

Liste des Abréviations

- ❖ **ADN** : Acide désoxyribonucléique
- ❖ **BGN** : Bacille Gram négatif
- ❖ **BGP** : Bacille Gram positif
- ❖ **BHI** : BrainHeart Infusion
- ❖ **CGN** : Coccii Gram négatif
- ❖ **CGP** : Coccii Gram positif
- ❖ **GN** : Gélose nutritive
- ❖ **IN** : Infection Nosocomiale
- ❖ **ISO** : International Standardisation Organisation
- ❖ **LRDEHM** : Laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu
- ❖ **MH** : Mueller Hinton
- ❖ **MO** : Micro-organisme
- ❖ **OMS** : Organisation mondiale de la santé
- ❖ **ONPG** : Orthonitrophényl -D-Galactopyranoside
- ❖ **S. non aureus** : *Staphylococcus* non aureus ou *Staphylococcus* à coagulase négative
- ❖ **S.aureus** : *Staphylococcus aureus*
- ❖ **UFC** : Unité formant des colonies
- ❖ **GN** : Gélose Nutritive
- ❖ **BGP** : Bactérie Gram positif
- ❖ **BGN** : Bactérie Gram négatif

Illustration des tableaux et Figures

1. Liste des Tableaux

Tableau (1): Liste et charge des antibiotiques testés.....	9
Tableau(2) : Profil de résistance et de sensibilité globale vis- à-vis des antibiotiques...	20

2. Liste des Figures

Figure(1) : Répartition des bactéries en fonction de la coloration de Gram.....	16
Figure(2) : Répartition des bactéries en fonction de la coloration de Gram et de la forme.....	17
Figure(3) :Identification biochimique des bactéries isolées.....	17
Figure(4) : Répartition des bactéries isoléesde l'air.....	18
Figure(5) : Répartition des bactéries isolées de la surface.....	19

Glossaire

- ❖ **Antibiotique :** C'est une molécule naturelle ou synthétique, qui détruit ou bloque la croissance des bactéries
- ❖ **Biofilms :** Ce sont des structures hétérogènes constituées d'agrégats de microorganismes, séparés par des espaces libres, dépourvues de bactéries, et parcourues par des courants aqueux, véritables(canaux). Ceux-ci y assurent la circulation des fluides et permettent aussi l'apport de nutriments aux bactéries.
- ❖ **Epidémie :** C'est une maladie qui se disperse pendant un certains temps dans une zone géographique donnée et qui touche un grand nombre de personne en même temps.
- ❖ **Infection urinaire :** C'est une infection qui peut toucher une ou plusieurs partie du système urinaire : les reins, les urètres, la vessie.
- ❖ **Leucémie :** ou Leucose, est un cancer des tissus responsables de la formation du sang c'est-à-dire des cellules sanguines immatures se trouvant dans la moelle osseuse.
- ❖ **Leucopénie :** C'est la déficience du taux des leucocytes.
- ❖ **Septicémie :** ou sepsis est une infection généralisée de l'organisme due à des microorganismes pathogènes de type bactérien. Elle se manifeste par des décharges répétées de germes pathogènes dans le sang.
- ❖ **Sporadique :** irrégulier, qui apparaît ou se produit de temps à autre. Elle se dit des maladies qui touchent que quelque individus.
- ❖ **Prophylactique :** Désigne le processus actif ou passif ayant pour but de prévenir l'apparition, la propagation ou l'aggravation d'une maladie.

Résumé

Les infections nosocomiales (IN) constituent un problème de santé publique engendrant des conséquences graves aussi bien pour les patients que pour le système de santé. La surveillance microbiologique de l'environnement hospitalier et la recherche des réservoirs microbiens à l'origine des cas groupés d'infections ou d'épidémies, sont un élément primordial de la prévention des IN.

Notre étude réalisée au LRDEHM de Fès durant deux mois, dont les objectifs ont consisté à identifier les germes isolés d'un service hospitalier et évaluer l'activité antibactérienne des antibiotiques sur les souches retrouvées.

