d'hôtes.

La résistance de ces parasites dans le milieu extérieur est marquée. Leur rôle dans les diarrhées nosocomiales est probablement sous-évalué, en milieu vétérinaire comme médical (**Keck et Fabrice., 2017).**

1.4. Bactéries :

Bactéries d'origine humaine : (peau, muqueuses) parmi lesquelles des bactéries multi résistantes aux antibiotiques comme *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline, les entérobactéries productrices de bêta-lactamase à spectre élargi ou les *Enterococcus* résistants à la vancomycine **[05]**.

Les bactéries pathogènes sont des bactéries responsables d'une maladie même chez le sujet " sain " (ex typhoïde, choléra, tuberculose, méningite...). Le pouvoir pathogène conditionne le type de maladie et va dépendre de l'espèce bactérienne responsable de l'infection.
Par exemple, le choléra dont l'agent est *Vibrio cholera* est une maladie complètement différente de la méningite à méningocoque (**Madi et Djema., 2019).**

Parmi les bactéries à Gram négatif, la famille des *Enterobacteriaceae* est la plus représentée, et les genres *Pseudomonas* et *Acinetobacter* ont également un impact conséquent. Pour les bactéries à Gram positif, deux genres qui sont importants : *Staphylococcus* et *Enterococcus*, ce dernier étant tout de même moins fréquent que le premier (**Zeroual., Z., 2012).**

2. Caractéristiques des bactéries nosocomiales :

- Grande vitalité :

Bactéries saprophytes (*pseudomonas, Acinetobacter*, Entérobactéries)

Bactéries commensales des flores humaines et animales (Entérobactéries, Staphylocoques)

- Aptitudes nutritionnelles :

- Aptitude à utiliser divers substrats.

- Croissance possible sur divers milieux de culture sélectifs.

- Culture possible en milieu minimum.

- T° de croissance très variable : 4°C à 45°C.

- Aérobies strictes ou facultatives.

- Aptitudes à l'adhérence par le biais de biofilm **(Menidjel, N., 2017).**

3. Les Bactéries gram positive :

3.1 *Staphylococcus aureus :*

- Habitat préférentiel: Humain (peau, rhinopharynx, vagin) / Environnemental (poussières, aliments)

- principales pathologies nosocomiales: Infection de la peau et des parties molles (plaie, brûlure), Pneumopathie, Bactériémie, septicémie, Infection urinaire Infection osteo-articulaire, Infection sur cathéter et sur prothèse.

- caractérisée par une sensibilité naturelle aux Bêta-lactamines, et qui a une grande capacité d'adaptation à l'antibiotique en acquérant une résistance.

3.2 *Streptococcus pneumoniae (pneumocoque) :*

- Habitat préférentiel: Humain et animal (voies aériennes supérieures)

- principales pathologies nosocomiales : Pneumonie Bronchite Infections ORL Méningite Arthrite (**Pozzetto, B., 2009).**

- Résistante aux β-lactamines, Résistance aux macrolides, lincosamides, et streptogramines Résistance aux fluoroquinolones **(Quincampoix et Mainardi., 2001).**

4. Les bactéries gram négatives :

4.1 Escherichia coli :

- Habitat préférentiel: Humain / Animal / Environnemental (eau, aliments)
- principales pathologies nosocomiales : Diarrhée, Suppuration, Infections urinaire et génitale, Méningit, Toxi-infection alimentaire (**Pozzetto., B., 2009).**

4.2 Enterobacter sp: (E. aerogenes, cloacae …)

- Habitat préférentiel: Humain / Animal / Environnemental (sol, eau, végétaux)
- principales pathologies nosocomiales : Pneumopathie, Infection urinaire (**Pozzetto, B., 2009).**

4.3 Pseudomonas aeruginosa :

- Habitat préférentiel: Humain / Environnemental (eau, sol, végétaux)
- principales pathologies nosocomiales : Pneumopathie, Infection urinaire, Infection de la peau et des parties molles (plaie, brûlure) (**Pozzetto, B., 2009).**

***4.5 Salmonella enterica* :**

- Habitat préférentiel: Humain / Animal / Environnemental (eau, aliments)

- principales pathologies nosocomiales : Fièvres typhoïde et paratyphoïdes, Toxi-infections alimentaires **(Pozzetto, B., 2009).**

4.6 Legionella sp (L. pneumophila, …)

- Habitat préférentiel: Environnemental (eaux tièdes, climatiseurs)

- principales pathologies nosocomiales: Légionellose Pneumopathie, Fièvre de Pontiac (**Pozzetto, B., 2009).**

5. La résistance aux antibiotiques :

Avec l'apparition de la pénicilline en 1945, les grandes infections semblaient vaincues mais parallèlement au développement, dans les années 60-70, de la chirurgie et des techniques invasives, les germes deviennent de plus en plus résistants et l'infection associée aux soins s'installe à l'hôpital **(Carlet., J., 2002).**

Ce qui distingue les IN des infections communautaires, c'est le **fo**rt taux de résistances aux antibiotiques parmi les pathogènes impliqués. La pression de sélection, qui est à la base de l'émergence de ces résistances, est en effet plus forte au sein des hôpitaux. La prévalence des résistances diffère selon les pathogènes **(Monnet, T., 2011).**

Dans le cadre des infections nosocomiales, les Bactéries multi-résistantes (BMR) prises en compte sont les bactéries les plus fréquemment mise en cause dans des infections, qui ont un fort potentiel épidémique et dont les mécanismes de résistance sont facilement transférables.
Les BMR sont considérées comme des indicateurs d'activité et de qualité des soins, elles font d'ailleurs partie des référentiels de certification des établissements de santé **(Albrecht, A., 2015).**

6. Contamination par biofilm :

Si l'implication directe des biofilms dans de nombreux processus infectieux n'est plus à démontrer, leur impact indirect sur la transmission de germes pathogènes reste largement sous-estimé. L'environnement hospitalier n'échappe cependant pas à la colonisation par des biofilms bactériens qui représentent des réservoirs idéaux pour les micro-organismes. Ces réservoirs s'intègrent dans un cycle de contamination qui inclut les patients, les agents causaux (micro-organismes) et des vecteurs tels que l'air, l'eau, le staff médical, les insectes, ou les dispositifs médicaux **(Vanzieleghem, T et Delmée, M., 2020)**

7. Résistance des biofilms aux antibiotiques :

De nombreux problèmes associés au développement des biofilms en milieu médical, ont pour origine leur résistance extrêmement élevée aux agents antibactériens (antibiotiques et désinfectants).

Cette résistance accrue, multifactorielle, est liée aux conditions de vie dans le biofilm (hétérogénéité, accès aux nutriments, oxygène etc.) ; elles modifient les propriétés physiologiques des micro-organismes et induisent des mécanismes de résistance spécifiques qui s'ajoutent aux mécanismes de résistance connus. La résistance élevée des biofilms aux agents anti-bactériens pourrait également reposer sur la présence d'une sub-population de bactéries résistantes, capables de résister à de fortes concentrations d'antibiotiques **(Roux et Jean-Marc., 2006).**

Ainsi, alors que les progrès de la médecine moderne permettent de lutter efficacement contre de nombreuses maladies infectieuses, celles qui sont liées à la présence de biofilms, échappent largement à ce type de traitements. Les antibiotiques sont en effet très peu efficaces contre les biofilms et les symptômes peuvent réapparaître une fois le traitement fini **(Roux et Jean-Marc., 2006).**

8. Relation entre biofilm et virulence :

Les capacités des bactéries à former un biofilm ou à être virulentes. Ce mécanisme de régulation offrirait aux bactéries une plus grande adaptabilité vis-à-vis des stress environnementaux.

Au cours de la phase planctonique d'infection, les bactéries libéreraient des facteurs de virulence et altéreraient les tissus de l'hôte. Une fois dans un environnement adapté, les bactéries pourraient s'implanter et persister sur une surface via l'expression de facteurs impliqués dans la formation de biofilms **(Roux et Jean-Marc., 2006).**

Le biofilm joue un rôle dans la persistance des bactéries dans un environnement donné et non directement dans le mécanisme infectieux.

Les biofilms constituent ainsi des réservoirs d'infections. La persistance de l'infection serait liée à la présence de la bactérie sous forme de biofilms **(Roux et Jean-Marc., 2006).**

CHAPITRE III :

Prévention des infections nosocomiales

CHAPITRE 3 : prévention des infections nosocomiales

1. Depuis 1988, une action continue et volontariste du ministère :

En 1988, le ministère instaurait par décret (6 mai 1988) la création de CLIN dans les établissements publics de santé. Pour soutenir l'action de ces instances hospitalières, des structures interrégionales et nationales de coordination et de conseil ont été créée depuis 1992.

Un plan de lutte à cinq ans contre les infections nosocomiales, annoncé en novembre 1994 par le ministre de la santé, a défini les grands axes de la politique à mener. La loi du 1/07/98 relative à la sécurité sanitaire a étendu ce dispositif aux cliniques privées**.**

Depuis 1995, les actions menées s'inscrivent dans le cadre d'un plan national de lutte contre les infections nosocomiales, dont les objectifs sont de réduire significativement le nombre d'infections nosocomiales et la fréquence des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques.

Ce plan est coordonné par la « cellule infections nosocomiales », entité transversale à la direction générale de la Santé et à la direction de l'Hospitalisation et de l'Organisation des soins. Il est composé de cinq axes **(Carlette, J., 2002):**

1. Renforcer les structures de lutte contre les infections nosocomiales.

2. Élaborer et diffuser des recommandations de bonnes pratiques d'hygiène.

3. Améliorer la formation en hygiène des professionnels de santé.

4. Mettre en place un programme national de surveillance des infections nosocomiales.

5. Évaluer ces actions.

2. Renforcement du dispositif de lutte contre les infections nosocomiales :

En application de la loi du 1er juillet 1998, renforçant la sécurité sanitaire, deux décrets importants ont précisé de nouvelles obligations. La lutte contre les infections nosocomiales a été étendue aux cliniques privées et s'est concrétisée par l'obligation, dans tout établissement de santé, d'instaurer un Clin et une équipe opérationnelle d'hygiène hospitalière (EOH), et

d'élaborer un programme d'actions comprenant la surveillance des infections nosocomiales. D'autre part, le signalement de certaines infections nosocomiales a été instauré.

Entre 1998 et 2001, au renforcement des équipes opérationnelles d'hygiène hospitalière, au financement des actions d'amélioration de la sécurité de la stérilisation et de la désinfection et au financement de dispositifs médicaux à usage unique dans le cadre de la prévention des maladies infectieuses notamment à prions **(Chalfine et Jean., 2002).**

Publié par voie de circulaire du 26 août 2009 relative à la mise en œuvre du programme national de prévention des infections nosocomiales 2009/2013, le programme définit 6 axes prioritaires:

1. Sécurité des soins.
2. Optimiser le recueil et l'utilisation des données de surveillance.
3. Promouvoir une culture partagée de qualité per et détecter l'émergence d'agents pathogènes à potentiel épidémique.
4. Maintenir l'usager au centre du dispositif.
5. Améliorer l'organisation du dispositif de prévention des infections nosocomiales.
6. Promouvoir la recherche sur les infections nosocomiales **(CCLIN Sud-est).**

3. Contamination de l'environnement par les microorganismes :

L'environnement hospitalier est largement contaminé par des micro-organismes d'origine humaine (flore digestive, cutanée) ou spécifiquement environnementaux (surface, air, eau et matériel) le mode de contamination (aérienne, hydrique…) et la réceptivité de l'hôte**.**

3.1 L'eau :

L'eau joue un rôle de réservoir ou de vecteur de nombreux micro-organismes tels que *Pseudomonas aeruginosa, Stenotrophomonas malto-philia, Burkholderia cepacia, Serratia marcescens ou Enterobacter cloacae*, Ils se multi-plient dans les réseaux lorsque les conditions de stockage ou de circulation sont limitées (siphons) ou défectueuses (bras morts, entartrage, etc.). De plus, les éléments de robinetterie présentent un risque de contamination rétrograde par des bactéries colonisant ou infectant les individus. Les bactéries peuvent

persister sous forme de biofilms sur les parois des réseaux de distribution d'eau pendant plusieurs mois **(Keck et Fabrice., 2017).**

3.2 L'air :

L'air représente un vecteur de contamination Pour des individus à risque ou à l'occasion De procédures invasives, comme les interventions chirurgicales. Le nombre de micro-organismes présents dans l'air d'une pièce dépend Du nombre d'animaux et de personnes qui L'occupent, du degré d'activité et du taux de Renouvellement de l'air .Les Agents le plus souvent impliqués sont des bactéries d'origine cutanée ou muqueuse, notamment les staphylocoques **(Keck et Fabrice., 2017).**

3.3 Surfaces :

De nombreux micro-organismes pathogènes sont capables de persister pendant des durées prolongées sur les surfaces sèches ou humides. Par ailleurs, la mise en suspension d'agents pathogènes à partir de surfaces peut contaminer l'air ambiant.La contamination du linge survient dès les premières heures de leur utilisation .Pour les tenues, elle est plus marquée au niveau des poignets et des poches. Le linge sale peut contaminer les mains, les tenues ou l'environnement et participer à la transmission croisée des micro-organismes ou à la contamination du personnel **(Keck et Fabrice., 2017).**

Certaines caractéristiques des surfaces et objets influencent le choix des mesures d'entretien. On distingue 2 types de surfaces : Poreuses ; Non poreuses.

- Une surface non poreuse est lisse et imperméable. Parmi les surfaces non poreuses, on distingue celles en contact avec les aliments et celles non en contact avec les aliments.

- Une surface poreuse est perméable. Elle se laisse traverser par les liquides ou les gaz et retient donc les micro-organismes. Un tapis est un exemple de surface poreuse. Les surfaces poreuses ne peuvent pas être désinfectées, car aucun produit désinfectant n'est jugé efficace pour elles. Elles peuvent seulement être nettoyées et assainies. C'est pour cette raison qu'elles ne sont pas recommandées aux endroits susceptibles d'être en contact avec du sang ou d'autres liquides biologiques **(Villeneuve, F., 2019).**

Les surfaces sont contaminées soit par contact ou par sédimentation des microorganismes présents dans l'air .La répartition de la contamination des surfaces se fait le plus souvent de manière hétérogène. L'adhérence des bactéries est possible selon l'état de la surface. Cette adhérence peut s'accompagner de la création d'un biofilm. Du fait des conditions de croissance défavorables, certaines bactéries peuvent se miniaturiser (bactéries naines) et sont alors difficiles à mettre en évidence dans les prélèvements (bactéries viables et non cultivables). D'autres bactéries peuvent prendre une forme sporulée (Clostridium difficile) **(Madi et Djema., 2019).**

Les surfaces les plus contaminées sont : le sol, les barrières de lit, les tables, les vêtements Portés par les patients, les oreillers et les matelas. Toutefois, toutes les espèces bactériennes isolées à partir de ces surfaces ne sont pas Obligatoirement pathogènes mais la flore issue de l'activité humaine comme les bactéries de la Flore cutanée ou des flores muqueuses et certaines espèces bactériennes des flores hydriques Naturelles comme Pseudomonas aeruginosa peuvent être responsables des infections Nosocomiales **(Menidjel, N., 2017).**

4. Les différentes voies de transmission :

Certains patients peuvent nécessiter des précautions spéciales pour limiter la transmission de micro-organismes potentiellement infectieux à d'autres patients. Les mesures d'isolement recommandées dépendent de la voie de transmission). Les principales voies sont :

● Infection aéroportée : l'infection se fait habituellement par la voie respiratoire, l'agent étant présent dans des aérosols (particules infectieuses de diamètre <5 μm).

● Infection par gouttelettes : les gouttelettes véhiculent l'agent infectieux (de diamètre >5 μm).

● Infection par contact direct ou indirect : l'infection se fait par contact direct entre la source d'infection et le receveur ou indirect par l'intermédiaire d'objets contaminés **(OMS).**

5. Prévention de la transmission par l'environnement :

Pour réduire au minimum la transmission de microorganismes à partir du matériel ou de l'environnement, des méthodes de nettoyage, de désinfection et de stérilisation adéquates doivent être mises en place. Chaque établissement élaborera des politiques et procédures écrites, qui seront régulièrement mises à jour **(OMS)**.

5.1 Nettoyage de l'environnement hospitalier :

● Un nettoyage de routine est nécessaire pour assurer un environnement hospitalier d'une propreté visible, et exempt de poussière et de saleté.

● Quatre-vingt-dix pour cent des micro-organismes trouvent dans la poussière visible, et le but du nettoyage de routine est d'éliminer cette poussière. Ni le savon ni les détergents ne possèdent d'activité antimicrobienne, et le processus de nettoyage repose essentiellement sur l'action mécanique.

● Chaque établissement devra établir des politiques spécifiant la fréquence du nettoyage et les produits utilisés pour les murs, sols, fenêtres, lits, rideaux, écrans et rideaux de séparation, installations fixes, meubles, salles de bain et toilettes, ainsi que tous les dispositifs médicaux réutilisables.

● Les méthodes doivent être appropriées au risque de contamination et au niveau d'asepsie requis. Pour cela, on classera les secteurs hospitaliers en quatre zones **(OMS)** :

- **Zone A :** pas de contact avec les patients. Nettoyage ménager courant (par exemple administration, bibliothèque).

- **Zone B :** soins aux patients non infectés, ni hautement vulnérables ; nettoyage par une méthode qui ne soulève pas de poussière. Le balayage à sec et l'aspirateur sont déconseillés. L'emploi d'une solution détergente améliore la qualité du nettoyage. Désinfecter tous les endroits présentant une contamination visible par du sang ou des liquides biologiques avant de les nettoyer.

− **Zone C :** patients infectés (salles d'isolement). Nettoyer avec une solution détergente/désinfectante et un matériel de nettoyage séparé pour chaque salle. (OMS)

− **Zone D :** patients hautement vulnérables (isolement de protection) ou secteurs protégés tels que blocs opératoires, salles d'accouchement, unités de soins intensifs, services des prématurés, services de traumatologie et unités d'hémodialyse. Nettoyer avec une solution détergente/désinfectante et un matériel de nettoyage séparé. Toutes les surfaces horizontales des zones B, C et D et toutes les toilettes doivent être nettoyées chaque jour. (OMS)

● Le contrôle bactériologique de l'environnement n'est pas recommandé sauf dans certaines circonstances telles que :

− Investigation d'une épidémie dans laquelle on suspecte une source environnementale

− Surveillance de la numération bactérienne dans l'eau utilisée pour les dialyses, conformément aux normes prescrites (voir chapitre VIII)

− contrôle de qualité lors du changement de méthodes de nettoyage. (OMS)

5.2 Utilisation d'eau chaude/surchauffée :

Une alternative à la désinfection pour le nettoyage de certains objets consiste à utiliser de l'eau très chaude (tableau 4) **(OMS)**.

TABLEAU 4. **Désinfection à l'eau chaude**

	Température	Durée
1. Sanitaires	80 °C	45–60 secondes
2. Ustensiles de cuisine	80 °C	1 minute
3. Linge	70 °C 95 °C	25 minutes 10 minutes

Tableau 1: Mesures de la désinfection à l'eau chaude.

5.3 Désinfection du matériel utilisé par le patient :

La désinfection élimine les micro-organismes sans stérilisation complète, pour empêcher leur transmission d'un patient à l'autre. Les procédures de désinfection doivent **(OMS) :**

● répondre aux critères de destruction des microorganismes.

● avoir un effet détergent.

● agir indépendamment du nombre de bactéries présentes, de la dureté de l'eau ou de la présence de savon ou de protéines (qui inhibent l'action de certains désinfectants).

Pour être acceptables dans un environnement hospitalier, les produits doivent également être :

● Faciles à utiliser.

● Non volatils.

● Non nocifs pour le matériel, le personnel ou les patients.

● Dépourvus d'odeurs désagréables.

Désinfection de haut niveau (critique) – détruit tous les micro-organismes, sauf en cas de très forte contamination par des spores bactériennes.

Désinfection de niveau intermédiaire (semi-critique) – inactive *Mycobacterium tuberculosis*, les bactéries végétatives, la plupart des virus et certains champignons, mais ne détruit pas nécessairement les spores bactériennes.

Désinfection de bas niveau (noncritique) –peut détruire la plupart des bactéries, certains virus et certains champignons, mais ne doit pas être considérée comme capable de tuer des bactéries plus résistantes telles que *M. tuberculosis* ou les spores bactériennes. On obtient ces niveaux de désinfection en utilisant de façon appropriée le produit chimique adéquat pour le niveau de désinfection visé. **(Madi et Djema., 2019).**

5.4 Stérilisation :

La stérilisation est la destruction de tous les microorganismes. Sur le plan opérationnel, on la définit comme une réduction de la charge microbienne par un facteur 10°6. La stérilisation est obtenue par des moyens physiques ou chimiques **(Tableau 2).**

● La stérilisation est requise pour les dispositifs médicaux pénétrant dans des sites anatomiques stériles, et pour tous les liquides et médicaments destinés à la voie parentérale.

● Pour le matériel réutilisable, la stérilisation doit être précédée d'un nettoyage pour enlever les souillures visibles.

● L'objet doit être enveloppé pour être stérilisé. Seuls les objets stérilisés enveloppés peuvent être qualifiés de stériles **(OMS)**.

TABLEAU 7. **Principales méthodes de stérilisation**

Stérilisation thermique

- Chaleur humide : exposition à de la vapeur saturée d'eau à 121 °C pendant 30 minutes, ou à 134 °C pendant 13 minutes en autoclave (134 °C pendant 18 minutes pour les prions).
- Chaleur sèche : exposition à 160 °C pendant 120 minutes, ou à 170 °C pendant 60 minutes ; ce procédé de stérilisation est souvent jugé moins fiable que la stérilisation par la chaleur humide, notamment pour les dispositifs médicaux creux.

Stérilisation chimique

- L'utilisation d'oxyde d'éthylène et de formaldéhyde pour la stérilisation est progressivement abandonnée pour des questions de sécurité et d'émission de gaz à effet de serre.
- L'acide peracétique est largement utilisé dans des systèmes automatisés aux Etats-Unis d'Amérique et dans certains autres pays.

Tableau 2 : Principales méthodes de stérilisation **(OMS)**

6. Prévention De La Contamination Croisée :

La contamination croisée est le passage d'agents infectieux d'une surface, d'une personne ou d'un objet à un autre qui peut se produire lors du nettoyage, de l'assainissement ou de la désinfection. Pour la prévenir, il est important d'en prendre conscience et d'éviter la diffusion des agents infectieux dans l'environnement par les mains, objets, liquides et autres utilisés lors de l'entretien. **(Villeneuve, F., 2019)**

Pour prévenir la contamination croisée :

- Nettoyer après usage et faire sécher les chiffons et vadrouilles souillés afin de diminuer le niveau de contamination. Ne les laisser tremper dans l'eau souillée.