L'identification a concerné 44 souches dont 28 sont issues des prélèvements des surfaces et 16 sont issues des prélèvements de l'air. Elle a été réalisée en se basant sur la coloration de Gram et sur la galerie biochimique classique. L'activité antibactérienne a été réalisée sur 8 souches par la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de Microbiologie.

Une prédominance des bactéries à Gram positif par rapport à celle à bactéries à Gram négatif, a été notée soit une fréquence de 70,46% contre 29,54%. Les *Staphylococcus* à coagulase négative ont été les plus fréquemment retrouvés dans l'air, alors que les surfaces ont été contaminées par une flore diversifiée avec notamment la présence de *Staphylococcus aureus*, Staphylocoques à coagulase négatif, des Streptocoque fécaux, des *Pseudomonas sp* et des *Bacillus sp*.

Le profil d'antibio-résistance témoigne d'une multi-résistance à la plupart des antibiotiques (AMP, P, TOB, OX, CTX, MY, AMC, SXT, CFM FOX, CT). Les quinolones et les glycopeptides gardent une bonne activité sur les souches testées.

Afin de maîtriser le risque infectieux lié à l'environnement et de prévenir les IN et notamment celles causées par les bactéries multi-résistantes, il est recommandé de respecter les bonnes pratiques d'hygiènes, de contrôler l'environnement hospitalier et de limiter l'usage abusif des antibiotiques.

Mots clés : Infection nosocomiales, risque infectieux, surface, air, environnement hospitalier, antibio-résistance.

Présentation du lieu de stage : LRDEHM Fès

J'ai réalisé mon stage de fin d'étude durant deux mois au sein du Laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu de la région Fès- Meknès.

Le Laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu de Fès, lié à la Direction Régionale de la Santé de Fès-Meknès.. En 2012, il a obtenu l'accréditation selon le référentiel NM ISO 17025 (MCI/CA AL 49/2012) des analyses microbiologiques et chimiques des eaux d'alimentation humaine.

Ce laboratoire couvre les besoins en contrôle bactériologique et physicochimique de l'eau et des aliments ainsi que le diagnostic du paludisme, de la leishmaniose cutanée, de la bilharziose et l'identification des moustiques vecteurs de maladies des C/S de la préfecture de Fès, des provinces de Moulay Yacoub, de Sefrou et Boulemane, le contrôle sanitaire aux frontières, les Bureaux Communaux d'Hygiène, les services d'hygiène des hôpitaux El Ghassani et Ibn El khateb et du CHU Hassan II. Il réalise aussi le dépistage néonatal de l'hypothyroïdie congénitale des nouveau-nés de la région de Fès-Meknès.

L'organigramme du laboratoire est présenté dans la page suivante

Sommaire

Dédicace	i
Remerciements	ii
Liste des Abréviations	iii
Illustration des tableaux et figures	iv
Glossaire	v
Résumé	vi
Présentation du lieu de stage : LRDEHM Fès	vii
Introduction Générale	1

Partie I : Synthèse bibliographique

I. Généralités sur les infections nosocomiales	2
I-1 : Définition	2
I-2 : Origine et modes d'acquisition des infections nosocomiales	2
I-3 : Facteurs favorisants la survenue d'infections nosocomiales	2
II. Environnement hospitalier : Air et Surface	3
II-1 : Contamination de l'air	3
II-2 : Contamination de la surface	3
II-3 : Survie des agents infectieux dans l'environnement	4
II-4: Microorganismes contaminants l'air et les surfaces en milieu hospitalier	4
II-5 : Relation entre la contamination environnementale et l'infection nosocomiale	5
II-6 : Mesure de la contamination de l'air et de la surface	5
III. Prévention des infections nosocomiales	7
IV. Résistance Bactérienne aux antibiotiques	7

Partie II. Matériel et méthodes

1. Type, lieu et période d'étude	8
2. Matériels	8
2.1. Matériel biologique	8
2.2. Matériel, équipements et consommables	8
3. Méthode	
3.1. Identification des souches	9
3.2. Evaluation de l'activité antibactérienne des antibiotiques sur des souches isolées	15

Partie III. Résultats

I. Identification des souches	16
1- Répartition des bactéries en fonction de la coloration de Gram	16
2- Répartition des Bactéries en fonction de la coloration de Gram et la forme	16