- Utiliser des chiffons et vadrouilles propres seulement avec une solution propre faite dans un contenant propre. Ne pas laisser de solution résiduelle dans le seau et le faire sécher autant que possible entre les utilisations.

- Utiliser une poubelle à pédale pour éviter que les mains propres touchent la poubelle sale.

- Utiliser un code de couleurs pour les chiffons et vadrouilles (ex. : rouge pour les zones à risque telles que les toilettes et tables à langer, bleu pour les autres).

L'installation de robinets automatiques peut aussi réduire le risque de contamination croisée, car les poignées de robinets sont souvent contaminées.

TABLEAU 5. **Spectre d'activité des principaux désinfectants**

Niveau de désinfection requis	Spectre d'activité du désinfectant	Ingrédients actifs potentiellement capables de répondre à ce spectre d'activité	Facteurs influant sur l'efficacité du désinfectant
Haut	• Sporicide • Mycobactéricide • Virucide • Fongicide • Bactéricide	• Acide peracétique • Dioxyde de chlore • Formaldéhyde • Glutaraldéhyde • Hypochlorite de sodium • Peroxyde d'hydrogène stabilisé • Succinaldéhyde (aldéhyde succinique)	• Concentration • Durée de contact • Température • Présence de matière organique • pH • Présence d'ions calcium ou magnésium (par exemple, dureté de l'eau utilisée pour les dilutions) • Formulation du désinfectant utilisé
Intermédiaire	• Tuberculocide • Virucide • Fongicide • Bactéricide	• Dérivés du phénol • Alcools éthylique et isopropylique	
Bas	• Bactéricide	• Ammoniums quaternaires • Amphiprotiques • Acides aminés	

Tableau 3 : Spectre d'activité des principaux désinfectants **(Villeneuve, F., 2019).**

7. Hygiènes de l'environnement hospitalier :

L'hygiène hospitalière est avant tout une politique visant à prévenir, lutter et contrôler les infections hospitalières grâce à :

- Des mesures et techniques évitant l'apparition et la transmission des micro-organismes pathogènes Au sein d'une structure de santé menant des activités de soins,

- Un ensemble d'actions intéressant la propreté, la salubrité, le choix des produits et des matériels, la pratique des soins, les circuits de la chaîne alimentaire etc.…,

- Des comportements collectifs et individuels.

Elle met en rapport les acteurs (malades, personnel médical et paramédical, personnel administratif et technique, visiteurs et accompagnants) et leur environnement.

Elle nécessite une approche qualitative qui concerne l'organisation des soins, le fonctionnement hospitalier visant à prévenir et/ou corriger les risques iatrogènes encourus par

les malades lors de Leur séjour et le personnel lors du travail en milieu hospitalier. C'est l'un des piliers de la qualité en milieu de soins.

D'un autre point de vue, il est possible de définir les conduites à tenir devant toute situation Epidémique ou supposée l'être par :

- Une analyse précise à partir de l'approche épidémiologique.
- La mise en place des mesures spécifiques et le rappel des principes de base de l'organisation des Soins : c'est l'approche résolutive.
- La vérification de l'efficacité des actions entreprises, c'est l'approche évaluative.

Ce trépied fondamental est considéré comme base de toute action d'hygiène hospitalière.

Cet environnement hospitalier comprend plusieurs composantes dont les éléments de surfaces (sol, matériel, équipement)

Plusieurs causes d'ordres divers peuvent être retenues comme étant à l'origine des infections nosocomiales et des difficultés d'une bonne hygiène hospitalière. Parmi ceux-ci on peut citer :

-La sensibilité des malades,

-L'insuffisance de formation du personnel dans le domaine de la prévention,

-L'habitude des acteurs,

-Le manque d'isolement des infections nosocomiales sur la population d'un hôpital est énorme, selon les Statistiques de l'O.M.S. 3 à 15% des malades (soit une moyenne de 7%) contractent une infection Nosocomiale. **(Maiga, B., 2003)**

7.1 Hygiène des personnels:

Tous les membres du personnel doivent observer une bonne hygiène personnelle. Les ongles seront propres et coupés court. Le port de faux ongles ne sera pas autorisé. Les cheveux devront être courts ou attachés. La barbe et la moustache seront propres et taillées court.

- Tenue vestimentaire (Vêtements de travail / Coiffes Chaussures)

- Masques

- Gants. **(OMS)**

7.2 Hygiènes des locaux

L'hygiène générale des locaux soit (mobilier, sol et murs) et literie (draps et couverture) Est primordiale afin d'éviter la colonisation des flores du malades (peau, intestin) par des Bactéries multi résistantes qui vont secondairement causer des infections nosocomiales chez ces patients. **(Menidjel, N., 2017).**

7.3 Hygiène de matériels :

Matériel de soins : le gros matériel (respirateurs, machines d'hémodialyse, oxygénateurs, nutripompes, appareil de radiologie incubateurs) doit être nettoyer et désinfecté entre deux utilisations et soumis à des contrôles bactériologiques, le petit matériel doit être de préférence jetable si non doit être nettoyée, rincé et désinfecté ou stérilisé. **(Tarzi et Zitouni., 2018).**

7.4 Hygiène des denrées alimentaires:

Il faut donc maintenir un Niveau élevé d'hygiène alimentaire. Un système de Surveillance doit être capable d'identifier dès le début Une flambée potentielle d'intoxications alimentaires et de déclencher rapidement une Investigation et des mesures de lutte si une flambée Est suspectée.

Les intoxications alimentaires peuvent être évitées En suivant les principes de base de l'hygiène alimentaire :

- Limiter la contamination provenant de la source,
- Des mains, des denrées crues et de l'environnement
- Achat
- Stockage
- Réfrigération
- Cuisson
- Hygiène personnelle
- Nettoyage
- Lutte contre les nuisibles [OMS]

8. Prévention aux biofilms :

Un biofilm peut se former en quelques heures dans un environnement humide (par exemple, la salle de bain, les toilettes et la cuisine). Un biofilm est formé d'une membrane qui protège les bactéries qui s'agglomèrent, survivent et prolifèrent en dessous. Les bactéries contenues dans le biofilm peuvent s'en détacher et être une source constante de contamination. Si un désinfectant est utilisé sans que la membrane soit brisée, les bactéries continueront à se développer et à proliférer. Pour atteindre les bactéries contenues dans le biofilm, il faut briser la membrane par une action mécanique, par exemple en frottant avec un chiffon ou une vadrouille avec de l'eau et du savon **(Villeneuve, F., 2019)**.

Le nettoyage doit se faire avec de l'eau propre et du savon ou un nettoyant. Le savon ou le nettoyant utilisé sera choisi en fonction de la tâche à effectuer.

Le rinçage est nécessaire après le nettoyage pour éliminer les particules résiduelles de savon et de matières organiques qui pourraient favoriser le développement des micro-organismes.

S'il y a lieu, les produits de nettoyage devront être compatibles avec les produits utilisés pour l'assainissement ou la désinfection et être entièrement solubles dans l'eau.

Si un même produit est utilisé pour nettoyer et assainir ou nettoyer et désinfecter, 2 applications consécutives de ce produit doivent être effectuées. Il faut s'assurer de bien utiliser le produit selon les recommandations du fabricant **(Villeneuve, F., 2019).**

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

1. Cadre et lieu d'étude :

Il s'agit d'une étude qualitative mesurant la résistance des bactéries responsable des infections nosocomiales aux antibiotiques et une étude quantitative de leur pouvoir de formation de biofilm. Cette étude s'est déroulée dans le laboratoire de la microbiologie du département de biologie de l'université de Médéa au cours d'une période de 2 mois (25 mars – 25 mai) 2022.

2. L'échantillonnage :

Les prélèvements ont été effectués en deux lots (15 prélèvement par chaque lot). Ensuite, Ils ont été acheminés vers le laboratoire universitaire à l'aide d'une glacière.

3. Prélèvement :

Les prélèvements ont été réalisés par la méthode d'écouvillonnage qui consiste à frotter une surface à l'aide des écouvillons standard. La technique utilisée est l'écouvillonnage humide qui nécessite à humidifier l'écouvillon à l'aide d'un diluant-neutralisant ou d'un milieu de rinçage stérile (eau distillée stérile, sérum physiologique, bouillon nutritif plus neutralisant, thioglycolate pour la recherche de Clostridium) : cette étape améliore le relargage des bactéries du support **(CCLIN Sud-Ouest. 2016).**

Tableau 4 : Les sites de prélèvement d'environnement hospitalier.

Numéro de prélèvement	Site de prélèvement	Service
(1)	Sols	MH
(2)	Lits	MH
(3)	Sanitaire	MH
(4)	Poigne de porte	MH
(5)	chariot	MH
(6)	Sols	GNC
(7)	Lits	GNC
(8)	Sanitaire	GNC

(9)	Poignée de porte	GNC
(10)	Chariot	GNC
(11)	Sols	CHH
(12)	Lits	CHH
(13)	Sanitaire	CHH
(14)	Poignée de porte	CHH
(15)	Chariot	CHH
(16)	Sols	CHF
(17)	Lits	CHF
(18)	Sanitaire	CHF
(19)	Poignée de porte	CHF
(20)	Chariot	CHF
(21)	Sols	ONCO
(22)	Lits	ONCO
(23)	Sanitaire	ONCO
(24)	Poignée de porte	ONCO
(25)	chariot	ONCO
(26)	Sols	MF
(27)	Lits	MF
(28)	Sanitaire	MF
(29)	Poignée de porte	MF
(30)	chariot	MF

CHH : chirurgie homme, **CHF :** chirurgie femme, **GNC :** gynécologie,

MH : médecine homme **MF :** médecine femme, **ONCO :** oncologie

4. Enrichissement :

Introduire les écouvillons précédents dans des tubes contenant le bouillon nutritifs. Les tubes sont ensuite acheminés au laboratoire où ils ont été incubés à 37C° pendant 24 à 48 heures jusqu'à l'apparition d'un trouble dans le milieu.

5. Isolement et purification des souches bactériennes :

L'ensemencement se fait par des stries sur des boites de Pétri contenant les géloses Chapman, milieu Mac-Conkey, Gélose Nutritive, milieu Hektoen, gelose au cétrimide et le gélose SS (*Salmonella-Shigella*). L'inoculum est prélevé avec l'anse de platine dans les conditions d'asepsie rigoureuses à partir des milieux d'enrichissement. Les boites sont marquées puis incubées à 37C° pendant 24 à 48 heures.

5.1 Présentation des milieux de cultures :

5.1.1 La gélose nutritive : est un milieu contient les nutriments nécessaires à la réplication d'un grand nombre de microorganismes qui conduit à l'obtention des colonies bien isolées.

5.12 La gélose Mac-Conkey : La gélose Mac-Conkey est un milieu sélectif et différentiel utilisé pour l'isolement et la différenciation de bacilles à Gram négatif non exigeants, en particulier les membres de la famille des entérobactéries et du genre Pseudomonas. Les bactéries Gram-négatives qui poussent sur Mac-Conkey se différencient par leur capacité à fermenter le lactose**.**

5.1.3 La gélose Chapman : milieu sélectif des staphylocoques qui différencie la fermentation du mannitol permettant une orientation entre autres vers *Staphylococcus aureus*.

5.1.4 La gélose Hektoen : permet d'isoler les microorganismes de *Shigella* et de *Salmonella* plus efficacement que les autres milieux couramment utilisés à cette époque. *Salmonella* et *Shigella* ne provoquent pas la fermentation de composés carbonés et ne modifient donc pas la couleur du système indicateur de pH par contre les microorganismes comme E. coli qui provoquent la fermentation d'au moins un de ces composés en acides entraînent un changement de la couleur vers le jaune, l'orange ou le saumon.

5.1.5 La gélose *Salmonella-Shigella* : est un milieu d'isolement sélectif, inhibant les bactéries à Gram positif et utilisé pour la recherche des *Salmonella*. Elle est reconnue comme un milieu modérément sélectif basé sur le degré d'inhibition des microorganismes Gram positifs et des *Enterobacteriaceae* autres que *Salmonella* et *Shigella* qu'elle inhibe en raison de sa teneur en sels biliaires, en vert brillant et en citrates. Les microorganismes fermentant le lactose produisent de l'acide qui, en présence du témoin rouge neutre, déclenchent la

formation de colonies rouges et Ceux qui ne fermentent pas le lactose forment des colonies incolores.

5.1.6 La gélose au cétrimide : La gélose au cétrimide est un milieu sélectif utilisé pour l'isolement et l'identification présomptive de *Pseudomonas aeruginosa*. Le cétrimide est un ammonium quaternaire qui inhibe la croissance de la plupart des autres espèces bactériennes. *Pseudomonas aeruginosa* colore ce milieu en bleu-vert par production de pyocyanine.

6. Identification

6.1 Identification macroscopique :

Elle permet de déterminer la forme, le relief, la consistance et l'aspect des colonies à l'œil nu à partir des différents milieux d'isolement. Cette observation servira de moyen d'orientation pour une indentification plus approfondie.

6.2 Identification microscopique :

Ce test a pour but de déterminer le type de la paroi bactérienne à Gram positif ou Gram négatif après coloration de Gram qui permet de colorer les bactéries et de les distinguer par leur aptitude à fixer le violet de gentiane (bactéries Gram positif) ou la fuchsine (bactéries Gram négatif). On peut aussi observer la disposition des germes et leur morphologie (cocci, bacilles).

6.3 Identification biochimique

6.3.1 Recherche des entérobactéries

Nous avons effectué une galerie biochimique classique caractérisée par les tests suivants :

Test TSI : Le test TSI (Triple Sugar Iron) milieu pour la différenciation des entérobactéries basée sur la production de sulfure d'hydrogène et la fermentation du lactose, du saccharose et du D-glucose. Ensemencer abondamment la surface par des stries serrées, puis le culot par simple piqure. Mettre à l'étuve à 37C° pendant 24h. **(Harley *et al*., 2010)**.

Test citrate de Simmons : La gélose Simmons citrate (milieu minéral minimum au citrate de sodium) est utilisée pour la différenciation des bacilles Gram négatifs. Il permet la recherche du citrate de sodium comme seule source de carbone et d'énergie pour les bactéries. Ce milieu

contribue à la mise en évidence des caractères d'identification des Entérobactéries. L'ensemencement de la pente se fait par une strie longitudinale au fil droit, à partir d'une suspension bactérienne. -ne pas visser le bouchon à fond afin de permettre les échanges gazeux. -Incuber à 37C°pendant 24h **(Prescott, L *et al.*, 2010).**

Test Mannitol mobilité : Le milieu Mannitol-Mobilité-Nitrate est utilisé pour l'identification présomptive des entérobactéries basée sur la fermentation du mannitol, la mobilité et sur la réduction des nitrates en nitrites. L'ensemencement se fait à l'aide d'une anse de platine par une piqûre centrale. L'incubation est effectuée à 37°C pendant 24h.

Test urée- indole : Le milieu urée Indole permet la mise en évidence de l'uréase, du tryptophane désaminase et de la production d'indole (le milieu contribue à la mise en évidence des caractères d'identification des Entérobactéries).
Dans un tube contenant l'urée indole, on rajoute quelques gouttes de la suspension bactérienne, puis incuber à 37° pendant 24 heures.la présence d'indole dans le milieu est détecté grâce à l'ajoute de quelque gout de réactif de covacs.

6.3.2 Recherche des *Pseudomonas* :

Ensemencement dans le milieu sélectif (gélose au cétrimide) par la détection de la pyocyanine afin d'orienter l'identification de *Pseudomonas aeruginosa.*

6.3.3 Recherche des Staphylocoques :

Le milieu Chapman est un milieu qui ne permet au premier passage que le développement des seuls staphylocoques pathogènes **(Buttiaux, R et Lesne, L., 1947).** Alors que tous les souches isolées sur milieu selectif de chapman, sur lequel on a conctaté un virage du mulieu au jaune sont considérées comme des souches de *staphylococcus*.

Test coagulase :

La coagulase libre est une enzyme libérée dans le milieu au cours de la culture par *Staphylococcus aureus*. Sa mise en évidence permet seule, d'affirmer la présence de S. aureus. Cette enzyme est capable in vitro de coaguler le plasma **(Andre *et al.*, 2008)**.

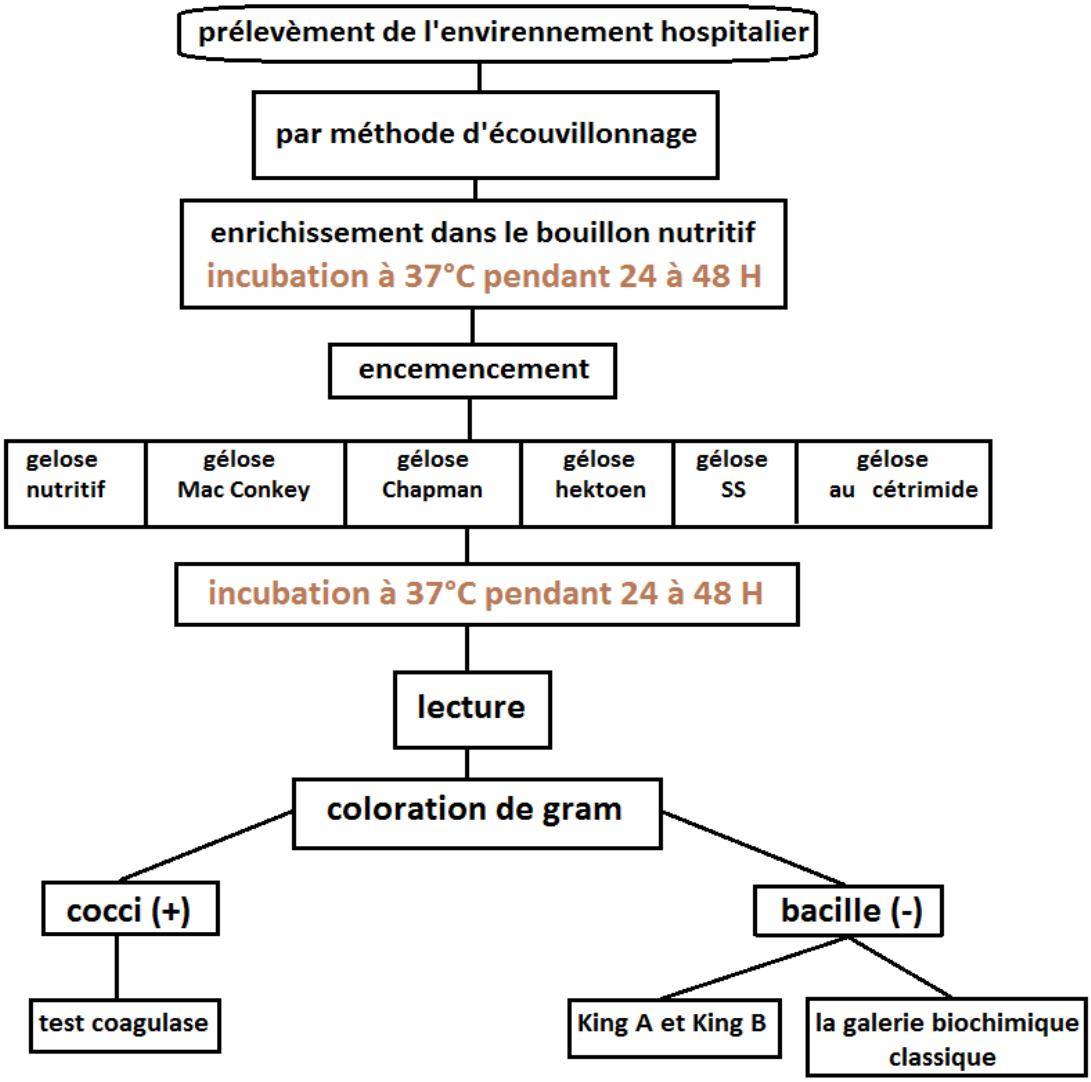


Figure 3 : récapitulatif de la méthodologie de l'identification

7. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques

Pour réaliser l'antibiogramme par la méthode des disques, la culture bactérienne a été effectuée à la surface d'une gélose spécialement étudiée, la gélose de Muller – Hinton.

Des disques de papier buvard, imprégnés des antibiotiques à tester, ont été déposés à la surface du milieu de culture, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. Dès l'application des disques, les antibiotiques diffusent de manière uniforme si bien que leurs concentrations sont inversement proportionnelles à la distance du disque. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture. La sensibilité à l'antibiotique est ainsi dépendante du diamètre

d'inhibition observée sur la boite. Une courbe de concordance préétablie permet ainsi de déterminer la CMI en fonction du diamètre d'inhibition mesuré **(Seydina, M., 2016).**

Les Tableaux suivants montrent les antibiotiques testés contre les Entérobactéries, les *Pseudomonas* et les staphylocoques selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie **(CASFM 2021)**.

Tableau 5 : Les antibiotiques testés contre les Entérobactéries.

Antibiotique	Abréviation	La charge (µg)	famille
Ampicilline	AMP	10	ß- lactamine
Ticarcilline	TI	75	
Ceftriaxone	CTR	30	
Amikacine	AK	30	Aminosides
Gentamicine	HLG	120	
Tobramycine	TOB	10	
Lévofloxacine	LE	5	fluoroquinolones
Azithromycine	AZM	15	macrolides

Tableau 6 : les antibiotiques testés contre les Staphylocoques

Antibiotique	Abréviation	La charge (µg)	famille
Penicilline G	P	10	ß- lactamine
Oxacilline	OX	5	
Gentamicine	HLG	120	Aminosides
Tobramycine	TOB	10	
Vancomycine	VA	30	glycopeptides
Teicoplanine	TEC	30	
Érythromycine	E	15	Macrolides
Clindamycine	CD	2	lincosamides
Rifampicine	RIF	30	rifamycines
Tétracycline	TE	30	tétracycline
Nitrofurantoïne	NIT	100	nitrofuranes

Tableau 7 : les antibiotiques testés contre *Pseudomonas aeruginosa*

Antibiotique	Abréviation	La charge (µg)	famille
Ticarcilline	TI	75	ß- lactamine
Aztréonam	AT	30	
Amikacine	AK	30	Aminosides
Gentamicine	HLG	120	
Tobramycine	TOB	10	
Lévofloxacine	LE	5	fluoroquinolones

Antibiogramme :

1. Préparation de l'inoculum : Introduire l'anse dans un tube d'eau physiologique stérile de 5 ml. Dans l'eau, frotter l'anse sur la paroi du tube, pour disperser les bactéries. Répéter l'opération 4 fois, de façon à introduire 5 colonies au total et homogénéiser le tube par rotation manuelle, puis noter.