3- Identification biochimique des bactéries isolées.....	17
4- Répartition des bactéries isolées en fonction de la nature du point de prélèvement....	18
4-1- Bactéries isolées de l'air	18
4-2-Bactéries isolées des surfaces.....	18
II. Profil d'antibio-résistance des souches vis-à-vis des antibiotiques.	19
Discussion	22
Conclusion, recommandations et perspective	24
Annexes	25
Références bibliographiques	31

Introduction Générale

L'hôpital est un lieu où l'on traite, mais c'est également un lieu où l'on peut contracter des maladies infectieuses. La multiplication et la sophistication des techniques de soins devenues de plus en plus invasives, l'état d'immunodépression profonde de certains patients, représentent des terrains propices à ces infections (**BENSLIMANI A., 2008**).

Ces maladies infectieuses, reconnues par infections nosocomiales (IN), constituent un sérieux problème de santé publique avec des conséquences considérables tant sur le plan individuel que sur le plan économique (**EL RHAZI K. et al, 2007**). Elles sont devenues le souci majeur des acteurs de soins, leur fréquence et leur gravité sont des marqueurs de la qualité des soins (**BERRADA S., 2016**).

Leur prévalence varie entre 1 et 20 %, et l'incidence globale de 5 à 10%, avec une variation d'un pays à l'autre. A titre d'exemple, 5 à 10% des patients hospitalisés contractent une infection nosocomiale aux États-Unis, 7,9% au Canada, et 9 à 12% en Europe (**BERRADA S., 2016**).

Au Maroc, l'enquête réalisée à l'échelle nationale en 1994, a révélé une prévalence globale de l'IN de 8,1% dans les hôpitaux marocains, avec une variation selon le niveau de technicité et la spécialité des structures hospitalières, soit 4,1% dans les hôpitaux provinciaux, 7,7% dans les hôpitaux régionaux, et entre 9,5 à 11,5% dans les hôpitaux universitaires (**AMRANI J., 1994**).

Si l'implication directe de l'environnement hospitalier dans la survenue des IN était controversée, les recommandations internationales indiquent actuellement les intérêts multiples de la surveillance microbiologique de l'environnement dans la prévention des infections nosocomiales, à savoir la prise en considération de la contamination des surfaces, la recherche des réservoirs microbiens à l'origine des cas groupés d'infections ou d'épidémies (**BERRADA S., 2016**).

Dans le cadre de notre projet de fin d'étude, nous avons réalisé ce travail intitulé :

« Identification des souches bactériennes isolées de l'environnement D'un service hospitalier »

L'objectif de notre étude étaient de :

- Identifier des souches bactériennes isolées de l'environnement d'un service hospitalier ;
- Mesurer l'activité antibactérienne des antibiotiques sur certaines souches isolées.

Synthèse bibliographique

I. Infections nosocomiales

I-1- Généralités

L'adjectif « nosocomial » vient du grec : *nosos*=maladie, *komein*= soigner,«*nosokomeion*», signifiant « hôpital ».

Selon l'OMS, une infection nosocomiale ou infection hospitalière peut être définie comme étant une infection survenant à l'hôpital ou dans un autre établissement de santé, chez un patient admis pour une raison autre que cette infection et chez qui cette infection n'était ni présente ni en incubation au moment de l'admission(**OMS, 2009**).

Le caractère nosocomial est basé essentiellement sur le délai écoulé entre l'admission et le début de l'infection. Ce délai doit être supérieur à la durée d'incubation de l'infection. L'infection nosocomiale survient :

- Après les 48 premières heures d'hospitalisation : le délai de 48 h correspond à la durée d'incubation minimum d'une infection aiguë liée à une bactérie à croissance rapide,
- Dans les 30 jours après intervention chirurgicale (si chirurgie),
- Dans l'année qui suit la mise en place de matériel chirurgical (implant ou prothèse...).

Les IN peuvent être déclarées pendant le séjour à l'hôpital ou après la sortie de l'hôpital. Elles sont dues à de nombreux microorganismes, incluant les bactéries, champignons, parasites, et virus (**LANGLOIS J., 2000**).

I-2- Origine et modes d'acquisition des infections nosocomiales

On distingue plusieurs types d'IN qui relèvent de modes de transmission différents :

- ❖ L'infection nosocomiale « exogène » :C'est une infection liée à des microbes de l'environnement hospitalier (air, surface, eau, matériel, ou alimentation).
- ❖ L'infection provoquée par les germes du personnel porteur.
- ❖ L'infection croisée transmises d'un malade à l'autre, par les mains ou par les instruments de travail du personnel médical.
- ❖ L'infection nosocomiale « Endogène » : provenant du malade lui-même chez lequel la voie digestive, la peau, et le vagin sont les réservoirs le plus importants pour ce type d'infection. Toutefois selon l'origine des germes, on distingue deux types d'infection nosocomiale :
 - Les infections primaires : produites par les germes qui sont présentes chez les malades au moment de leur admission.
 - Les infections secondaires : qui résultent d'une colonisation par des germes véritablement hospitaliers (**LANGLOIS J., 2000 ; EL KHADER M., 2011**).

I-3- Facteurs favorisants la survenue d'infection nosocomiale

Quel que soit son mode de transmission, la survenue d'une IN dépend essentiellement de l'état médical du patient, favorisé par plusieurs facteurs. On cite :

- ❖ Les pathologies chroniques telles que le diabète, l’insuffisance rénale, l’insuffisance hépatique, l’immunodépression (cancer, SIDA, leucémie, leucopénie), ainsi que toute pathologie grave diminuant le pouvoir immunitaire ;
- ❖ L’état nutritionnel perturbé ;
- ❖ La contamination par le matériel tel que les endoscopes digestifs et les sondes urinaires ;
- ❖ L’infection sur cathéter vasculaire (veineux ou artériels), ventilation artificielle, endoscopie, la porte d’une prothèse ;
- ❖ L’âge ;
- ❖ Le Séjour dépassant les trois semaines ;
- ❖ Les traitements extensifs des antibiotiques qui sélectionnent les souches résistants ;
- ❖ La nature des soins : (Transmission par le matériel médical, Transmission par le contact avec le personnel soignant (**AMARA I.et al,2015** ; **ELRAZIK.et al, 2007** ; **EL KHADER M., 2011**).

II. Environnement hospitalier : Air et Surface

II-1- Contamination de l’air

L’air joue un rôle important dans les mécanismes d’échanges des particules d’une zone à l’autre, et donc des germes pouvant s’y trouver. L’air contient des microorganismes en densité extrêmement variable. En effet, ces germes proviennent de différentes sources : flore endogène du personnel et des patients(flore cutanée, flore nasale ou buccale), du sol, ainsi que de la poussière(**Comite Technique National des Infections Nosocomiales, 2002**).Ces microorganismes sont composés de bactéries à Gram positif telles que les *Bacillus sp*, les *Staphylococcus*, et les Actinomycètes, de bactéries à Gram négatif telles que les entérobactéries ou les *Pseudomonas*, d’espèces apparentées comme *Legionella*, les mycobactéries atypiques, les champignons microscopiques, et les virus tels que les entérovirus ou le virus de l’hépatite A(**BERRADA S.et al, 2017**).

II-2- Contamination de la surface

A l’hôpital, les surfaces susceptibles d’entrer en contact avec le patient soit directement, soit indirectement par l’intermédiaire de dispositifs médicaux ou des mains de personnes, peuvent constituer des réservoirs microbiens(**IDRISSI OUADRHI A.,2011** ; **BERRADA S.et al, 2017**).Les bactéries présentes sur les surfaces de l’environnement hospitalier peuvent également provenir des particules en suspension dans l’air. Par ailleurs, les bactéries peuvent être apportées par l’Homme du fait qu’il émet en permanence des particules (squames de la peau, cheveux, poil...). Ces dernières peuvent servir de véhicule de microorganismes en les sédimentant sur les surfaces. Après contact avec la surface, les bactéries vont adhérer à celle-ci ce qui rend leur élimination plus difficile et pourrait générer la formation d’un biofilm(**LEMARIE C.et al, 2013**).Ces surfaces constitueraient donc une niche écologique de bactéries multi-résistantes qui peuvent être un réservoir à partir duquel des infections nosocomiales peuvent se développer(**MEITE S.et al, 2010**).