2. Ensemencement de la gélose Muller Hinton pour l'antibiogramme : Dans le tube d'inoculum, introduire un écouvillon stérile. Mouiller l'écouvillon, puis essorer les excédents de liquide contre la paroi du tube. Ensemencer la gélose Mueller Hinton en frottant l'écouvillon sur sa surface. Réaliser des stries serrées et Reproduire l'opération deux fois en tournant de 60° la boite à chaque fois afin d'assurer une distribution homogène de l'inoculum

3. Dépôt des disques d'antibiotiques : Déposer la gélose Mueller Hinton préalablement ensemencée sur le plan de dépôt fourni. A l'aide d'une pince stérile, déposer les disques antibiotiques à la surface de la gélose et Incuber la boite, en position retournée, 16 h minimum à 37°C.

4. Lecture des résultats : Après incubation, les boites de pétri sont examinées et les diamètres des zones d'inhibition entourant les disques sont mesurés et comparés aux valeurs critiques des différents agents antimicrobiens testés, afin de déterminer la catégorie clinique (résistant, intermédiaire sensible). L'interprétation en sensible (S) intermédiaire (I) ou résistante (R) est effectuée selon les critères définis par **(CASFM 2021)**.

8. Conservation des souches :

Les souches sont conservées dans des tubes contient un milieu de conservation à une température de 4°C (ces bactéries sont placées dans un état de vie ralentie ou momentanément suspendue donc dans des conditions peu favorables pour leur multiplication).

9. Mise en évidence de la formation de biofilm :

9.1 La méthode du Rouge Congo :

le milieu Congo Red Agar (CRA) est un milieu solide utilisé pour la détection de la formation de biofilm par la production de slim. les souches exprimant PIA (polysaccharide intercellular adhesin) ont produit des colonies noires avec des surfaces rugueuses pour les colonies rouges et des surfaces lisses pour les souches PIA-négatives **(Ziebuhr *et al*., 2001).**

Technique :

Ce milieu est préalablement préparé en additionnant 0,8 g de Rouge Congo, 37 g de saccharose à 1 L de BHI (Bouillon Cœur Cervelle) et 10 g d'agar. Le colorant rouge Congo a été préparé comme solution aqueuse concentrée et autoclavée (121°C pendant 15 minutes) séparément des autres constituants de milieu, et ajouté lorsque l'agar avait refroidi à 55°C. Le milieu est ensuite ensemencé par des striés serrées à l'aide d'une anse de platine, à partir des milieux de conservation, puis incubé à 37° pendant 24 à 48 heures **(Freeman *et al*,. 1989)**.

9.2 La méthode de Crystal violet (en tubes) :

Afin d'évaluer et de comparer la formation de biofilm de nos 32 souches bactériennes, nous avons effectué le test dans des tubes en utilisant le milieu BHI (Bouillon Cœur Cervelle).

Le test a été réalisé selon **(Benslimane S *et al.,* 2020)** avec quelques modifications, chacune de nos différentes souches bactériennes et ensemencée dans du BHI à 37°C pendant 48H, puis la densité a été ajustée à 0.5 Mc Farland (entre 0.08 à 1 à une longueur d'onde de 600 nm). 200 µl de chacune de ces suspensions de nos différentes souches ont été inoculées dans une série de tubes contenant chacune 2 ml de BHI (Bouillon Cœur Cervelle).

Après la durée d'incubation, le biofilm est quantifié à l'aide de la technique du Crystal violet. Le milieu de chaque tube est jeté et les tubes sont lavés 3 fois avec du PBS (tampon phosphate salin) ou de l'eau physiologique afin d'éliminer les cellules non adhérentes, puis laissés

sécher à l'air libre pendant 20 min. 2 ml de Crystal violet à 0.1% (p/v) sont ajoutés à chaque tube pendant 20 min, puis les tubes sont rincés abondamment pour éliminer l'excès de colorant et laissés sécher de nouveau à l'air pendant 20 min. Après séchage, 2 ml d'éthanol à 96% est ensuite ajouté dans chaque tube afin de solubiliser le colorant lié aux cellules adhérentes et laissé incuber pendant environs 30 min, le contenu de chaque tube a été mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595nm **(Benslimane S *et al*., 2020)**.

10. Optimisation de la formation de biofilm :

- Méthode de plaque de culture de tissus (TCP) :

La détermination quantitative de la formation de biofilm dans les microplaques à 96 puits est basée sur la mesure colorimétrique du cristal violet incorporé par cellules sessiles **(Chavant *et al.* ,2006)**.

Technique :

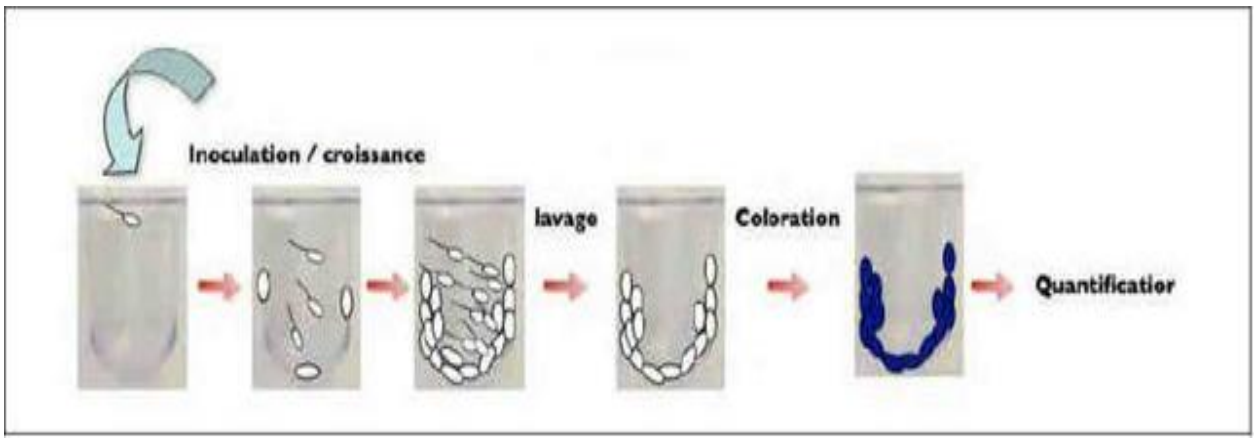


Figure 4 : Principe des techniques de quantification des biofilms en microplaque **(Laurent., 2011)**.

Une souche de chaque genre de bactérie isolée est testée dans le milieu BHI (Bouillon Cœur Cervelle) et dans un BHI additionnée et modifiée par plusieurs paramètres afin de déterminer les meilleures conditions favorisant la formation de biofilm, les paramètres sont représentés dans le Tableau 8.

Tableau 8 : les paramètres utilisés dans le test de formation de biofilm par la méthode de (TCP).

Paramètre 1 : BHI+ glucose	**Paramètre 2 : BHI + saccharose**	**Paramètre 3 : BHI+ glucose et saccharose**	**Paramètre 4 : BHI avec PH modifier**
2% glucose	2% saccharose	2% glucose+2% saccharose	pH=3
3% glucose	3% saccharose	2% glycose+3% saccharose	pH=4
4% glucose	4% saccharose	2% glucose+4% saccharose	pH=6.2
5% glucose	5% saccharose	2% glucose +5%saccharose	pH=8
Paramètre 5 : Les 7 souches sont testées dans trois différentes températures d'incubation 25°C, 30°C et 37°C dans le milieu BHI.			

A partir d'une culture de 18 heures dans le milieu BHI (Bouillon Cœur Cervelle), les puits d'une microplaque de 96 puits (polystyrène) ont été inoculés avec 100 µL de suspension de bactéries qui a été ajustée préalablement à 0.5 Mc Farland (entre 0.08 à 1 à une longueur d'onde de 600 nm) à laquelle sont ajoutés 100 µL de milieu utilisé (BHI ; BHI additionnée ; BHI modifiée).

Les microplaques sont incubées pendant 24 heures à 37°C. Les puits ont été lavés trois fois avec 0,2 mL de l'eau physiologique stérile afin d'éliminer les bactéries libres (planctoniques). Les biofilms formés par l'adhérence des organismes sessiles sont colorés avec du cristal violet (0,1%) pendant 10 min(le cristal violet est une petite molécule qui diffuse à travers les membranes bactériennes et pénètre à l'intérieur des bactéries pour se complexer aux molécules chargées négativement) L'excès de colorant est ensuite rincé par un lavage en profondeur avec de l'eau distillée stérile et les plaques sont laissées à température ambiante pour séchage **(Stepanovic *et al.*, 2000).**

La quantité de cristal violet solubilisé a été mesuré par lecture de la densité optique à 600nm dans un lecteur de plaque ELISA.

Lecture :

La classification des résultats obtenus présente sur la base du DO témoin**.** . Les souches ont été classées comme suit :

DO ≤ DOt(Témoin) : non formatrice du biofilm ;

DOt × 2 ≤ DO ≤ DOt × 4 : Modérée ;

DOt × 4 ≤ DO : Fortement formatrice du biofilm

11. Traitement statistique des résultats :

Les résultats de ces expérimentations ont été présentés sous forme de moyenne ± écart type L'étude statistique a été effectuée en utilisant le logiciel SPSS 20. Les moyennes sont comparées aux témoins à l'aide du test t de Student. Les valeurs ont été considérées comme statistiquement significatives au seuil de probabilité de 5 % ($p < 0.05$).

Résultats et discussion

Résultats et discussion

1. identification des isolats :

1.1 Résultats de l'enrichissement :

Après une culture de 48 H, un trouble a été constaté au niveau de la majorité des tubes.

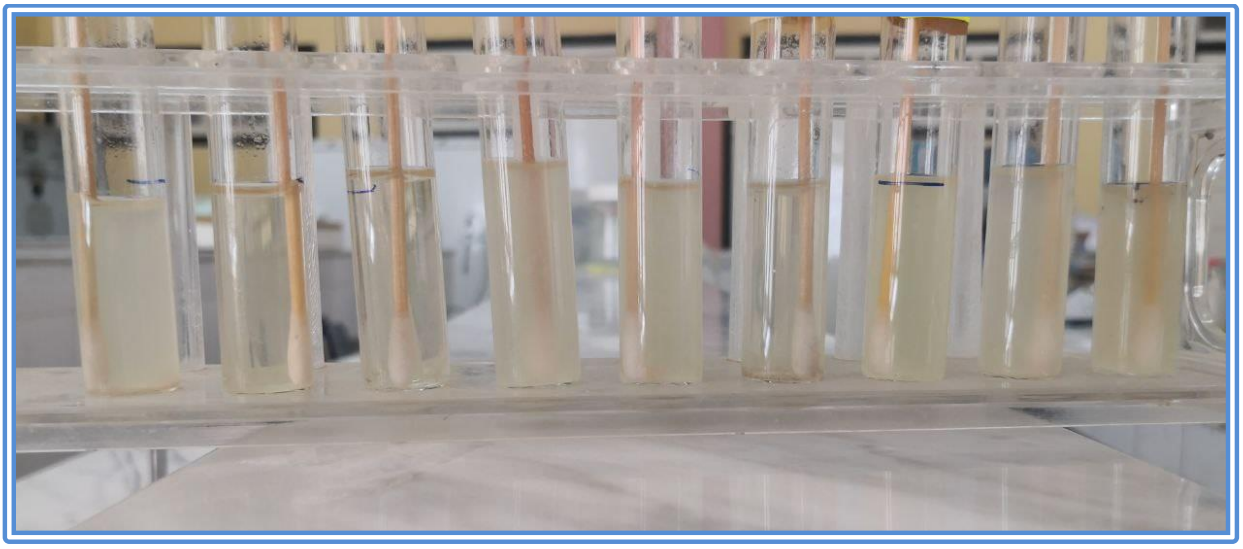


Figure 5: Résultats de l'enrichissement après incubation de 48h.

1.2 Étude macroscopique :

Le tableau 9 illustre les résultats de l'observation macroscopique des souches isolées sur les différents milieux de culture utilisées.

Tableau 9 : Résultats de l'observation macroscopique.

Milieu	Croissance	organisme
Mac conkey	Colonie rose vif à rouge	*E.coli, Enterobacter, klebsiella*
Hektoen	Colonies Jaunes saumon	*E.coli, Entirobacter, klebsiella*
	Colonies Jaune saumon à centre noir	*Proteus vulgaris*
	Colonies vertes humide et convexe	*Shigella*

Chapman	colonies jaunes et entourées d'une auréole jaune	*Staphylococcus aureus*
	petites colonies jaunes	*Staphylococcus spp*
gelose Salmonella Shigella	Colonies incolores	*Shigella spp*
Gélose au Cétrimide	Colonies bleu vert	*Pseudomonas aeruginosa*



Figure 6 : Aspect d'*Enterobacter* sur Mac Conkey.

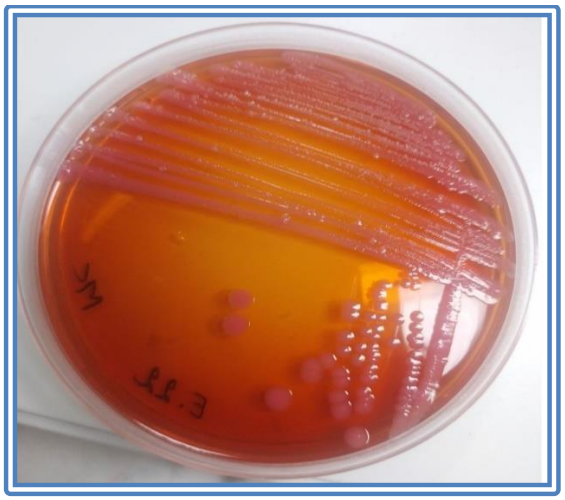


Figure 7 : Aspect d'*E. Coli* sur Mac Conkey



Figure 8 : Aspect de *Klebsiella.*

À gauche : sur le milieu *Salmonella Shigella* ; à droite sur Hektoen

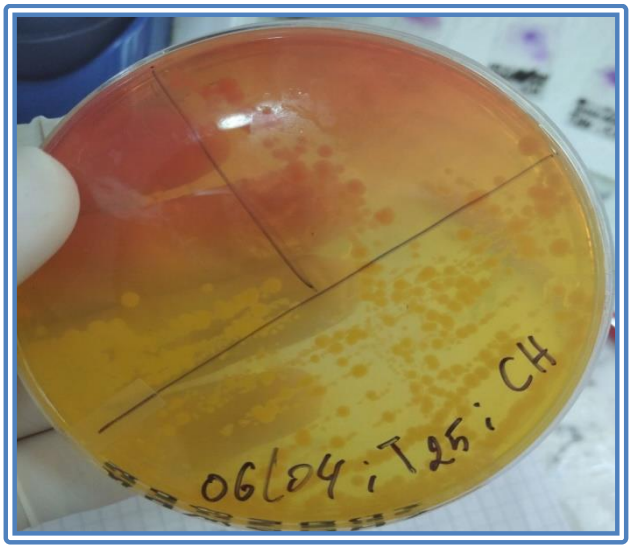


Figure 9 : Aspect de *Staphylococcus aureus* sur Chapman.

1.3 Etude microscopique :

Les résultats après coloration de gram sont résumés dans le tableau 10.

Tableau N 10 : Résultats de l'observation microscopique.

Isolats	Coloration de gram
Les entérobactéries	Bacilles Gram (-)
Staphylococcus aureus	Cocci Gram (+)
Pseudomonas aerogenosa	Bacille Gram (-)

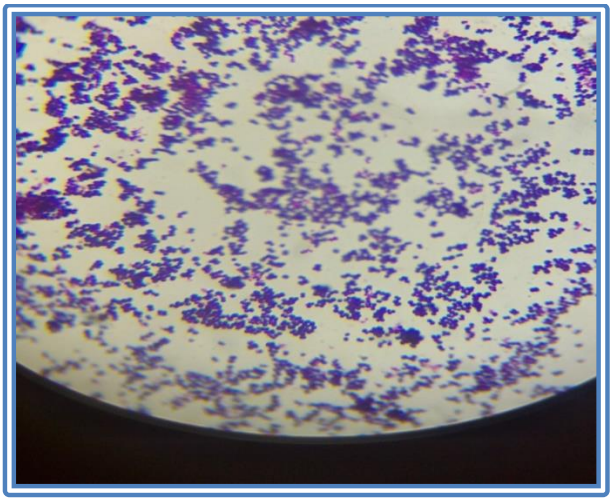


Figure N 10 : Cocci Gram (+) à partir de l'échantillon N° 16.

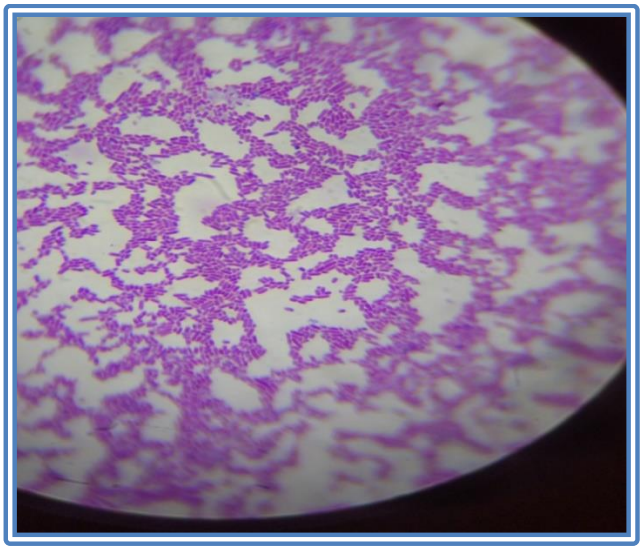


Figure 11 : Bacille à Gram (-) à partir de l'échantillon N°1.

1.4 Identification des entérobactéries :

1.4.1 Identification biochimique :

Le tableau 11 et les figures 11, 12, 13, 14 et 15 illustrent les résultats de la galerie biochimique classique.

Tableau 11 : Résultats des tests biochimiques.

Tests / Souches	H2S	Gaz	Urée	Indole	Mannitol	Mobilité	Citrate	glucose
E. Coli	-	+	-	+	+	+	-	+
Proteus vulgaris	+	+	+	+	-	+	+	+
Shigella	-	-	-	+	-	-	-	+
Entirobacter	-	+	-	-	+	+	+	+
Klebsiella	-	+	+	-	+	-	+	+

(+) : test positif ; (-) : test négatif

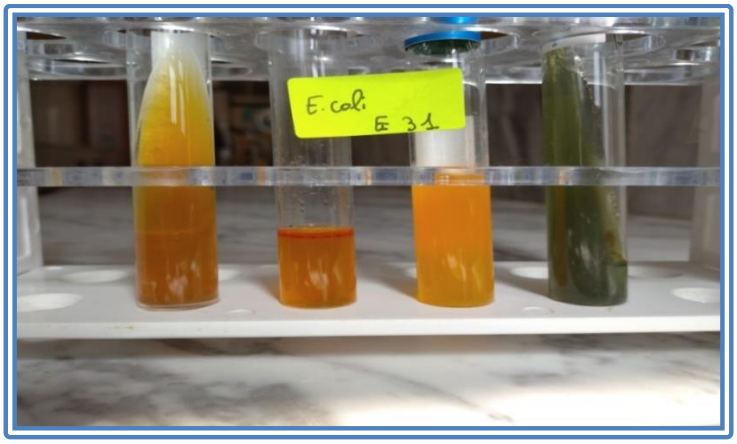


Figure 12 : galerie biochimique classique pour *E. Coli.*

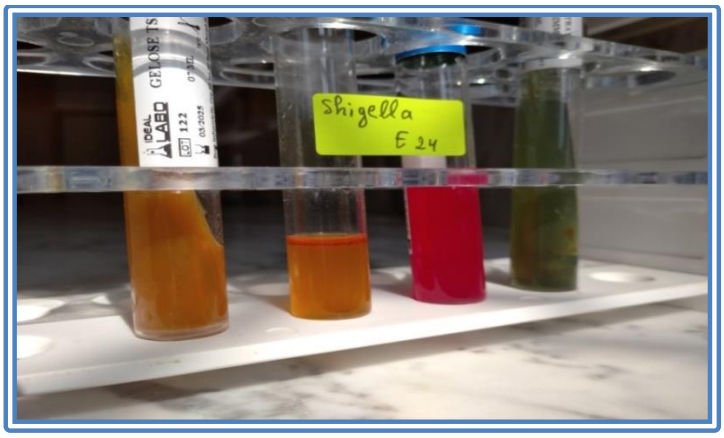


Figure 13 : Galerie biochimique classique pour *Shigella.*

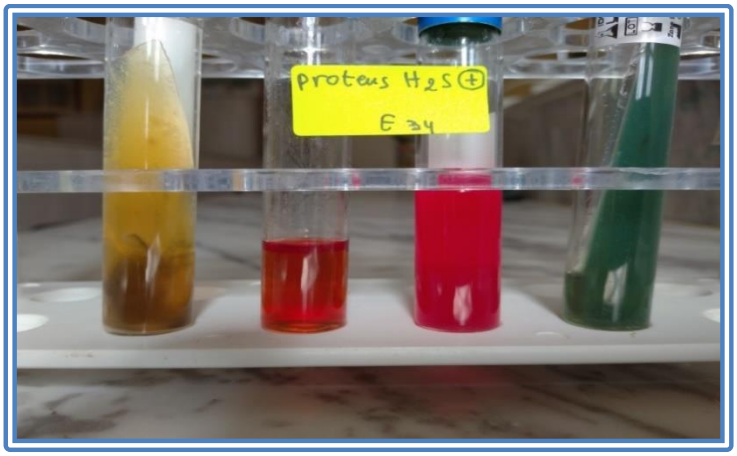


Figure 14 : Galerie biochimique classique pour *Proteus vulgaris*.

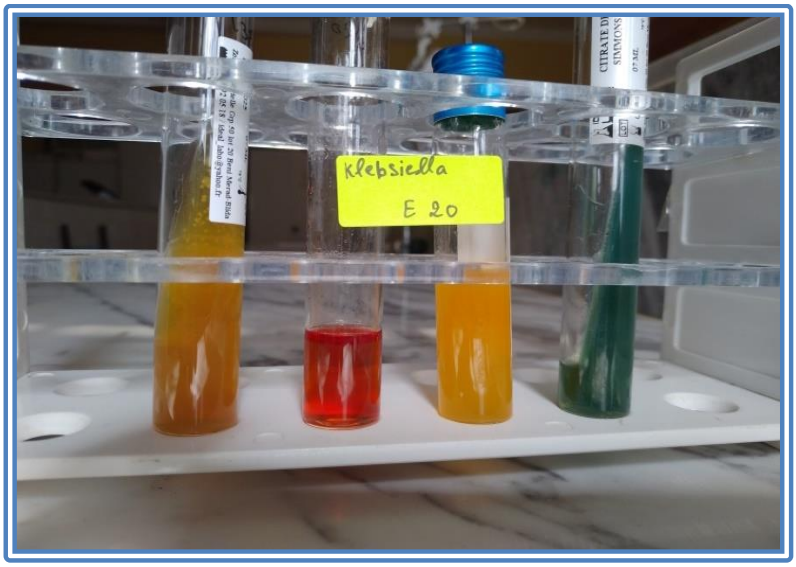


Figure 15 : Galerie biochimique classique pour *klebsiella.*

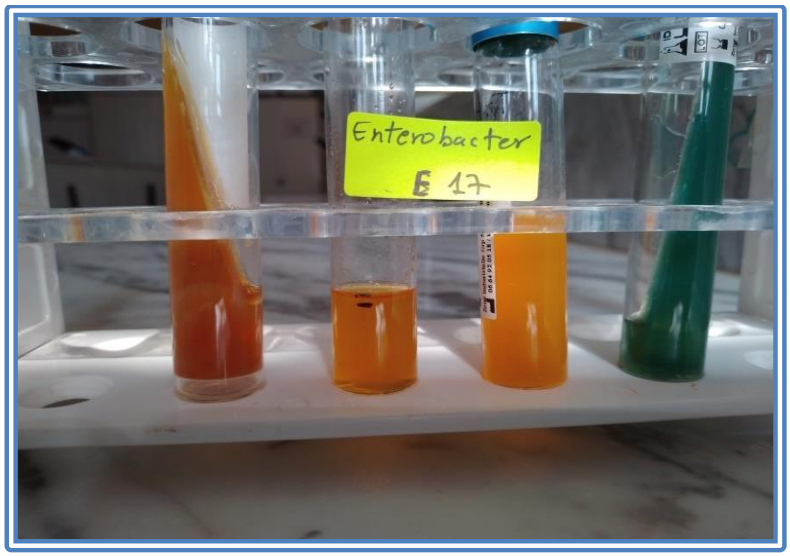


Figure 16 : Galerie biochimique classique pour *Enterobacter*.

1.5 Identification des *Pseudomonas* :

Apres incubation de 48h dans la gélose au cétrimide, nous avons observé la de pyocyanine qui se traduit par la couleur bleu-vert.



Figure 17 : Aspect macroscopique de *Pseudomonas Aeruginosa* sur gélose au cétrimide.

1.6 Identification des staphylocoques :

Après incubation de 48 H à 37 °C, une souche de *Staphylococcus* qui aura fermenté le mannitol du milieu de Chapman en moins de 48 H et qui provoque la coagulation du plasma de lapin en moins de 24 H doit être comme une souche de *Staphylococcus Aureus*.

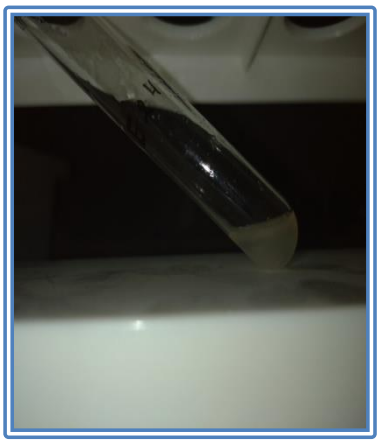


Figure 18 : Coagulasse négative.





Figure 19 : Coagulasse positive.

- **Répartition des prélèvements positifs**

La figure suivante montre que 70% (21/30) de prélèvements sont positifs contre 30% (9/30).

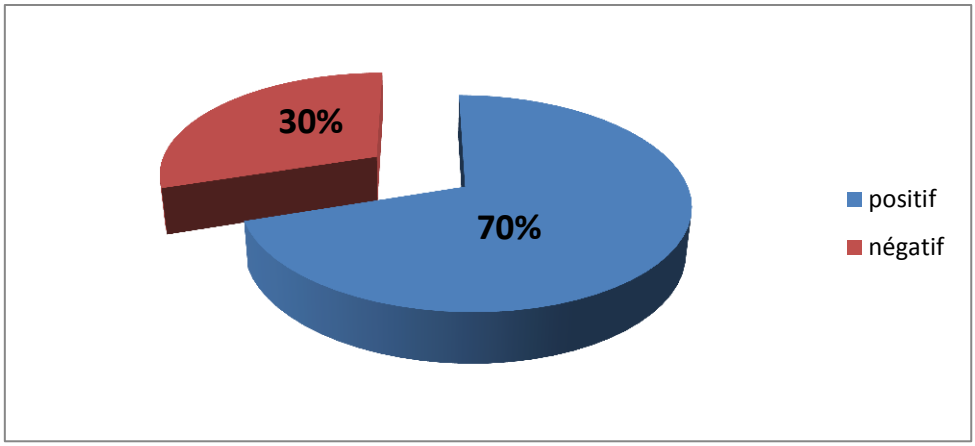


Figure 20 : Répartition des prélèvements positifs.

- **Répartition des prélèvements positifs selon les services**

Parmi les 30 prélèvements réalisés dans les 6 services, seule la chirurgie homme présente un taux de 100% du prélèvement positif. La répartition résumée dans le tableau 13.

Tableau 12 : Répartition des prélèvements positifs selon les différents services.

Services	Nombre de prélèvement	Les prélèvements positifs	Taux
MH	5	3	60%
GNC	5	2	40%
CHH	5	5	100%
CHF	5	4	80%
ONCO	5	4	80%
MF	5	3	60%
Totalité	30	21	70%

ONCO : oncologie, **MF :** médecine femme, **MH :** médecine homme, **GNC :** gynécologie, **CHH :** chirurgie homme, **CHF :** chirurgie femme,

- **Répartition des prélèvements positifs selon les sites de prélèvements**

Le taux le plus élevé a été observé dans les lits des malades 100% (06/06) suivi par les prélèvements dans les surfaces des sanitaire 83% (05/06), les résultats sont représentés sur le tableau 13

Tableau 13 : Répartition des prélèvements selon les sites de prélèvement.

Site de prélèvement	Nombre de prélèvement	Nombre de prélèvements positif	Taux
sols	6	4	66%
lits	6	6	100%
Sanitaire	6	5	83%
Poignés de porte	6	4	66%
chariot	6	2	33%

- **Répartition des souches isolées dans les prélèvements des surfaces**

La fréquence des bactéries à Gram négatifs en fonction des bactéries isolées à partir de l'environnement hospitalier est de 67% (22/32) et pour les Cocci a Gram positifs 31% (10/32) avec une prédominance des souches de *Staphylococcus aureus* 19% (06/32). La figure 20 représente ces résultats.

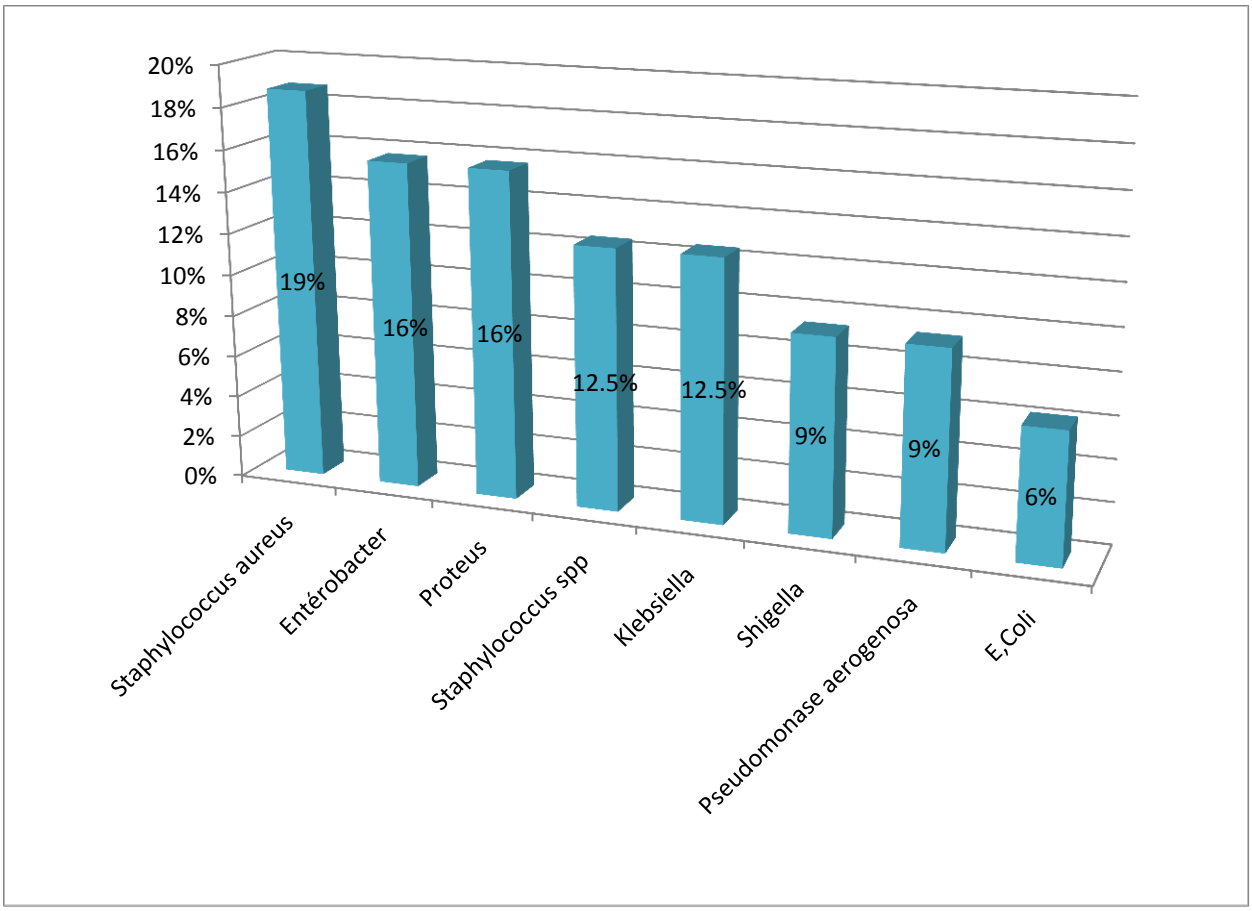


Figure 21 : Répartition des souches identifier dans les différents services.

2. Résistance des souches aux antibiotiques :

Une série de tests a été faite pour caractériser les 32 souches isolées selon leur profil de résistance aux antibiotiques.

2.1 Antibiogrammes :

L'antibiogramme a été réalisé pour les 32 souches isolées vis-à-vis de 11 antibiotiques pour les Staphylocoques, 8 pour les entérobactéries et 6 pour les *Pseudomonas*. Le choix des antibiotiques et des diamètres critique selon (EUCAST, 2021). Des exemples d'antibiogrammes sont montrés dans les figures 21, 22 et 23.

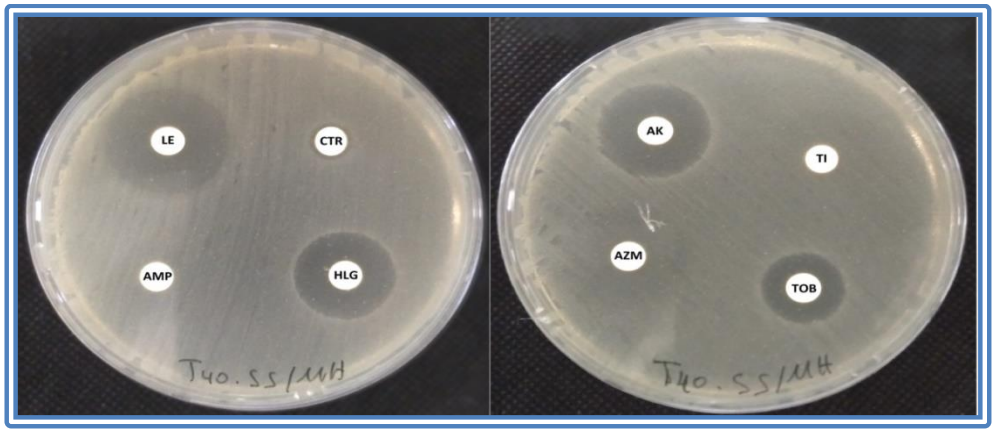


Figure 22 : résultat de l'antibiogramme pour *Proteus.*

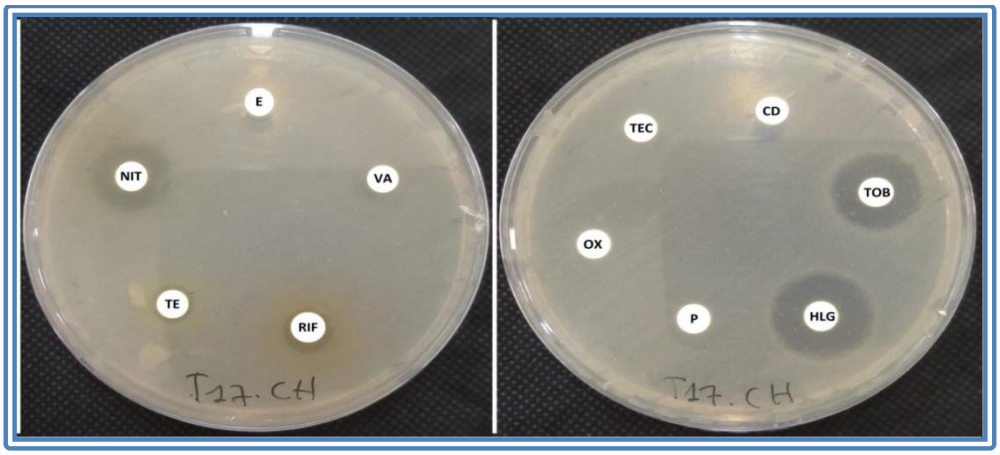


Figure 23 : résultat de l'antibiogramme pour *Staphylococcus aureus.*

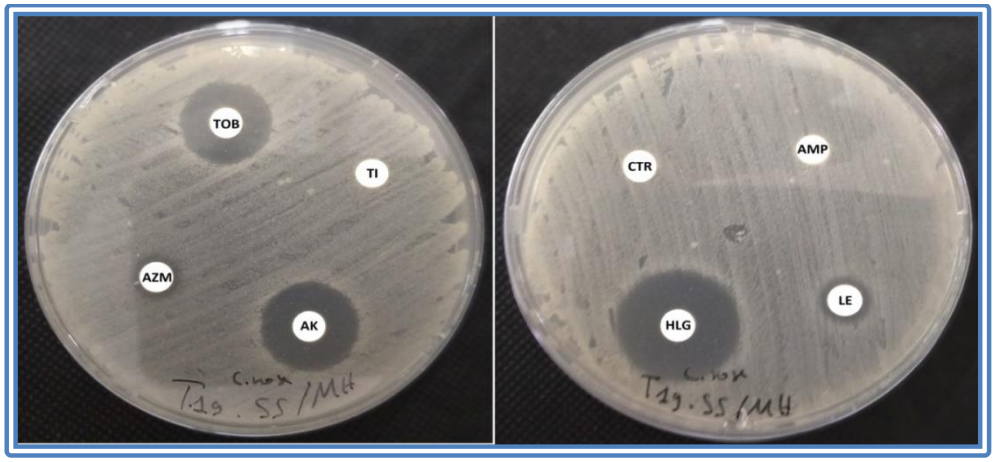


Figure 24 : Résultat de l'antibiogramme pour *Enterobacter*.

- **Répartition de souches résistantes par espèces**

D'après le test de sensibilité aux antibiotiques, les *S. aureus* sont caractérisée par un taux de résistance élevé 66%, suivi par *Enterobacter* avec un taux de 60%.les différents taux de résistance aux antibiotiques sont donnés dans le tableau 14.

Tableau 14 : Répartition de souches résistantes par espèces.

Souche	Nombre de Souche isolée	Nombre de Souche résistant	taux
Staphylococcus aureus	6	4	66%
Enterobacter	5	3	60%
proteus	5	2	40%
Staphylococcuq spp	4	3	75%
Klebsiella	4	2	50%
Shigella	3	1	33%
Pseudomonas aerugenosa	3	1	33%
E.Coli	2	0	0%
Totalité	32	16	50%

- **Répartition des souches résistantes selon les différents services**

D'après nos résultats 38% (5/13) des souches ont été considérés résistantes, ces souches sont rencontrées chez la chirurgie homme suivi par la médecine homme avec un taux de 23% (3/13). La répartition est exprimée dans le tableau 15.

Tableau 15 : Répartition des souches résistantes par service.

Service	MH	GNC	CHH	CHF	ONCO	MF	Totale
Nombre de Souche isolés	**5**	**2**	**7**	**4**	**7**	**3**	**32**
Nombre de souche résistante	**3**	**1**	**5**	**1**	**0**	**3**	**12**
Taux	**23%**	**8%**	**32%**	**8%**	**0%**	**32%**	**100%**

MH : médecine homme, **GNC :** gynécologie, **CHH :** chirurgie homme, **CHF :** chirurgie femme, **ONCO :** oncologie, **MF :** médecine femme.

2.2 Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques :

Les figures 24 et 25 regroupent les résultats obtenus par genre pour les 32 souches isolées vis-à-vis chaque antibiotique et les figure 26, 27 et 28 regroupent les résultats par rapport à chaque famille d'antibiotique.

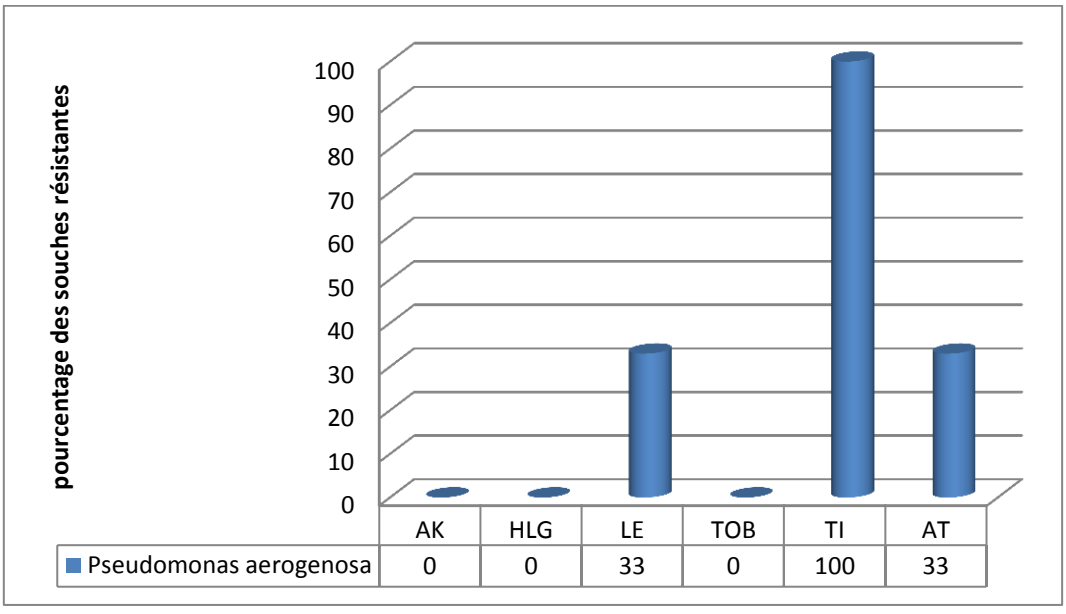
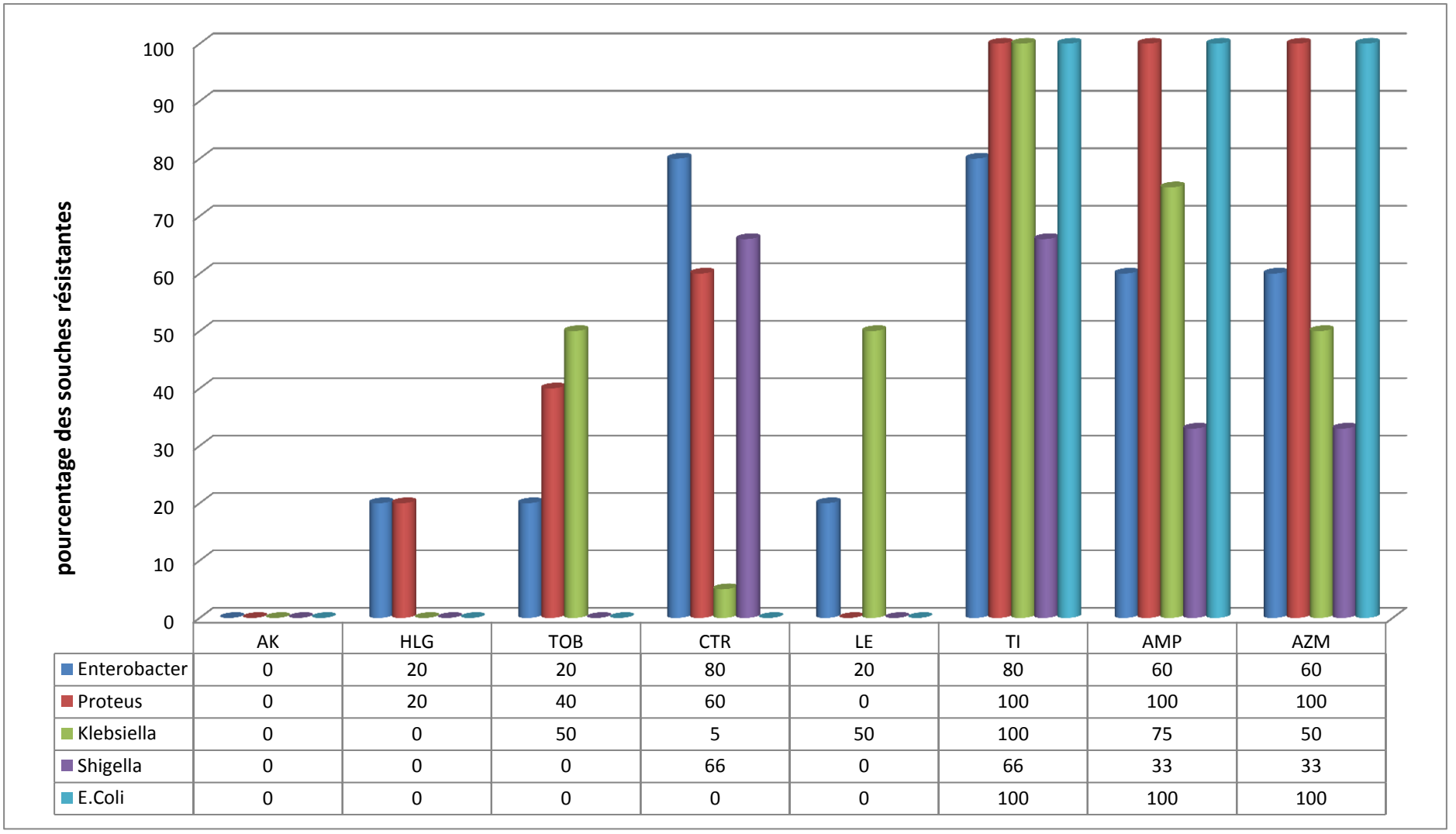
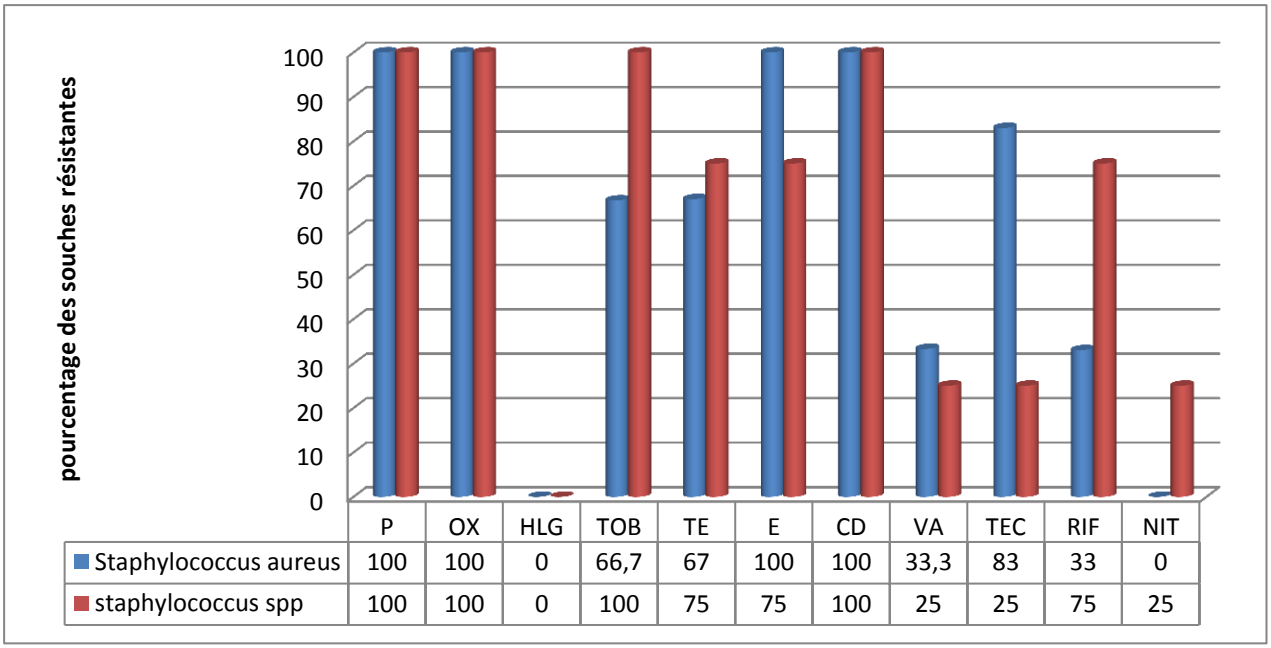


Figure 25: Taux de résistance des *Pseudomonas aerugenosa* aux différents antibiotiques testés.