II-3- Survie des agents infectieux dans l'environnement

L'environnement contaminé joue un rôle majeur dans la transmission des microorganismes, qui dépend de la capacité du microorganisme à résister à la dessiccation sur l'environnement hospitalier .Cette résistance est favorisée par plusieurs facteurs parmi lesquels, on note la température, la lumière et l'humidité (**LEMARIE C.et al, 2013**).

II-4- Microorganismes contaminants l'air et les surfaces en milieu hospitalier

La flore retrouvée dans l'environnement hospitalier varie d'un hôpital à l'autre et d'un service à l'autre. Elle dépend de plusieurs facteurs tels que le non-respect des bonnes pratiques d'hygiènes, l'activité humaine, le matériel médical et la qualité de l'air (**BERRADA S. et al, 2017**).Cette flore est variée et comporte notamment les moisissures, les levures, les bactéries.

II- 4-1- Les Moisissures

Les moisissures sont des champignons aérobies, eucaryotes, hétérotrophes, filamentous se développant par un système de filaments ramifiés qui produisent des spores disséminées par l'air et l'eau. Ces microorganismes sont présents d'une manière ubiquitaire dans notre environnement et sont capables de résister dans des conditions hostiles. La contamination humaine est produite principalement à partir du compartiment aérien par la voie respiratoire (**Agence Française de Sécurité Des Aliments, 2009**).

La présence des moisissures en milieu hospitalier est devenu un sujet de préoccupation tant pour les professionnels de la santé que pour les usagers. En outre, les moisissures du genre *Aspergillus*, contaminants du milieu hospitalier, sont responsables d'infections et pourraient engendrer des conséquences très graves voire même fatales pour les personnes fragiles et les immunodéprimés (**Institut National de Santé Publique du QUEBEC, 2002**).

II-4- 2- Les levures

Les levures sont des champignons microscopiques se multipliant par bourgeonnement ou scissiparité. Par opposition aux champignons filamentous constitués d'un complexe de filaments plus ou moins ramifiés avec des fructifications, certaines levures peuvent donner des filaments issus d'une levure mère. La levure est la forme végétative et dans la plupart des cas, la forme de résistance et de dissémination de l'espèce (**Agence Française de Sécurité Des Aliments, 2009**).

Les infections nosocomiales à *candida* sont de plus en plus fréquentes chez les patients hospitalisés dans une unité de soins intensifs, et elles sont une source majeure de morbidité et de mortalité. Par ailleurs, *candida Albicans* s'avère l'espèce la plus commune provoquant des infections fongiques souvent graves, rapidement évolutives et difficiles à diagnostiquer vu le manque de spécificité des signes cliniques (**SELLAMI A.et al, 2006**).

II-4-3- Les bactéries

Ce sont les agents pathogènes les plus couramment incriminées dans les infections nosocomiales. On distingue : les bactéries pathogènes et les bactéries commensales.

❖ Les bactéries pathogènes : Elles ont une virulence plus élevée et pourraient provoquer des épidémies, quel que soit l'état immunitaire de l'hôte. Elles comportent :

➤ Les bactéries à Gram positif (BGP) telles que *Staphylococcus aureus*, bactérie cutanée qui colonise la peau et les fosses nasales du personnel hospitalier et des patients. Ce type de germes peut provoquer des infections variées (pulmonaires, cardiaques, et sanguine), liés à l'affaiblissement des défenses immunitaires du patient. *Staphylococcus aureus* est considérée comme une bactérie pathogène qui résiste fréquemment aux antibiotiques. Parmi les BGP, on note également les *Clostridium* et les *Bacillus* (**DUCEL G.et al, 2008**).