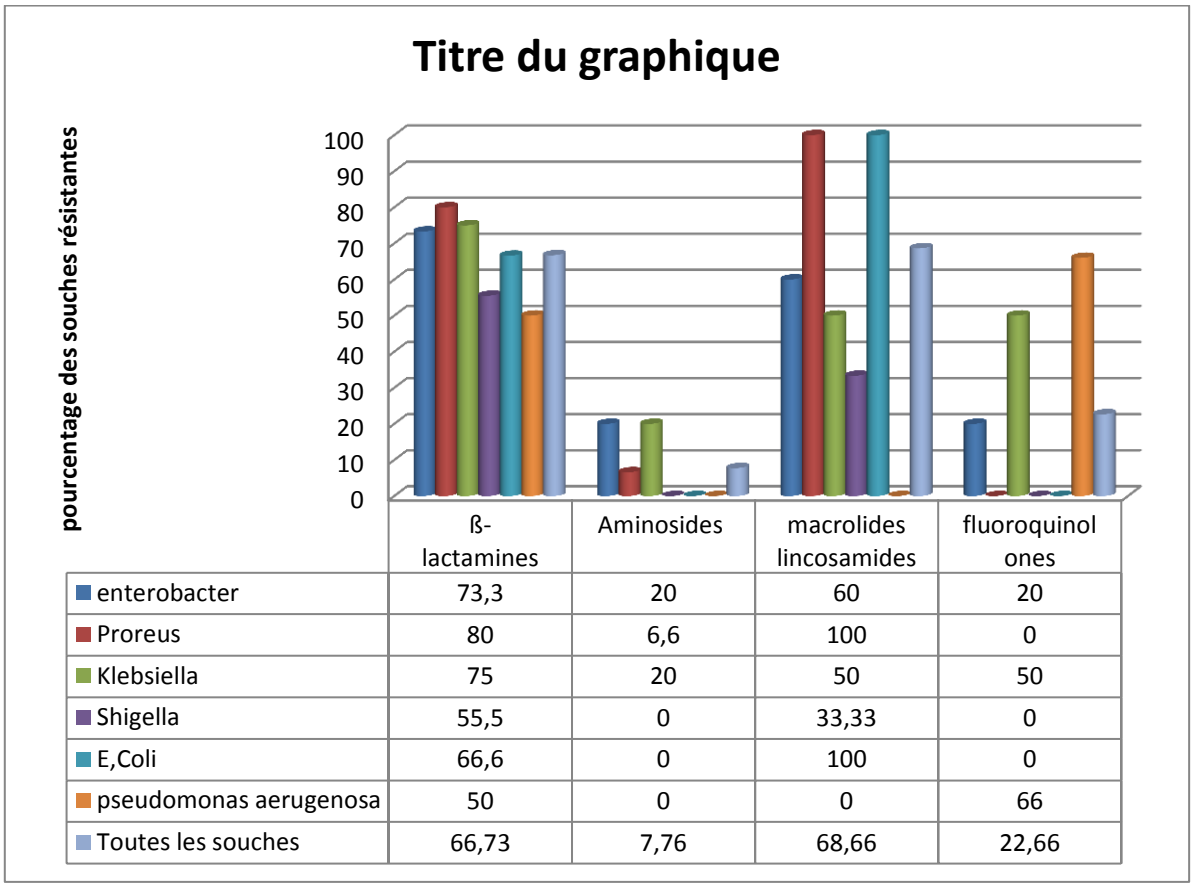
	AK	HLG	TOB	CTR	LE	TI	AMP	AZM
Enterobacter	0	20	20	80	20	80	60	60
Proteus	0	20	40	60	0	100	100	100
Klebsiella	0	0	50	5	50	100	75	50
Shigella	0	0	0	66	0	66	33	33
E.Coli	0	0	0	0	0	100	100	100

Figure 26 : taux de résistance (%) des entérobactéries isolées aux différents antibiotiques testés.



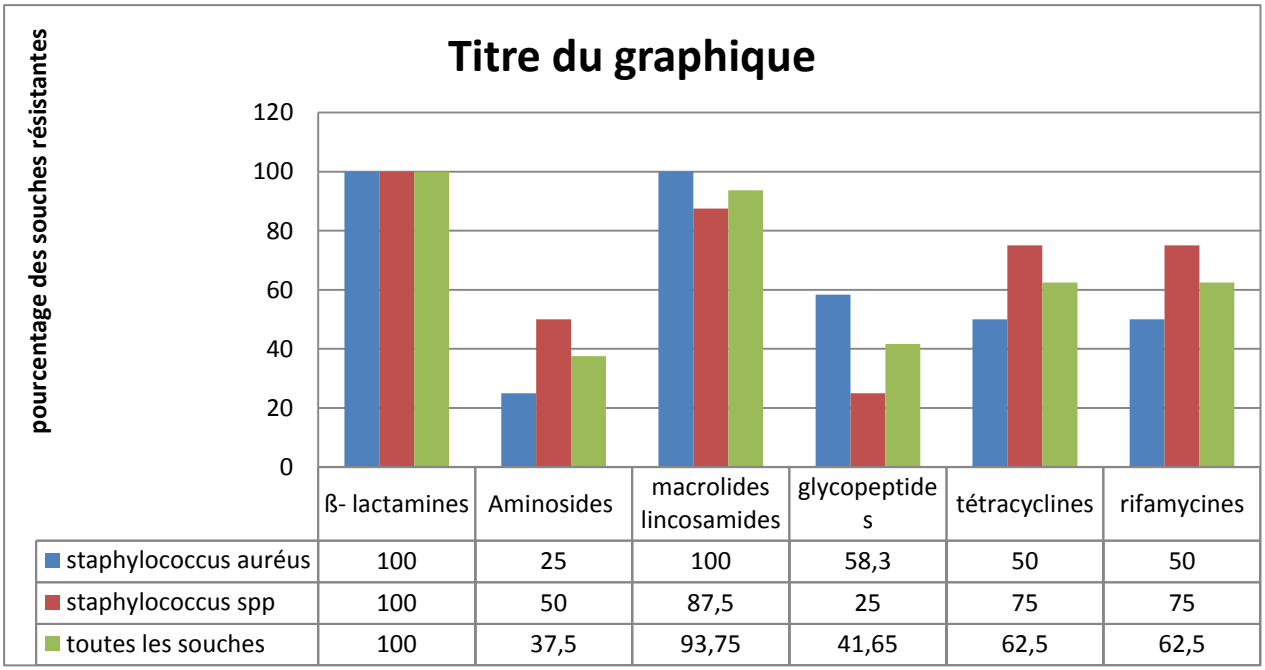
	P	OX	HLG	TOB	TE	E	CD	VA	TEC	RIF	NIT
Staphylococcus aureus	100	100	0	66,7	67	100	100	33,3	83	33	0
staphylococcus spp	100	100	0	100	75	75	100	25	25	75	25

Figure 27 : Taux de résistance (%) des souches de Staphylocoques isolées aux différents antibiotiques testés.



	ß-lactamines	Aminosides	macrolides lincosamides	fluoroquinolones
enterobacter	73,3	20	60	20
Proreus	80	6,6	100	0
Klebsiella	75	20	50	50
Shigella	55,5	0	33,33	0
E,Coli	66,6	0	100	0
pseudomonas aerugenosa	50	0	0	66
Toutes les souches	66,73	7,76	68,66	22,66

Figure 28 : Taux de résistance (%) des bacilles gram négative isolées aux différentes familles d'antibiotiques testés.



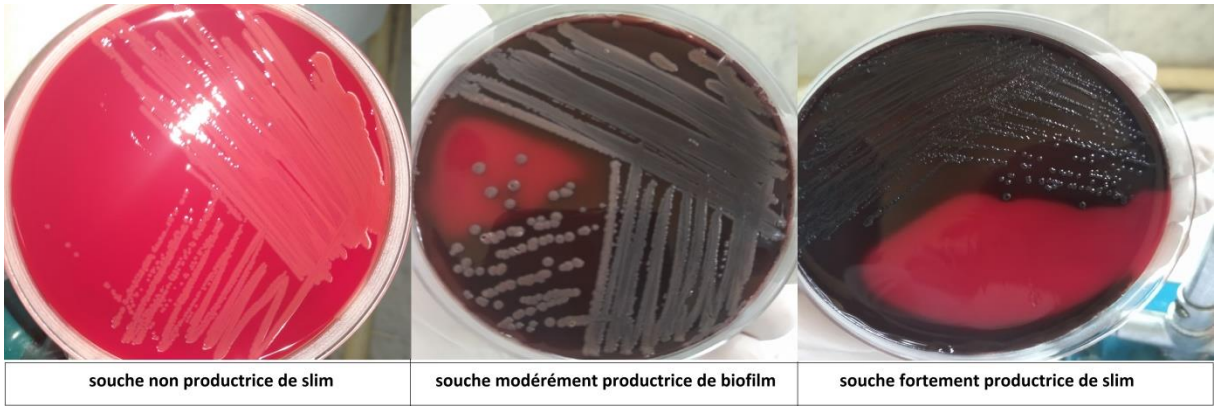
	ß- lactamines	Aminosides	macrolides lincosamides	glycopeptides	tétracyclines	rifamycines
staphylococcus auréus	100	25	100	58,3	50	50
staphylococcus spp	100	50	87,5	25	75	75
toutes les souches	100	37,5	93,75	41,65	62,5	62,5

Figure 29 : Taux de résistance (%) des souches de *Staphylococcus* isolées aux différentes familles d'antibiotiques testés.

3. Détermination de la formation de biofilm :

3.1 La méthode de culture sur gélose rouge Congo :

La caractérisation phénotypique de biofilm par la production de slim a été réalisée par culture des souches isolées sur le milieu RCA (gélose rouge Congo). La figure 29 illustre les résultats de la production de slim après incubation de 24H.



souche non productrice de slim	souche modérément productrice de biofilm	souche fortement productrice de slim

Figure 30 : Aspect macroscopique des colonies sur le milieu RCA (gélose rouge Congo).

- **Répartition des isolats en fonction de la formation de slim :**

Les résultats ont révélées la présence de colonies rouges formés qui sont donc non productrices de slim avec un taux de 37.5% suivi par 25% pour les isolats qui se manifestent par la formation des colonies noir et qui sont productrices de slim et les isolats qui apparaissent en gris sont modérément productrices de slim avec un taux de 37.5%.

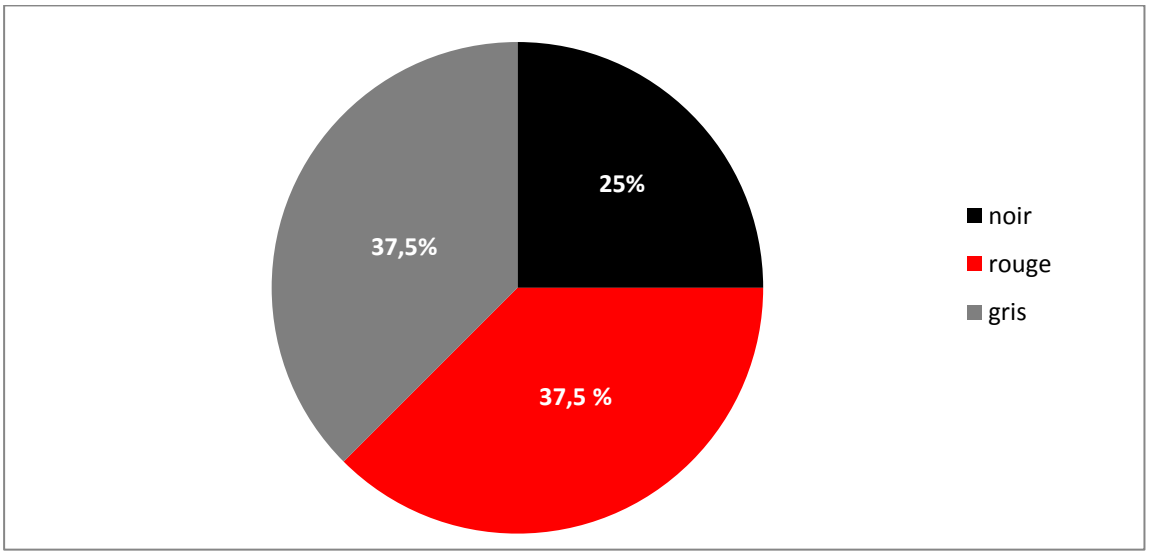


Figure 31 : Fréquence des différents aspects macroscopiques des souches testées à la formation de slim.

3.2 Formation de biofilm par la méthode de Crystal violet (en tubes) :

La détermination quantitative de la formation de biofilm chez toutes nos souches a été réalisée dans des conditions de croissance standard, en utilisant le milieu de croissance BHI (Bouillon Cœur Cervelle) non additionné de supplément.

Le pouvoir d'adhérence des souches testées ont été classées en quatre catégories, non ou faiblement adhérentes (DO 595 <0.2), modérément adhérentes (0.2 <DO 595 <0.4), fortement adhérentes (0.6 <DO 595 <1) et très fortement adhérentes (DO 595> 1) **(Russo *et al*., 2018)**.

Après incubation de 48H à 37°C, toutes les souches ont montré un résultat positif sur leurs capacités de formation de biofilm dont la souche 31 qui très formatrice de biofilm (très fortement adhérentes) avec une absorbance de (1.00), les souches 2,12,19,22,25,27,31 ont été

classés comme productrices de biofilm élevés (fortement adhérentes) avec une absorbance de (0,63 ;0,97 ;0,63 ;074 ;065 ;097 ;082) respectivement, les souches 1,3,5,9,10,21,23,28 ont considérées comme des productrices de biofilm modérées et la souche 18 a été faiblement productrice de biofilm avec une absorbance de 0 ,19. Les résultats obtenus sont statistiquement significatifs (p> 0.05).

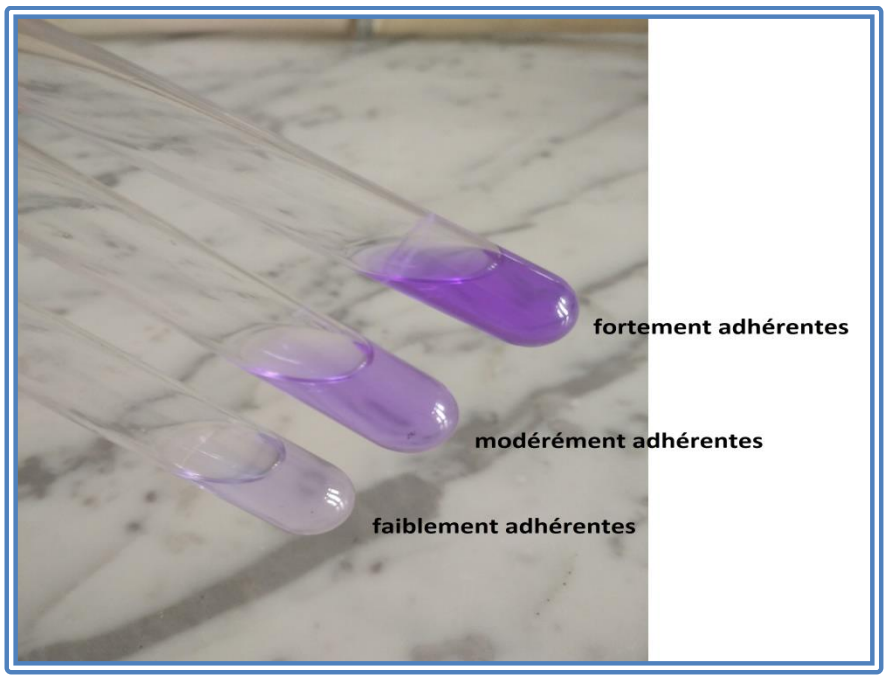


Figure 32 : La formation de biofilm par la méthode de Crystal violet (en tubes).

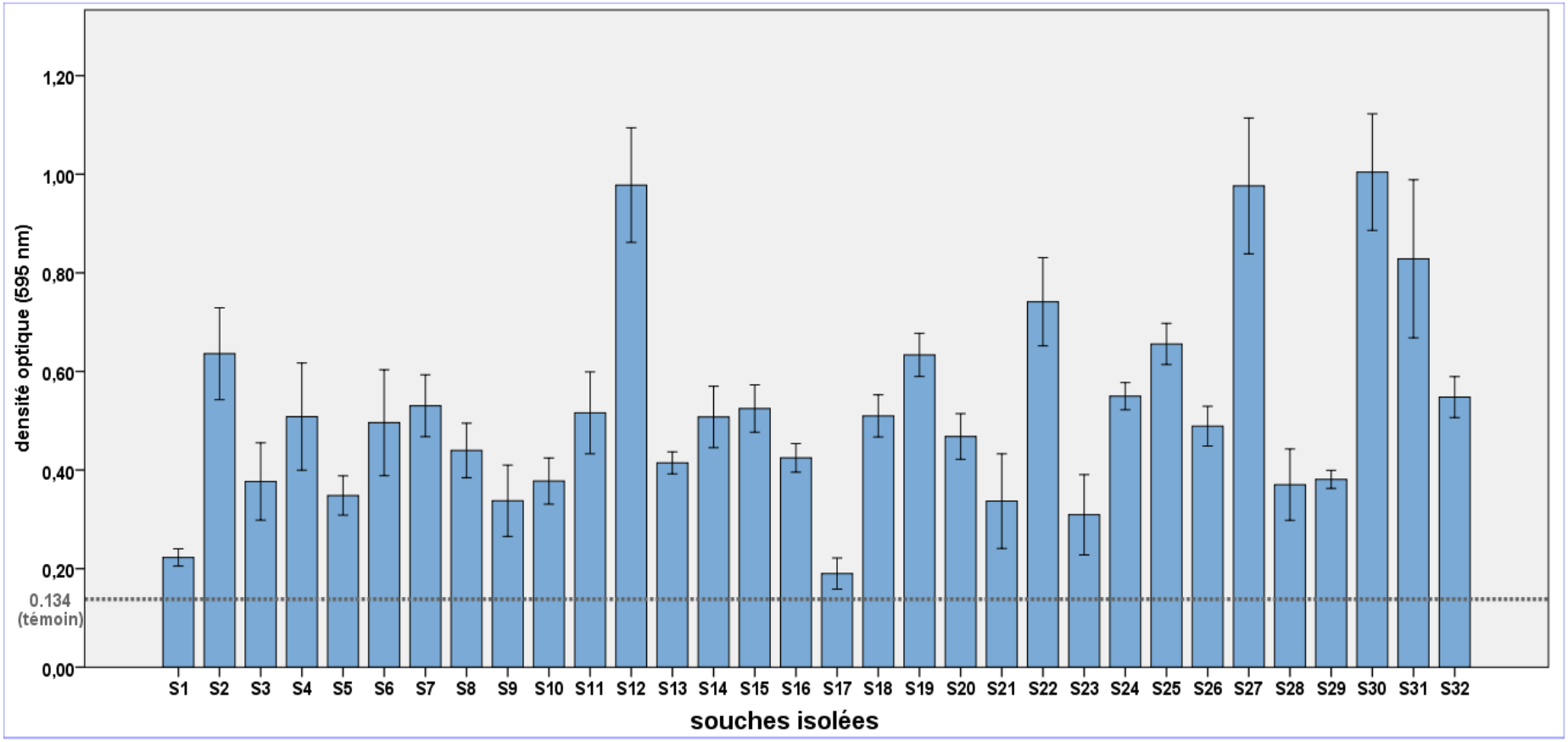


Figure 33 : Evaluation de la formation de biofilm par La méthode de Crystal violet (en tubes)

de toutes les souches étudiées.

Les valeurs représentent les moyennes ±erreurs standard pour trois répétitions.

(**S1** à **S19** : *Entérobactéries* ; **S20** à **S29** : *Staphylococcus* ; **S30** à **S32** :*Pseudomonas Aerogenosa*) (En tubes).

4. Optimisation de la formation de biofilm par la Technique de plaque de Culture de Tissu (TCP) :

La technique de microplaque 96 puits permet non seulement une évaluation quantitative de la formation de biofilm mais aussi une évaluation qualitative.

Pour évaluer l'impact des conditions environnementales sur la formation de biofilm pour les isolats, nous avons détecté la formation de biofilm chez les 7 souches que nous avons sélectionnées en utilisant le milieu BHI (Bouillon Cœur Cervelle) additionné de glucose et de saccharose à différentes concentrations. D'autre part dans des milieux avec des pH modifiés (pH=2, pH=4, pH=6.2 et pH=8), la température d'incubation est de 37°C pendant 48H. Les valeurs des résultats pour les trois répétitions sont montrées dans l'annexe V.

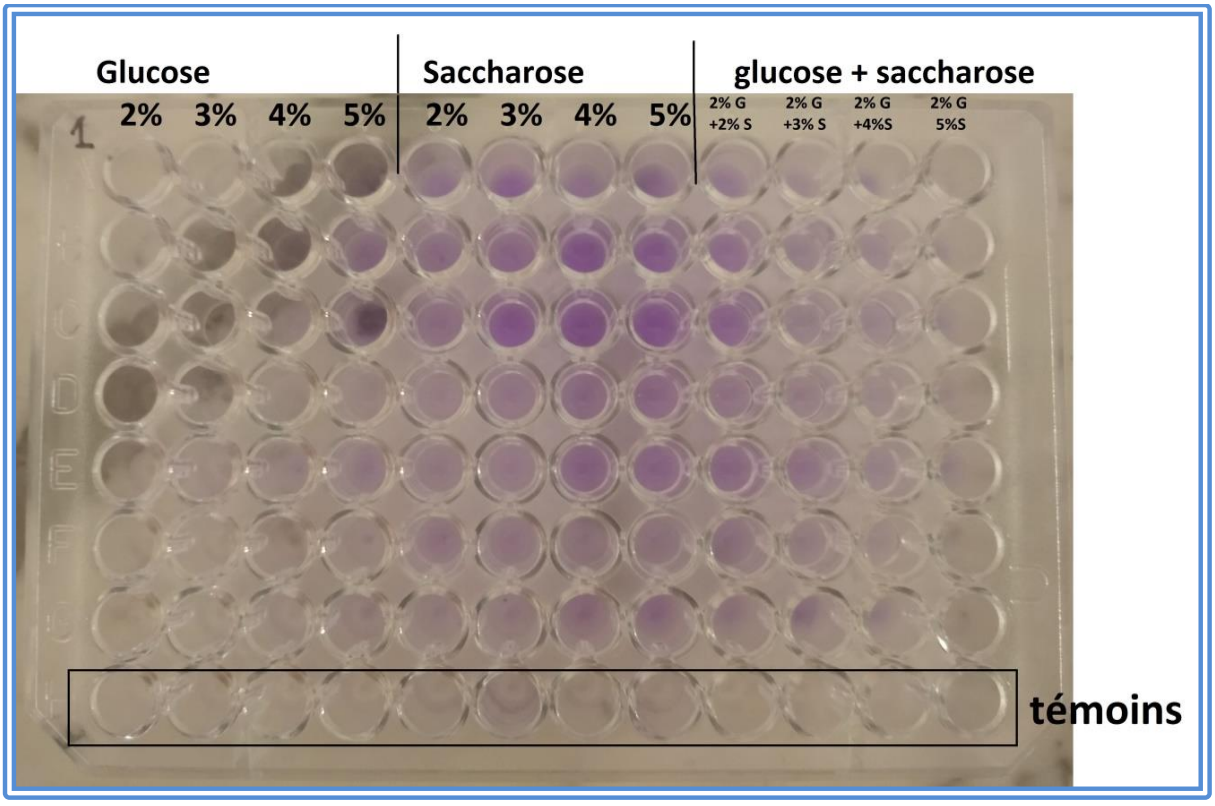


Figure 34 : Résultats montrant l'aspect des microplaques en présence de différentes concentrations des sucres supplémentées.

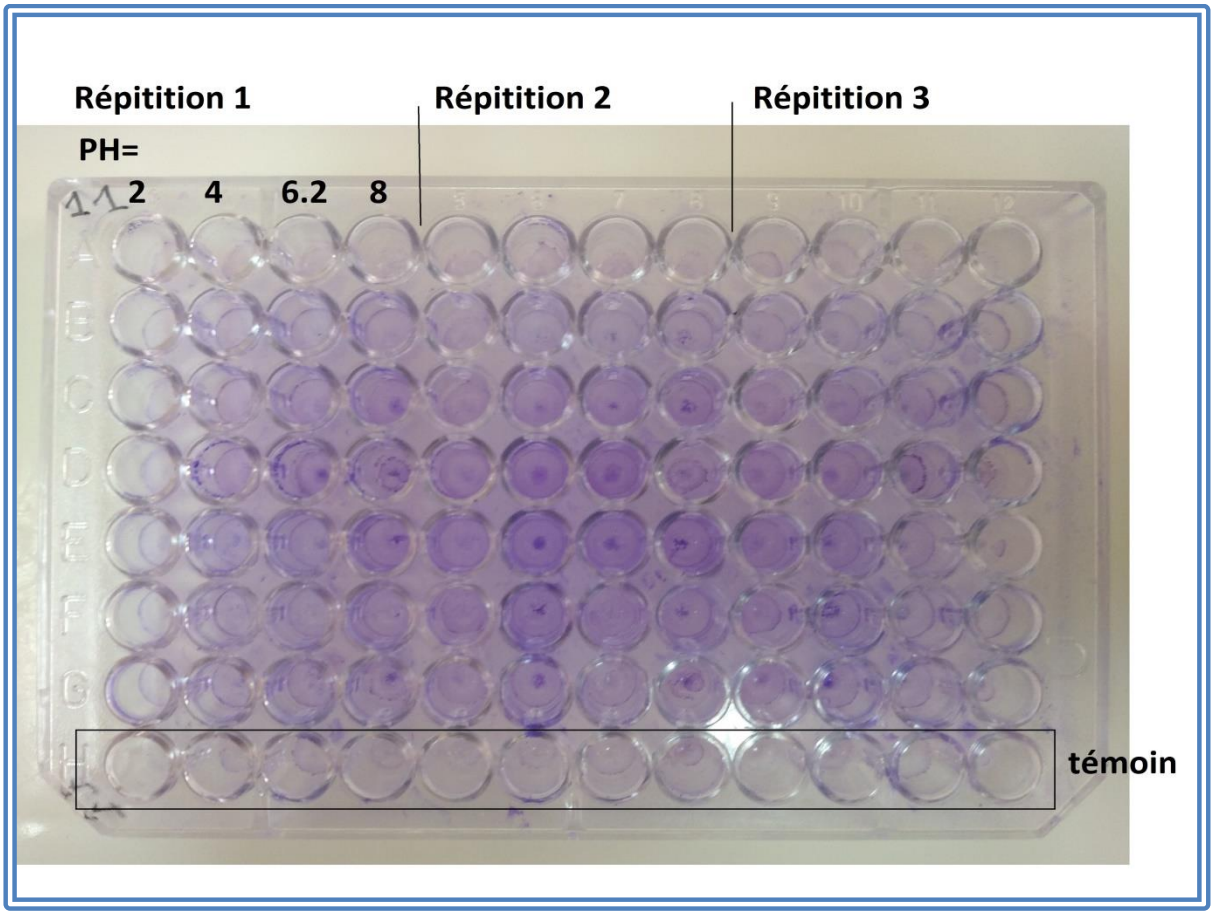


Figure 35 : Résultats montrant l'aspect des microplaques dont le pH de milieu est modifié.

- **Optimisation de la formation de biofilm en fonction des sucres supplément**és

Les résultats montrent que l'ajout de saccharose en général contribue à la formation de biofilm mieux que l'ajout de glucose seul ou du glucose + saccharose. En termes de comparaison de chaque sucre, les résultats montrent que pour le glucose, plus la concentration de glucose, plus la formation de biofilm est élevé .Quant au saccharose, le résultat était après l'ajout de 3% ou 4% est légèrement meilleur par rapport à l'ajout de 2 ou 5% de saccharose dans le milieu BHI, et enfin en ce qui concerne l'ajout de glucose et de saccharose ensemble, les résultats étaient légèrement différents, dont l'ajout de 2% de glucose et de 2 % de saccharose représentait le résultat le plus élevé. Ces résultats sont statistiquement significatifs ($p > 0.05$).

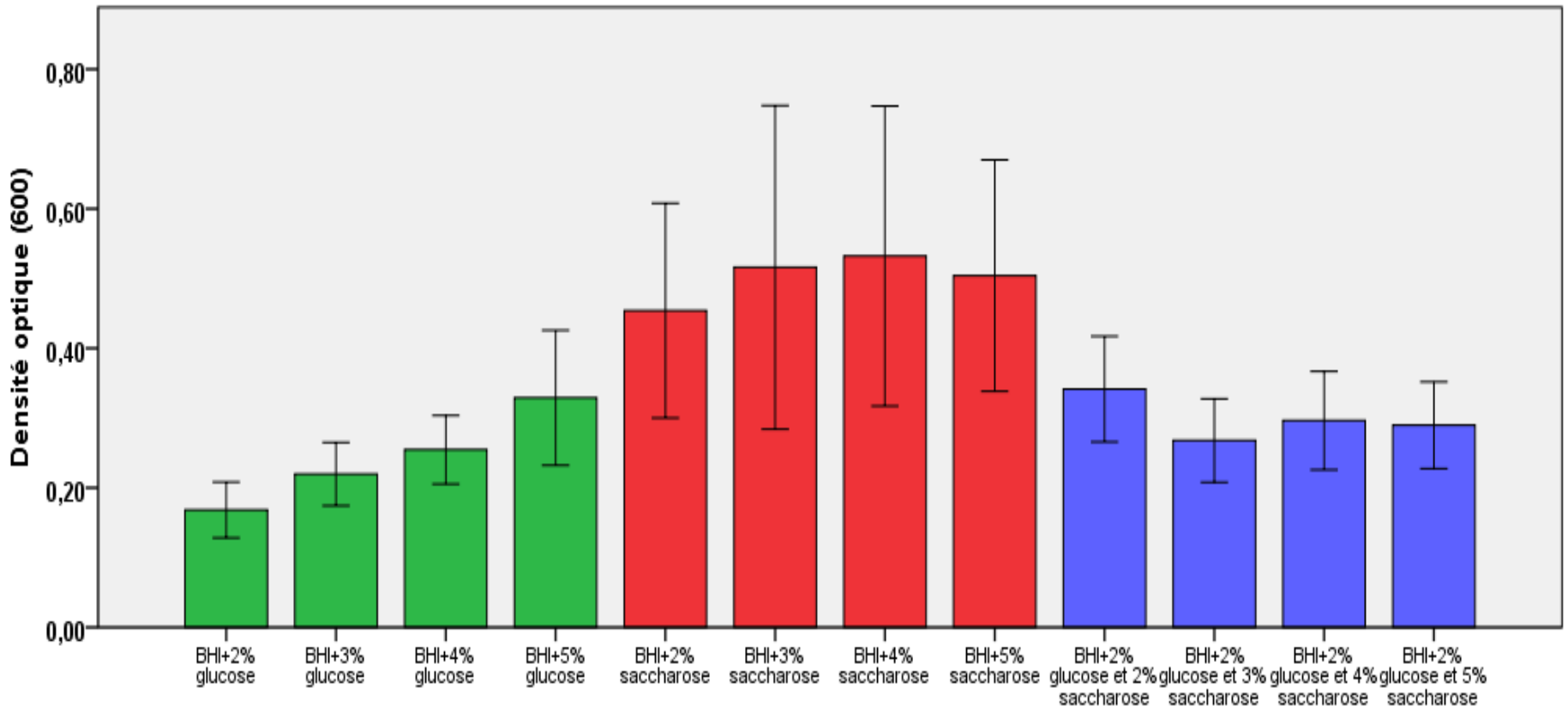


Figure 36 : Effet de glucose et saccharose additionné dans le milieu BHI sur la formation des biofilms.

Les valeurs représentent la moyenne des 7 souches étudiées ± l'écart-type.

- **Optimisation de la formation de biofilm en fonction de PH de milieu modifié**

Les résultats ont montré que dans le milieu avec pH=8, le pouvoir de formation de biofilm pour les souches testées est généralement meilleur par rapport aux autres, et le milieu avec un pH de 2 montre la plus faible formation de biofilm par les 7 souches étudiées en générale. Les résultats sont statistiquement significatifs (p> 0.05).

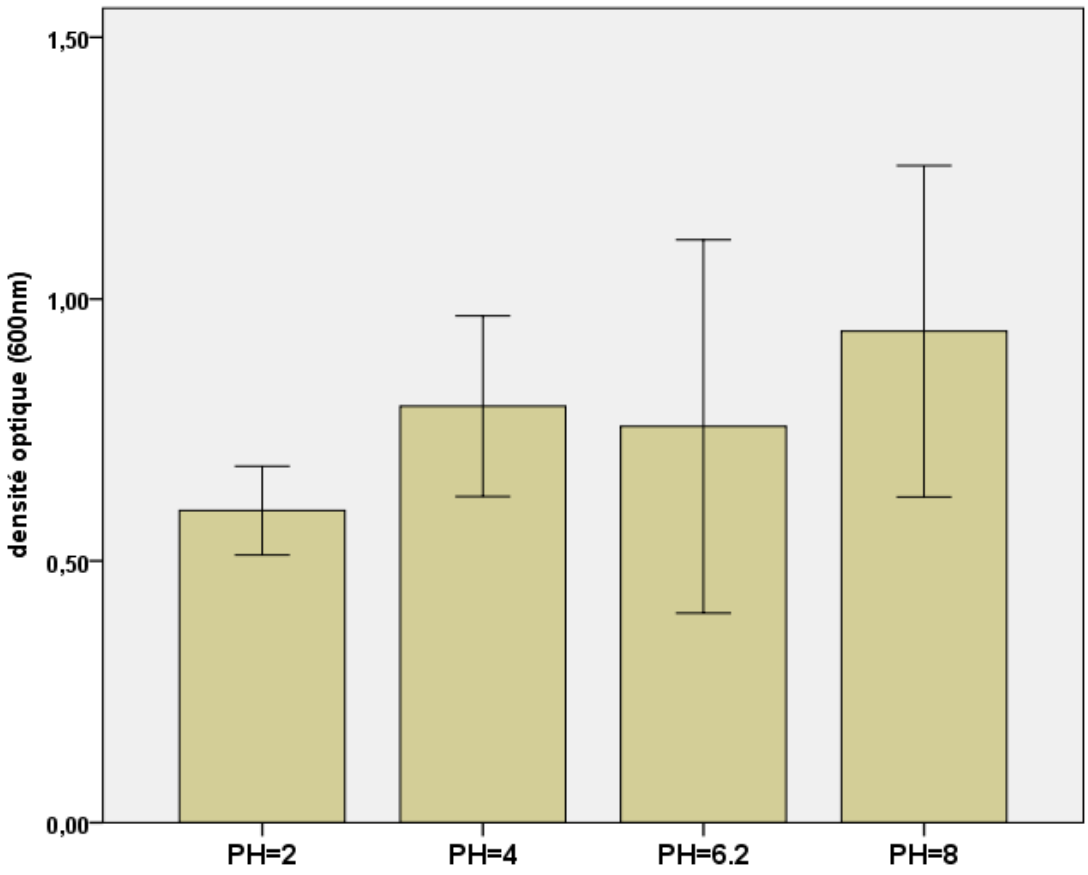


Figure 37 : Effet de pH de milieu sur la formation de biofilm dans le BHI.

Les valeurs représentent la moyenne des 7 souches étudiées ± l'écart-type.

- **Optimisation de la formation de biofilm en fonction de température de milieu**

On ce qui concerne l'effet de la température sur la formation de biofilm par rapport aux 7 souches testées, on a constaté que les températures de 30C° et 25°C contribue mieux que la

température de 37°C avec prédominance de 30°C. Les résultats sont exprimés dans la figure . Les résultats sont statistiquement significatifs (p> 0.05).

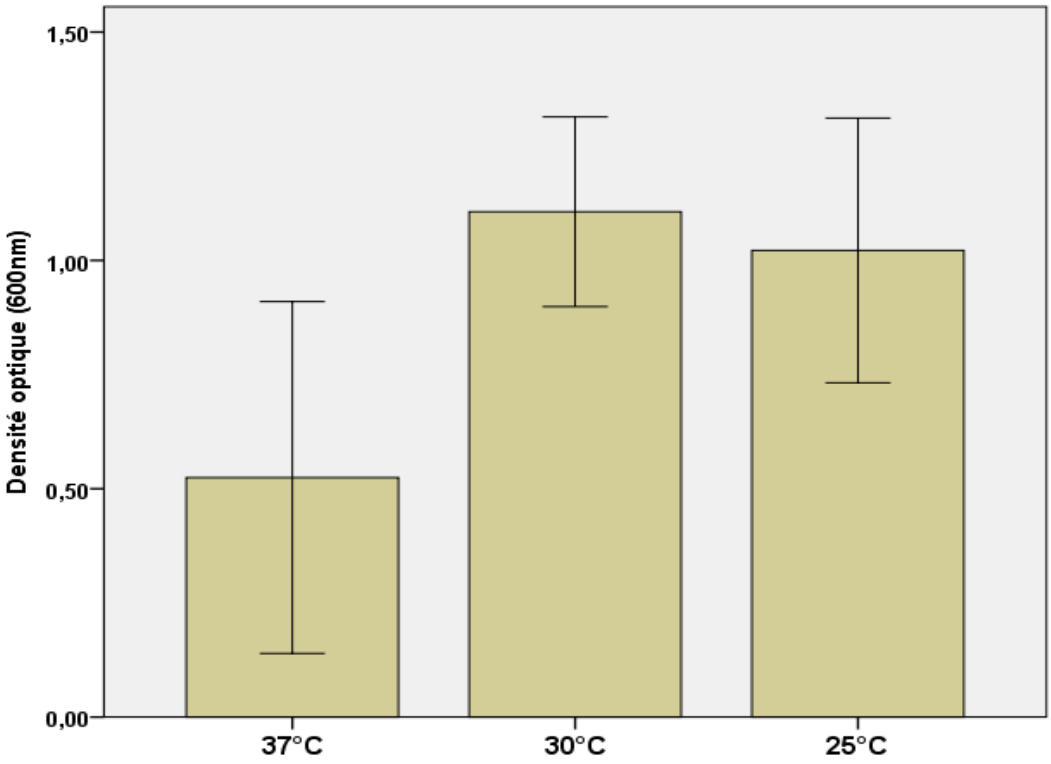


Figure 38: L'effet des températures (37°C, 30°C et 25°C) sur la formation de biofilm dans le milieu BHI

Les valeurs représentent la moyenne des 7 souches étudiées ± l'écart-type

Notre résultat a montré que 70% des prélèvements de l'environnement hospitalier sont positifs dont les lits et sanitaires présentent le taux le plus élevée et que 32 souches sont été isolées à partir de l'environnement hospitalier. Ce résultat explique que le milieu hospitalier constitue une niche importante pour les bactéries multirésistants qui peuvent être un Réservoirs à partir desquels différentes infections peuvent se développe **(Zenati, K et al., 2016).** Ceci peut être liée à un déficit de l'hygiène hospitalière par une insuffisance au niveau de l'entretien du matériel et équipement ou une faute d'asepsie pré, per et/ou post opératoire ; la défaillance du lavage des mains constitue un problème universel **(Madi, S et Djema, K., 2019)**.

Nos résultats d'identification ont montré une prédominance des entérobactéries suivie par les staphylocoques et *Pseudomonas*. Ce résultat est le même qui est rapporté par **(Hadjer, K et Aicha, Z., 2014)** ont montrés aussi une prédominance des entérobactéries suivie par les staphylocoques.

Dans les prélèvements de l'environnement hospitalier, *S. aureus* est l'espèce la plus isolée avec une prévalence de 19% suivi des *enterobacter* et *proteus* avec une prévalence de 16%, Même résultats rapportés par plusieurs études en Algérie **(Madi, S et Djema, K., 2019 ; Lamine, M M et al., 2017).**

Selon notre étude, le taux le plus élevé des souches résistances a été observé dans le service CHH et MIF similaire à celle de (**Madi, S et Djema, K., 2019)**

D'après **(Chouki, A et al., 2004)**. La résistance aux antibiotiques de la famille des B-Lactamines, surtout les pénicillines est modérée avec un taux de 63,63%, ce résultat est proche de nos valeurs trouvées par rapport aux entérobactéries (66.73) mais concernant les staphylocoques tel que *S. aureus*, la résistance est de 100% pour les antibiotiques de la famille de β-lactamine : Pénicilline G (100%) et oxacilline (100%).

Cette résistance pourrait s'expliquer par la sécrétion d'une enzyme appelé la pénicillinase (β-lactamase), il s'agit d'une enzyme qui agit sur les β-lactamines par l'ouverture du cycle de β-lactame au niveau de la liaison amide, selon une réaction d'hydrolyse suite à l'activation d'une molécule d'eau (**Barika et Boussaidi., 2019).**

La résistance des aminosides a été très faible chez les entérobactéries et chez les staphylocoques avec des taux de résistances de (7.76) et (37.5) respectivement, similaire à celle de **(Madi, S et Djema, K., 2019)**.

La résistance de *S. aureus* aux aminosides peut être assurée par 2 mécanismes. le premier consiste en mutation au niveau des gènes codant pour des protéines ribosomales, le seconde mécanisme résulte des mutations touchant la perméabilité de l'antibiotique et le troisième est assuré par la production d'enzymes inactivent l'antibiotique **(Minardi et Quincampoix ., 2001).**

Pour les 3 souches de *P. aerugenosa*, Nous avons observé une résistance très faible 27.66 par rapport aux taux de résistance rapporté en Algérie, 38% au CHU d'Oran **(Sefraoui,. 2015)** et 66,66% à L'hôpital de Lakhdaria. Bouira (**Madi, S et Djema, K., 2019).**

Cette large propagation des entérobactéries, *S. aureus* de et de *P. aeruginosa* dans les milieux hospitaliers s'accompagne d'une augmentation de la résistance aux antibiotiques. Ce qui fait la gravité des infections nosocomiale et déclare l'état d'alarme dans les hôpitaux. La pression de sélection liée à l'utilisation d'antibiotiques à large spectre et l'existance même dans l'environnement hospitalier d'un support génétique, sont des facteurs importants dans l'évolution de la résistance aux antibiotiques **(Madi, S et Djema, K., 2019)**.

Des études ont démontré que la méthode de Rouge Congo a une faible précision, mais elle est peu coûteuse et facile à réaliser et le critère d'évaluation est basé sur une analyse visuelle de la couleur des colonies qui poussent sur la gélose, de couleurs rouges pour les souches non formatrices de biofilm et noir pour les souches formatrices de biofilm. Deka (2014), a comparé la formation de biofilm par deux techniques, dans la méthode en tube il y a eu 83% de souches formatrices de biofilm contre seulement 20% par la technique de Rouge Congo **(BENSLIMANE, S., 2021)**

Les biofilms représentent 90% du mode de vie bactérien dans la nature et colonisent l'environnement hospitalier, sur des surfaces inertes, dans le réseau d'eau et sur les dispositifs médicaux. Leur présence permet à des germes, parfois pathogènes, de résider durant de très longues périodes, allant jusqu'à plusieurs mois, sur des surfaces, formant ainsi des réservoirs **(Vanzieleghem, T., 2020)**, et cela prouver les résultats que nous avons obtenus, dont tous les souches isolées sont formatrices de biofilm à des capacités divers.

Notre résultat a montré qu'il est bien clair que la formation de biofilm est influencée par l'exposition aux glucides alimentaires. Parmi lesquels, le saccharose. Le saccharose sert également pour la synthèse de polysaccharides dans les biofilms, en particulier les polysaccharides extracellulaires (EPS). Le saccharose est une source de carbone importante pour la biosynthèse de ce type de polymère **(Benslimane., 2021 ; Aliane., 2018).**

D'après les études de **(Hoštacká, A et Čižnár., 2010)** qui ont conclu que L'augmentation du pH entraîne une production de biofilm plus élevée là où les résultats de leur étude sur des différents espèces bactériennes (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* et *V. cholerae* non-O1 et O1) ont montré que la formation de biofilm est important à un pH de 8.5, suivi d'un pH de 7.5 et enfin d'un pH de 5.5 avec un pourcentage plus faible. Ces résultats sont similaires aux résultats que nous avons obtenus, car nous avons constaté que dans le BHI avec un pH de 8 entraine une forte formation de biofilm, et le résultat le plus faible a été marqué à un pH de 2.

(Hoštacká, A et Čižnár., 2010) a montré une diminution de la production de biofilm à 37 °C dans les huit souches testées (*P. aeruginosa* trois souches, *K pneumoniae* deux, *V. cholerae* non-O1 deux et *V. cholerae* O1 une souche) par rapport à la production à 30 °. Ce résultat est similaire de nos résultats trouvés.

Conclusion

Conclusion :

Notre étude est basée sur des prélèvements de de l'environnement hospitalier. Au total, 32 souches ont été isolées et identifiées dont la prédominance des bacilles à Gram négatif 67% et pour les cocci à gram positifs 31% avec une prédominance des souches de *staphylococcus aureus* 19%.

Nous avons également déterminé la sensibilité des souches bactériennes isolées vis-à-vis aux différentes familles d'antibiotiques, dont la moitié des souches sont résistantes 50%. (16/32)

L'étude de la formation de biofilm a été réalisée par deux méthodes, la méthode de Crystal violet en tubes et la RCA montre que la majorité des souches isolées étaient fortement productrices de biofilm et de slime. La présence de biofilm permet à des germes, parfois pathogènes, de résider durant de très longues périodes, allant jusqu'à plusieurs mois, sur des surfaces, formant ainsi des réservoirs. Ces derniers constituent des environnements favorables pour le transfert de gènes notamment de résistance aux antibiotiques.

La teneur en sucres surtout le saccharose qui est également utilisé dans la synthèse des EPS dans les biofilms, la température de 30°C et les pH basiques (pH 8) sont les conditions optimums de la formation de biofilm.

Bien que les surfaces contaminées par le biofilm qui peut résister aux divers agents antimicrobiens et qui peut constituer des environnements favorables pour le transfert de gènes notamment de résistance aux antibiotiques puissent servir de réservoirs pour les microorganismes potentiellement pathogènes et difficiles à éradiquer, le nettoyage et la désinfection des surfaces de l'environnement sont indispensables pour la réduction de l'incidence des infections nosocomiales.

Cependant la recherche mérite d'être poursuivre de refaire des prélèvements à partir des même sites précédentes pour une réidentification afin d'évaluer les mesures d'hygiène maitre en place pour éliminer ces germes.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Albrecht, A. (2015). Les infections nosocomiales d'origine bactérienne, ce que doit savoir le pharmacien d'officine (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).

Aliane, SAMIA. (2018). Contribution à l'étude de la formation de biofilm par des souches industrielles de Streptococcus thermophilus. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem

Amazian, K., Rossello, J., Castella, A., Sekkat, S., Terzaki, S., Dhidah, L., ... & Fabry, J. (2010). Prevalence of nosocomial infections in 27 hospitals in the Mediterranean region. EMHJ-Eastern Mediterranean Health Journal, 16 (10), 1070-1078, 2010.

Amiel, C. (2005). «On sait qu'il n'y a pas de" vrais" risques». Discours et pratiques de soignants autour des infections nosocomiales. Sciences sociales et santé, 23(3), 37-58.

ANDRE J, KATSANIS G, BOIRIER. J; CTALA M. (2007-2008).Histologie : organes, Université Bière et Marie Curie : 11,15.

Barika Nour El Houda, Boussaidi Djamila. (2019). Etude de la résistance aux antibiotiques des bactéries isolées à partir des plaies chirurgicales infectées. Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du Diplôme de master.

BEBOUR HIBA, G. T., & HANADI, G. (2021). Capacité de formation de biofilm sur des surfaces en cuivre chez Klebsiella oxytoca.

BENFREHA-TEMMOURI, Hamida. « Etude epidémiologique des bactéries responsables des infections nosocomiales et mise en place d'un plan de prévention et de lutte (Hôpital de Mascara). » **(2014).**

BENSLIMANE Sabria. (2021).Contribution à l'étude de l'effet des extraits bruts des écorces du fruit de Punica granatum et des graines de Cuminum cyminum contre les biofilms à l'origine des infections bucco-dentaires.THÉSE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT 3ème cycle LMD

Benslimane, S., Rebai, O., Djibaoui, R., & Arabi, A. (2020). Pomegranate Peel Extract Activities as Antioxidant and Antibiofilm against Bacteria Isolated from Caries and Supragingival Plaque. Jordan Journal of Biological Sciences, 13(3).

Berthelot, P., Grattard, F., Mallaval, F. O., Ros, A., Lucht, F., & Pozzetto, B. (2005). Épidémiologie des infections nosocomiales à Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia cepacia et Stenotrophomonas maltophilia. Pathologie Biologie, 53(6), 341-348

Buttiaux, R., & Lesne, L. (1947). L'analyse bactériologique des laits concentrés sucrés. présence de staphylocoques pathogènes dans certains d'entre eux. Le Lait, 27(263-264), 121-131.

C., Jarno, P., & Chaperon, J. (2010). Approche socio-historique de la lutte contre les infections nosocomiales en France. Santé Publique, 22(4), 367-378.

Carlet, Jean. « Les infections liées aux soins médicaux. » Actual Dos Santé Publique 38 (**2002**) : 23-70.

Carlette, Jean. "Medical Care-Associated Infections." Actual Dos Public Health 38 **(2002):** 23-70.

chalfine, Annie, and Jean Carlet. "Que sont les infections liées aux soins?." Actualité et dossier en santé publique 38 (2002): 24-35I.

Chavant, P., Gaillard-Martinie, B., Talon, R., Hébraud, M., & Bernardi, T. (2007). A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. Journal of microbiological methods, 68(3), 605-612.

Chouki, A., Sadki, M., Samar, M., & Segueni, N. E. (2004). Contribution à l'étude des infections Nosocomiales à Staphylococcus aureus et Entérobactéries (Doctoral dissertation, Université de Jijel).

Ducel, G., Fabry, J., & Nicolle, L. (2002). Prevention of hospital acquired infections: a practical guide. , (Ed. 2).

Ellenberg, E. (2005). L'infection nosocomiale: relire l'histoire et penser au présent. Santé publique, 17(3), 471-474.

FAYE-KETTÉ, H., & DOSSO, H. (2010). Surveillance microbiologique des surfaces au niveau d'un établissement hospitalier de niveau tertiaire: exemple du chu de Yopougon, Abidjan, Cote d'ivoire. J. sci, 11(1-2010), 73-81.

Freeman, D. J., Falkiner, F. R., & Keane, C. T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. Journal of clinical pathology, 42(8), 872-874.

Hadjer, K., & Aicha, Z. (2014). Isolement des bactéries responsables de l'infection nosocomiale à partir un milieu hospitalier.

Hamza, R. (2010). EPIDEMIOLOGIE DES INFECTIONS ASSOCIEES AUX SOINS HEALTHCARE ASSOCIATED INFECTIONS EPIDEMIOLOGY. Revue Tunisienne d'Infectiologie-Janvier, 4, 1-4.

Hoštacká, A., Čižnár, I., & Štefkovičová, M. (2010). Temperature and pH affect the production of bacterial biofilm. Folia microbiologica, 55(1), 75-78.

Keck, Nicolas, and Fabrice Bernard. "Prévention des infections nosocomiales chez les animaux de compagnie par la biosécurité dans les établissements de soins vétérinaires." Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France 170.2 **(2017**): 104-111.

Keck, Nicolas, and Fabrice Bernard. « Prévention des infections nosocomiales chez les animaux de compagnie par la biosécurité dans les établissements de soins vétérinaires. » Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France 170.2 **(2017)** : 104-111.

Kissira, I. (2014). Infections nosocomiales: évaluation de risques dans les services de la Néonatologie, la CUGO et de la Pédiatrie du CNHU de Cotonou. *Rapport de fin de formation pour l'obtention de la Licence Professionnelle. Département de Génie de Biologie Humaine, Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi, 54p*.

Lamine, M M., Youcef, K.,& Keita, D. (2017). Isolement et identification des bactéries responsables des infections nosocomiales au niveau de service des urgences de l'hôpital El Hakim Okbi.

Langlois, B. E., Harmon, R. J., & Akers, K. (1983). Identification of Staphylococcus species of bovine origin with the API Staph-Ident system. Journal of clinical microbiology, 18(5), 1212-1219.

Laurent, F.(2011). Biofilm bacterien. Université de Médecine de Lyon. **Le Rat, C., Quélier,**

Lé, Virginie. Influence du cuivre sur les biomasses microbiennes dans les canalisations d'eau. Diss. Thèse a l'unité de formation et de recherche «faculté de pharmacie de chatenay malabry» de l'université parissud 1. P 80**, 2008.**

Lebeaux, David, and Jean-Marc Ghigo. « Infections associées aux biofilms-Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale ?. » médecine/sciences 28.8-9 **(2012)** : 727-739.

Madi, S., & Djema, K. (2019). Isolement et Caractérisation des Bactéries Multirésistantes Impliquées Dans les Infections Nosocomiales et L'environnement Hospitalier au Niveau de L'hôpital de Lakhdaria. Bouira, Algeria: Université Akli Mohand Oulhadj Bouira.

Madi, S., and K. Djema. "Isolement et Caractérisation des Bactéries Multirésistantes Impliquées Dans les Infections Nosocomiales et L'environnement Hospitalier au Niveau de L'hôpital de Lakhdaria." *Bouira, Algeria: Université Akli Mohand Oulhadj Bouira* **(2019).**

Madi, S., and K. Djema. « Isolement et Caractérisation des Bactéries Multirésistantes Impliquées Dans les Infections Nosocomiales et L'environnement Hospitalier au Niveau de L'hôpital de Lakhdaria. » Bouira, Algeria : Université Akli Mohand Oulhadj Bouira **(2019).**

Maiga, B. "Pratiques d'hygiène hospitalière dans les structures sanitaires: Hôpital Gabriel Touré, Hôpital Régional de Sikasso, CNOS, Centre de Santé Référence de la Commune IV de Bamako." Bamako: Faculté de Médecine de Pharmacie et D'Odontostomatologie Université de Bamako **(2003).**

Medeiros, A. C. D. A. P. (2016). Etude expérimentale de la formation des biofilms sous conditions hydrodynamiques contrôlées (Doctoral dissertation, Université Grenoble Alpes).

Menidjel, Nadia. "Les infections nosocomiales à bactéries multi-résistantes." **(2017).**

Menidjel, Nadia. « Les infections nosocomiales à bactéries multi-résistantes. » (2017).

Monnet, T. (2011). Les infections nosocomialesl'importance d'un suivi épidémiologique et : de l'identification rapide des bactéries en cause : exemple de quelques techniques de diagnostic permettant cette identification précoce.

POUR, M. D. F. D. E. (2017). EVALUATION DE LA FORMATION DU BIOFILM SOUS DIFFERENTES CONDITIONS DE CULTURE (MILIEU DE CROISSANCE, ACIDITE ET TEMPERATURE) CHEZ : Staphylococcus aureus Escherichia coli.

Pozzetto, B. "Micro-organismes responsables d'infections nosocomiales." Fiches conseils pour la prévention du risque infectieux**. 2009.**

Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D., WILEY, J., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2010). Microbiologie 3 e edition. Groupe de Boeck sa Bruxelles.

Quincampoix, J. C., & Mainardi, J. L. (2001). Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. Réanimation, 10(3), 267-275.

Quincampoix, J. C., & Mainardi, J. L. (2001). Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. Réanimation, 10(3), 267-275.

Rambaud, C. (2008). Les décisions ont une histoire: les infections nosocomiales. Santé publique, 20(4), 353-356.

Roux, Agnès, and Jean-Marc Ghigo. « Les biofilms bactériens. » Bulletin de l'Académie vétérinaire de France 159.3 **(2006**) : 261-268.

Russo, P., Hadjilouka, A., Beneduce, L., Capozzi, V., Paramithiotis, S., Drosinos, E. H., & Spano, G. (2018). Effect of different conditions on Listeria monocytogenes biofilm formation and removal. Czech Journal of Food Sciences, 36(3), 208-214.

SABRINA, BOUAZIZ, and AMEL RAMDANE. "Controlee de l'état général d'hygiène Au niveau de service des urgences de."

SEFRAOUI, I. (2015). Etude de la résistance aux antibiotiques de Pseudomonas aeruginosa au niveau de différents hôpitaux de l'ouest algérien (Doctoral dissertation, Université de Tlemcen-Abou Bekr Belkaid).

Seydina M. Diene Relecteurs 2016 AEMIP.:. Détermination de la sensibilité et de la résistance des bactéries aux agents. Antimicrobiens**.**

Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal of microbiological methods, 40(2), 175-179.

TARZI, M., & ZITOUNI, S. (2018). Validation du bionettoyage audit des pratiques, actions correctives actions préventives (CAPA) CHU TIZI-OUZOU.

Thiolet, J. M., Lacavé, L., Jarno, P., Metzger, M. H., Tronel, H., Gautier, C., ... & Coignard, B. (2007). Prévalence des infections nosocomiales, France, 2006. Bull épidemiol hebd, 51(52), 429-432.

Vanzieleghem, T., & Delmée, M. (2020). Les biofilm en milieu hospitalier: quels sont les enjeux pour l'hygiène hospitalière.

Vanzieleghem, T., & Delmée, M. (2020). Les biofilm en milieu hospitalier: quels sont les enjeux pour l'hygiène hospitalière.

Yannick D.N., Skander T., Mario Jacques H. (2014). Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. Can. J. Veterinary. Res. 78:110-116.

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

ZEROUAL, Z. (2012). Profil épidémiologique et bactériologique des infections nosocomiales (À propos d'une Enquête de prévalence des infections nosocomiales du CHU Ibn Sina de Rabat Janvier-**2010)** (Doctoral dissertation)**.**

Ziebuhr, W., Loessner, I., Krimmer, V., & Hacker, J. (2001). [18] Methods to detect and analyze phenotypic variation in biofilm-forming staphylococci. In Methods in Enzymology (Vol. 336, pp. 195-IN7). Academic Press.

(CASFM) Recommandations 2021 V.1.0 Avril. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

Comité sur les infections nosocomiales du Québec (CINQ). (2018, September 13). Notions de base en prébention et contrôle des infections – INSPQ. Retrieved from

CCLIN Sud-est. (2016).

OMS : Prévention des infections nosocomiales 2e édition.

Annexes

ANNEXE I : Composition des milieux de culture.

Solution	**Composition**
Urée-indole	• Tryptophan ……..3 g/L • Urée ……. 20 g/l • KH2PO4 …… 1 g/l • K2HPO4 ……... 1 g/l • Na Cl ……. 5 g/l • Alcool à 95°……..... 10 mL • Rouge de phénol ……... 2,5 mL
Violet de Gentiane	• Violet de Gentiane …… 10 g • Phénol …….. 20 g • Éthanol (90 °GL) …….. 100 ml • Eau distillée …… 1 L

Lugol	• Iodure de potassium …….. 2 g • Iode métalloïde I2 …… 1 g • Eau (q.s. ad) …….. 100 g q.s. ad 100 g signifie "quantité suffisante pour obtenir 100 g de solution"
Fuchsine	• Fuchsine basique ……. 10 g • Phénol …….. 50 g • Éthanol ……. 100 mL • Eau distillée …… 1 L

Milieux de culture solides	Composition
TSI	• Peptones de caséine …… 15 g/l • Peptones de viande …….. 5 g/l • Extraits de viande ……. 3 g/l • Peptones de levure …….. 3 g/l

	• NaCl …… 5 g/l • Lactose …… 10 g/l • Saccharose …….. 10 g/l • Glucose ……..... 1 g/l • Citrate ammoniacal de Fer (III) …….. 0,5 g/l • Thiosulfate de sodium ……. 0,5 g/l • Rouge de phénol …….. 0,024 g/l • Agar ……. 12 g/l
Mueller Hinton	• fusion de viande de bœuf ……...… 300 g/l • Hydrolysat de caséine ……. 17,5 g/l • Amidon ……. 1,5 g/l • Agar ……..... 17,0 g/l • Eau distillée (qsp) ……..... 1 L

Gélose Hektoen	• Protéosepeptone ……... 12 g • Extrait de levure …… 3 g • Chlorure de sodium ……... 5 g • Thiosulfate de sodium ……. 9 g • Citrate de fer III et d'ammonium …….. 1,5 g • Salicine …….. 2 g • Lactose ……... 12 g • Saccharose ……. 12 g • Fuschine acide ……. 0,1 g • Bleu de bromothymo …….. l 0,065g • Agar ……... 14 g • Eau distillée (qsp) ……... 1000mL
Chapmen	• Peptone …… 11.0 g/l • Extrait de viande …… 1,0 g/l • Chlorure de sodium …… 75 g/l • Mannitol ……. 10,0 g/l

	• Rouge de phénol ……... 0,025 g/l • Agar ……. 15,0 g/l • PH 7,4
Gélose nutritives	• Extrait de viande …… 1,0 g/l • Extra de levure ……... 2,0 g/l • Peptone ……... 5,0 g/l • Chlorure de sodium …… 5,0 g/l • Agar ……. 15,0 g/l • PH = 7
Gélose au cétrimide	•Peptone de gélatine ……..…… 16 g/l •Peptone de caséine ……..…….. 10 g/l •Bromure de tétradonium (cétrimide) …….. 0.2 g/l •Acide nalidixique ……..…… 15 mg/l •Sulfate de potassium …...……...…….. 10 g/l •Chlorure de magnésium …….…….... 1.4 g/l

	•Agar ……...……..…… 10 g/l •Eau distillée …….. 1000 ml pH = 7,1
Gélose Salmonella shigella	•Peptone …….. 5,0 g •Extrait de viande ……... 5,0 g •Sels biliaires ……. 8,5 g •Vert brillant ……. 0,33 mg •Lactose ……..……. 10,0 g •Rouge neutre ……... 25 mg •Thiosulfate de sodium ……..8,5 g •Citrate ferrique ammoniacal……. 1,0 g •Citrate de sodium …….. 8,5 g •Agar …… 15,0 g •Eau distillée (qsp) …… 1 L pH = 7,3

Mac conkey	•Peptone bactériologique …….…… 20 g/l •Sels biliaires …….. 1.5 g/l •Chlorure de sodium ……. 5 g/l •Lactose ……..…10 g/l •Rouge neutre ……..…… 0.03 g/l •Cristal violet …….…. 0.001 g/l •Agar …….…….. 15 g/l •Eau distillée ……..….. 1000 ml pH = 7,1
Citrate de Simmons	• Sulfate de Mg …… 0,2 g/l • Phosphate monoammoniaqué …….. 1 g/l • Phosphate bipotassique …… 1 g/l • Citrate de sodium ……. 2 g/l • Na Cl …… 5 g/l • Bleu de bromothymol ……. 0,08 g/l • Agar …… 15 g/l

	• PH = 6 ,8
BHIB	•Protéose-peptone ……..… 10,0 g •Infusion de cervelle de veau ……. 12,5 g •Infusion de cœur de bœuf …… 5,0 g •Glucose ……2,0 g •Chlorure de sodium ……..5,0 g •Hydrogénophosphate de sodium 2,5 g pH = 7,4

ANNEXE II : Valeurs critiques des diamétre (mm) des zones d'inhibitions d'antibiotiques pour les Entetrobacteries :

Antibiotique	Abriviation	La Charge	Sensible	résistant
Amikacine	AK	30	≥ 18	< 18
Ceftriaxone	CTR	30	≥ 25	< 22
Gentamicine	HLG	120	≥ 17	< 17
Levofloxacine	LE	5	≥ 23	< 19
Tobramycine	TOB	10	≥ 16	< 16
Ticarcilline	TI	75	≥ 23	< 20
Azithromycine	AZM	15	≥ 12	< 12
Ampicillin	AMP	10	≥ 14	< 14

-Valeurs critiques des diamétre (mm) des zones d'inhibitions d'antibiotiques pour les *Staphyloccoques* :

Antibiotique	Abriviation	La charge	Sensible	résistant
Erythromycine	E	15	≥ 21	< 18
Tetracycline	TE	30	≥ 22	< 19
Rifampcine	RIF	30	≥ 26	< 23
Penicillin G	P	1	≥ 26	< 26
Gentamicine	HLG	120	≥ 18	< 18
Vancomycine	VA	30	≥ 17	< 17
Nitrofurantoïne	NIT	100	≥ 13	< 13
Tobramycine	TOB	10	≥ 18	< 18
Clindamicine	CD	2	≥ 22	< 19
Oxacilline	OX	/	≥ 15	< 15
Teicoplanine	TEC	30	≥ 15	< 15

-Valeurs critiques des diamétre (mm) des zones d'inhibitions d'antibiotiques pour les *Pseaudomenas spp :*

Antibiotique	abriviation	La charge	sensible	Résistant
Amikacine	AK	30	≥ 15	< 15
Gentamicine	HLG	120	≥ 15	< 1 5
Levofloxacine	LE	5	≥ 50	< 22
Tobramicine	TOB	10	≥ 18	< 18
Ticarcilline	TI	75	≥ 50	< 18
Aztréonam	AT	30	≥ 50	< 18

ANNEXE III : Résulats de la résistance des souches isolés aux différent types d'antibiotiques

- la résistance des souches de *Staphyloccocus spp*

E/ATB	E	TE	RIF	P	HLG	VA	NIT	TOB	CD	OX	TEC
1	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	S
2	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
3	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S
4	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S

- la résistance des souches de *Staphyloccocus aureus*

E/ATB	P10	OX	HLG	TOB	TE	E	CD	VA	TEC	RIF	NIT
1	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S
2	R	R	S	R	S	R	R	S	R	S	S
3	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S

4	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	S
5	R	R	S	S	S	R	R	S	R	S	S
6	R	R	S	S	S	R	R	S	R	S	S

- la résistance des souches de *E.coli*

E/ATB	AK	CTR	HLJ	LE	TOB	TI	AZM	AMP
1	S	S	S	S	S	R	R	R
2	S	S	S	S	S	R	R	R

- la résistance des souches de *Pseaudomenas arguinosa*

E/ATB	AK	HLG	LE	TOB	TI	AT
1	S	S	S	S	R	S
2	S	S	R	S	R	S
3	S	S	R	S	R	R

- la résistance des souches de *Shigella*

E/ATB	AK	CTR	HLJ	LE	TOB	TI	AZM	AMP
1	S	S	S	S	S	S	S	S
2	S	R	S	S	S	R	S	S
3	S	R	S	S	S	R	R	R

- la résistance des souches de *Klebsiella*

E/ATB	AK	CTR	HLJ	LE	TOB	TI	AZM	AMP
1	S	S	S	R	S	R	S	R
2	S	S	S	S	S	R	S	S
3	S	R	S	S	R	R	R	R
4	S	R	S	R	R	R	R	R

- la résistance des souches de *Proteus*

E/ATB	AK	CTR	HLJ	LE	TOB	TI	AZM	AMP
1	S	S	S	S	S	R	R	R
2	S	R	S	S	S	R	R	R
3	S	S	S	S	S	R	R	R
4	S	R	S	S	R	R	R	R
5	S	S	S	S	S	R	R	R

- La résistance des souches d'*Enterobacter*

E/ATB	AK	CTR	HLJ	LE	TOB	TI	AZM	AMP
1	S	R	S	S	R	R	S	R
2	S	R	S	R	S	R	R	R
3	S	R	R	S	R	R	R	R
4	S	R	S	S	S	R	R	S
5	S	S	S	S	S	S	S	S

ANNEXE IV : Valeur d'absorbance de test de formation de biofilm par la methode de cyristal violet (en tubes).

- Les valeurs d'absorbances des entérobactéries

Souche	Répitition 01	Répitition 02	Répitition 03	Moyenne
1	0,235	0,245	0,188	0,2226
2	0,532	0,554	0,822	0,9693
3	0,301	0,287	0,533	0,373
4	0,446	0,359	0,720	0,5083
5	0, 425	0,291	0,329	0,3243
6	0, 657	0,292	0,539	0,496
7	0, 653	0,446	0,432	0,5303
8	0, 425	0,352	0,542	0,4396
9	0, 414	0,193	0,406	0,3076
10	0,393	0,299	0,450	0,3776
11	0,771	0,680	0,412	0,4826
12	0, 456	0,990	1,173	1,3113
13	0, 428	0,445	0,371	0,4146
14	0, 592	0,545	0,386	0,5076
15	0, 564	0,425	0,581	0,7126
16	0, 367	0,450	0,457	0,4246
17	0, 253	0,160	0,157	0,39
18	0, 563	0,541	0,425	0,5096
19	0, 621	0,565	0,715	0,5336

Les valeurs d'absorbances des staphylocoques.

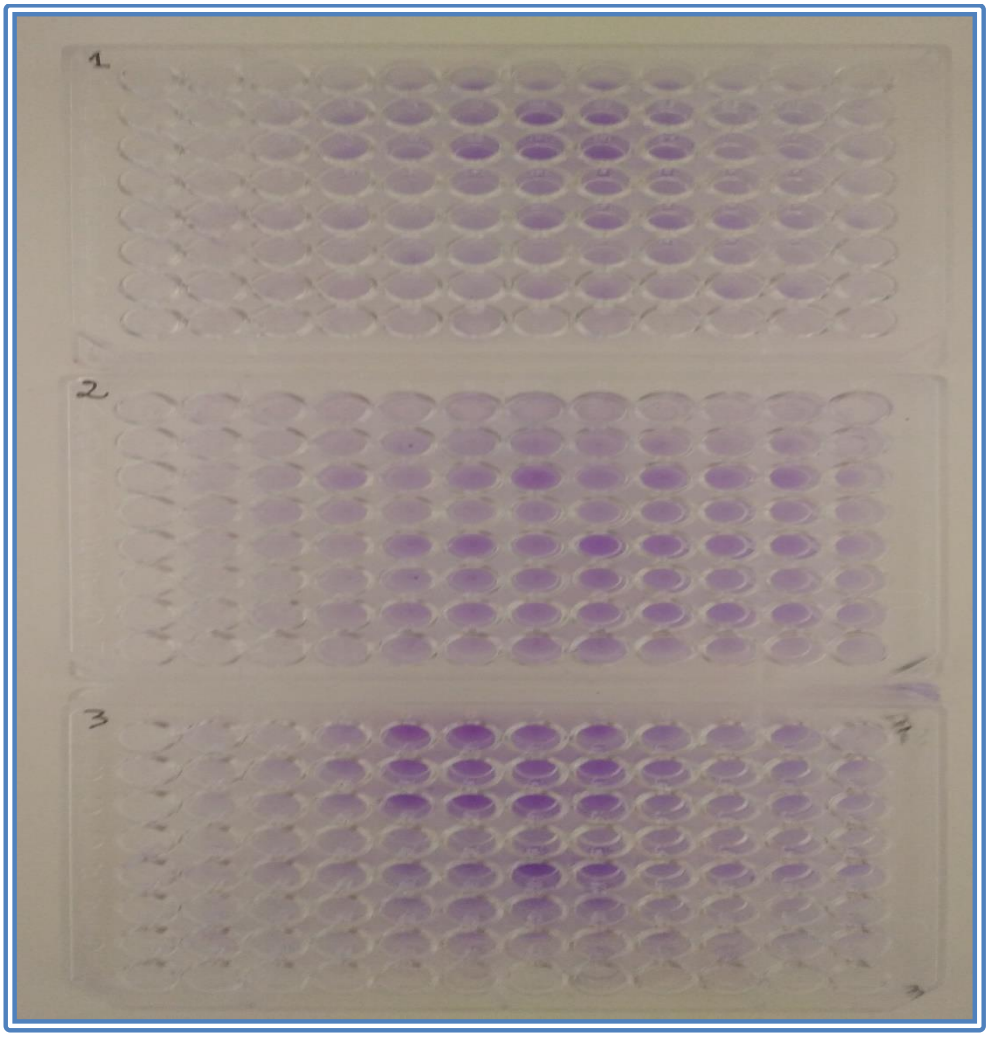
Souche	Répitition 01	Répitition 02	Répitition 03	Moyenne
1	0,380	0,497	0,537	0,4013
2	0,244	0,529	0,238	0,337
3	0,914	0,619	0,695	0,7413
4	0,472	0,219	0,273	0,3213
5	0,494	0,594	0,556	0,7146
6	0,735	0,594	0,638	0,5493
7	0,565	0,475	0,427	0,429
8	1,112	0,701	1,116	1,1123
9	0,326	0,512	0,273	0,3703
10	0,376	0,352	0,415	0,381

Les valeurs d'absorbance des pseudomonas.

Souche	Répitition 01	Répitition 02	Répitition 03	Moyenne
1	1,240	0,871	0,209	0,773
2	0,6130	0,730	1,142	0,5493
3	0,523	0,492	0,629	0,635

ANNEXE V : résultats de la lecture des microplaques

- Milieux suplémentés des sucres



Rapport d'analyse

Mesures brutes - LO : 600 nm

Unité : ABS

	0,140	0,206	0,241	0,382	0,583	0,734	0,434	0,486	0,408	0,227	0,321	0,310
	0,191	0,145	0,274	0,505	0,414	0,427	0,593	0,602	0,400	0,229	0,287	0,263
	0,168	0,205	0,244	0,439	0,341	0,649	0,631	0,671	0,478	0,202	0,259	0,264
	0,164	0,207	0,150	0,191	0,200	0,219	0,258	0,331	0,227	0,201	0,196	0,170
	0,284	0,323	0,373	0,336	0,287	0,219	0,360	0,376	0,381	0,329	0,269	0,271
	0,161	0,171	0,273	0,187	0,316	0,264	0,213	0,201	0,262	0,209	0,173	0,171
	0,135	0,216	0,267	0,324	0,261	0,320	0,298	0,354	0,231	0,284	0,248	0,225
	0,129	0,147	0,139	0,158	0,300	0,498	0,144	0,364	0,139	0,125	0,147	0,202

Rapport d'analyse

Mesures brutes - LO : 600 nm

Unité : ABS

	0,160	0,233	0,303	0,435	0,418	0,656	0,738	0,717	0,347	0,364	0,462	0,421
	0,165	0,224	0,257	0,456	0,451	0,548	0,600	0,553	0,423	0,273	0,396	0,418
	0,164	0,222	0,250	0,372	0,305	0,432	0,697	0,352	0,418	0,326	0,411	0,365
	0,154	0,246	0,307	0,259	0,240	0,218	0,224	0,203	0,238	0,222	0,231	0,238
	0,225	0,268	0,225	0,255	0,426	0,539	0,307	0,621	0,374	0,325	0,343	0,307
	0,123	0,182	0,195	0,244	0,300	0,384	0,332	0,369	0,270	0,227	0,223	0,227
	0,183	0,226	0,396	0,387	0,434	0,392	0,319	0,375	0,349	0,336	0,325	0,296
	0,162	0,157	0,191	0,371	0,567	0,365	0,497	0,474	0,250	0,214	0,175	0,268

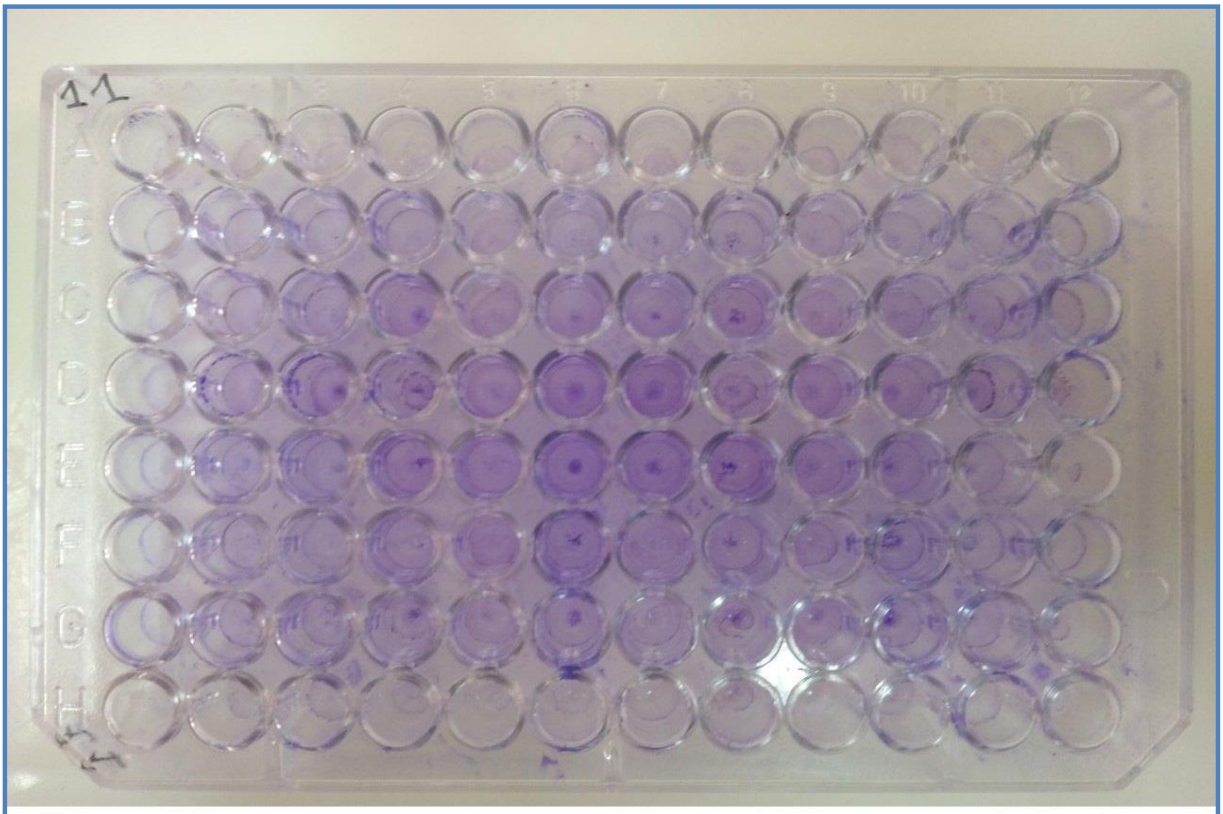
Rapport d'analyse

Mesures brutes - LO : 600 nm

Unité : ABS

	0,118	0,200	0,081	0,388	1,113	1,270	0,613	0,676	0,373	0,242	0,336	0,284
	0,148	0,191	0,211	0,387	0,678	0,624	0,632	0,892	0,468	0,234	0,318	0,321
	0,152	0,220	0,255	0,340	1,005	1,173	1,063	0,769	0,326	0,265	0,351	0,317
	0,099	0,121	0,189	0,157	0,217	0,191	0,234	0,203	0,235	0,177	0,202	0,171
	0,246	0,256	0,366	0,328	0,558	0,559	1,620	0,848	0,307	0,384	0,388	0,410
	0,137	0,150	0,182	0,175	0,500	0,481	0,558	0,595	0,207	0,161	0,168	0,225
	0,215	0,400	0,309	0,362	0,487	0,537	0,450	0,393	0,451	0,406	0,317	0,411
	0,115	0,115	0,134	0,183	0,220	0,418	0,211	0,493	0,230	0,334	0,146	0,127

- Mileux avec pH modifié



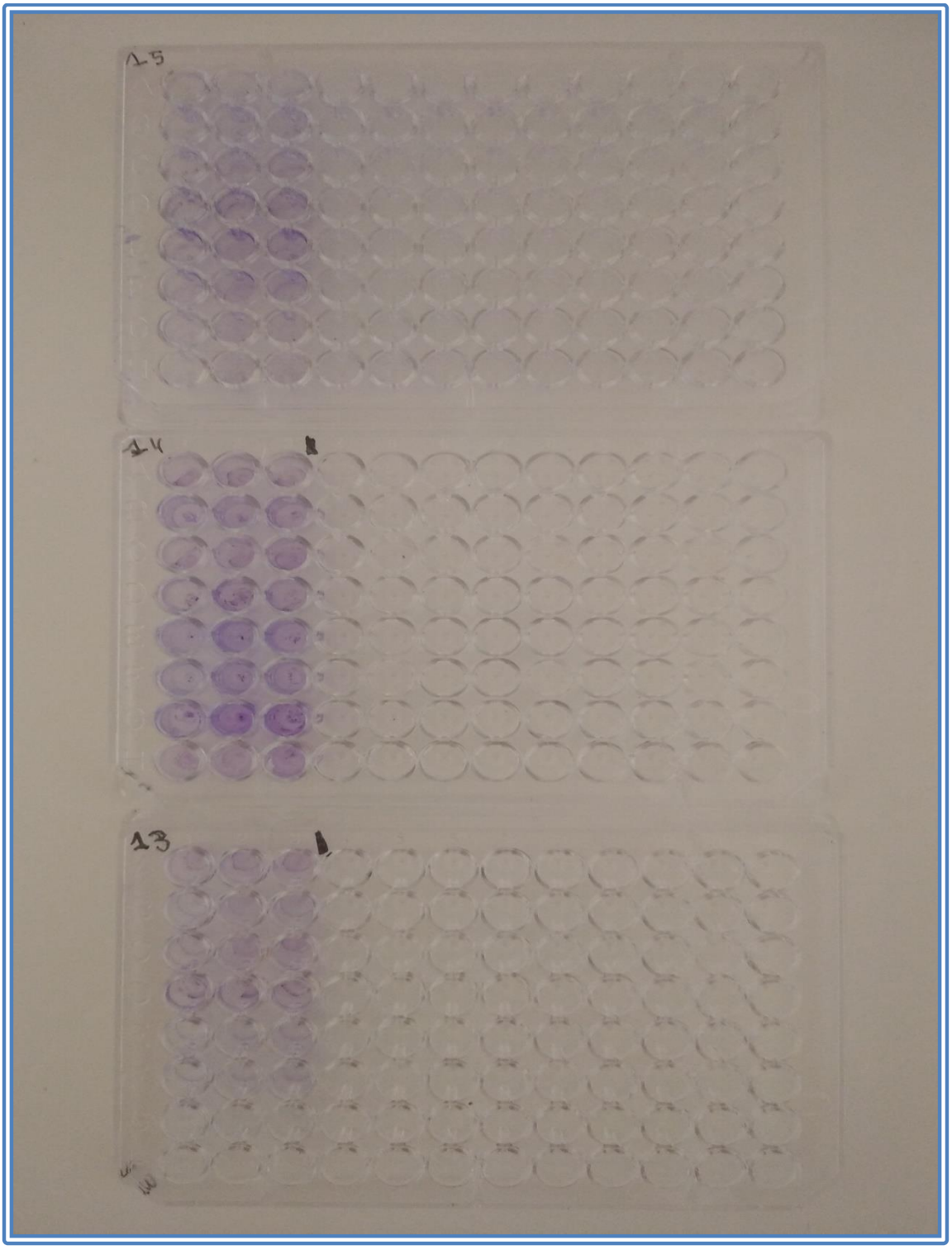
Rapport d'analyse

Mesures brutes - LO : 600 nm

Unité : ABS

0,461	0,409	0,352	0,473	0,431	0,703	0,440	0,354	0,487	0,469	0,411	0,328
0,541	0,771	0,667	1,015	0,501	0,517	0,452	0,880	0,497	0,500	0,526	0,802
0,672	0,748	0,953	1,283	0,636	0,813	0,712	1,207	0,561	0,754	0,798	1,353
0,636	1,160	2,317	1,379	0,694	0,993	1,251	0,759	0,694	0,767	1,893	1,482
0,735	0,874	0,852	1,664	0,621	0,954	0,809	1,616	0,729	0,774	0,603	0,257
0,786	0,748	0,567	0,818	0,509	0,943	0,494	0,762	0,455	1,094	0,502	0,615
0,581	0,917	0,874	1,148	0,603	0,804	0,651	0,935	0,688	0,990	0,769	0,579
0,227	0,238	0,385	0,366	0,201	0,245	0,372	0,706	0,162	0,281	0,586	0,325

- Par rapport au trois différentes température (25°C, 30°C, 37°C)



Rapport d'analyse

Mesures brutes - LO : 600 nm

Unité : ABS

	0,616	0,566	0,593	0,052	0,052	0,051	0,050	0,050	0,052	0,052	0,054	0,055
	0,301	0,304	0,418	0,051	0,051	0,052	0,051	0,052	0,052	0,051	0,053	0,053
	0,688	0,496	0,557	0,056	0,052	0,051	0,052	0,054	0,052	0,065	0,055	0,053
	1,803	1,066	1,103	0,053	0,059	0,052	0,055	0,069	0,054	0,053	0,054	0,054
	0,265	0,251	0,364	0,056	0,110	0,054	0,057	0,128	0,054	0,057	0,061	0,051
	0,378	0,301	0,482	0,055	0,052	0,052	0,051	0,059	0,051	0,051	0,052	0,050
	0,152	0,161	0,150	0,060	0,052	0,053	0,051	0,054	0,054	0,058	0,055	0,062
	0,084	0,078	0,087	0,080	0,053	0,061	0,059	0,058	0,051	0,053	0,051	0,055

Rapport d'analyse

Mesures brutes - LO : 600 nm

Unité : ABS

	1,004	1,177	1,025	0,059	0,052	0,057	0,054	0,052	0,053	0,054	0,079	0,055
	0,842	0,746	0,868	0,062	0,055	0,057	0,056	0,054	0,059	0,053	0,060	0,068
	0,932	0,901	1,135	0,053	0,057	0,055	0,054	0,052	0,053	0,054	0,055	0,123
	2,349	2,352	1,798	0,056	0,057	0,058	0,055	0,056	0,054	0,054	0,056	0,056
	0,661	0,914	0,772	0,057	0,058	0,052	0,053	0,053	0,054	0,054	0,058	0,059
	0,634	0,779	0,820	0,055	0,052	0,051	0,055	0,053	0,057	0,052	0,055	0,055
	0,959	1,016	1,555	0,057	0,056	0,052	0,053	0,054	0,052	0,052	0,058	0,059
	0,567	0,304	0,639	0,053	0,055	0,053	0,055	0,056	0,053	0,051	0,051	0,055

Rapport d'analyse

Mesures brutes - LO : 600 nm

Unité : ABS

	1,039	0,895	1,080	0,067	0,065	0,069	0,063	0,059	0,066	0,062	0,061	0,067
	0,743	0,812	0,779	0,064	0,064	0,068	0,072	0,070	0,061	0,061	0,061	0,065
	1,459	0,840	1,181	0,063	0,063	0,062	0,065	0,060	0,060	0,061	0,063	0,063
	2,083	2,211	2,275	0,061	0,066	0,083	0,069	0,068	0,066	0,070	0,062	0,063
	1,297	1,293	1,615	0,066	0,061	0,078	0,062	0,062	0,065	0,069	0,061	0,062
	0,573	0,895	0,727	0,066	0,060	0,063	0,063	0,065	0,064	0,064	0,063	0,063
	0,537	0,576	0,546	0,069	0,066	0,068	0,064	0,068	0,074	0,064	0,062	0,065
	0,146	0,839	0,542	0,064	0,063	0,063	0,067	0,071	0,068	0,066	0,063	0,070