➤ Les bactéries à Gram négatif (BGN): Elles comportent les entérobactéries comme *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Serratia marcescens*. Ces bactéries peuvent coloniser certaines sites lorsque les défenses immunitaires de l'hôte sont affaiblies (site d'insertion d'un cathéter, d'une sonde urinaire) et provoquer des infections graves telles que l'infection du site opératoire, l'infection pulmonaire et les infections sporadiques. Elles peuvent également être hautement résistantes.

Les micro-organismes à Gram négatif comme *Pseudomonas Sp*, sont souvent isolés dans l'eau et les milieux humides. Ils peuvent coloniser les voies digestives des patients hospitalisés (**DUCEL G.et al, 2008**).

❖ Les bactéries commensales : Elles sont présentes dans la flore normale des sujets en bonne santé et jouent un rôle protecteur significatif en empêchant la colonisation par des micro-organismes pathogènes. Certaines bactéries commensales peuvent provoquer une infection opportuniste si les défenses immunitaires de l'hôte sont affaiblies. Ainsi, à titre d'exemple, *Staphylococcus epidermidis*, espèce à coagulase négative, peut causer des infections très graves (**DUCEL G. et al, 2008**).

II-5- Relation entre la contamination environnementale et l'infection nosocomiale

L'implication directe de l'environnement hospitalier dans la survenue de ces infections est discutée et reste difficile à évaluer (**MEITE S.et al, 2010**). Certains considèrent que son rôle est négligeable, d'autres pensent au contraire qu'il sert de relais dans les transmissions croisées, notamment pour les bactéries à Gram positif (BGP) et que la contamination microbiologique des surfaces favoriserait l'émergence des infections nosocomiales pour les patients les plus fragiles (**BERRADA S.et al, 2017**).

II-6- Mesures de la contamination de l'air et de surface

II-6-1- Mesurage de la contamination de l'air

Pour effectuer une analyse de la qualité Microbiologique de l'air, plusieurs méthodes de prélèvement sont disponibles et dépendent de la fiabilité de la recherche envisagée. Selon les cas, une méthode de prélèvement est plus adaptée que l'autre. Nous allons nous limiter aux méthodes les plus couramment utilisées dans l'analyse microbiologique de la qualité d'air intérieur (**MATHILDE V., 2008**).

❖ Méthode par cyclone

Cette méthode consiste à capturer les micro-organismes présents dans l'air intérieur ou extérieur dans un liquide contenu dans un récipient par force centrifuge. Le prélèvement est réalisé sur une durée de 10 minutes environ, le volume de prélèvement est au maximum de 3 mètres cubes. Cette méthode innovante pour la détection des micro-organismes dans l'air est

adaptée pour la quantification des micro-organismes dans des environnements spécifiques où les concentrations attendues en microbes sont élevées. Elle permet également la détection de plusieurs types de micro-organismes par un seul prélèvement (**CONDAIR Analyse de la qualité de l'air intérieur, 2008**).

❖ Méthode par Sédimentation

La méthode par sédimentation ne nécessite pas de matériel de prélèvement particulier. Habituellement, une boîte de pétri gélosée ouverte, sans couvercle, est déposée sur un support comme par exemple : une table pendant des temps variables qui dépendent de la densité de contamination durant cette période. Les micro-organismes présents dans l'air tombent naturellement sur la surface de la gélose par la force de gravité. Elle permet de déterminer le nombre de microbes qui se dépose sur une surface pendant une période du temps spécifique. Comme toute méthode faisant appel à des milieux gélosés, seuls les germes vivants peuvent être isolés et le choix du milieu et de la température d'incubation sont déterminants (**MATHILDE V., 2008**).

❖ Méthode par impaction

La méthode par impaction est la technique de prélèvement la plus répandue et la plus commune. Cette méthode robuste existe depuis de nombreuses années. Le prélèvement consiste à capter les micro-organismes sur une boîte de pétri gélosée grâce à un impacteur. Cette méthode est un bon outil pour qualifier et quantifier la contamination microbiologique en Unités Formant Colonie par volume d'air (UFC/ m³).

Les boîtes de pétri sur lesquelles sont impactés les microorganismes sont ensuite incubées en vue d'un comptage visuel des colonies, 3 à 7 jours après. L'impaction est considérée comme la méthode de référence. Elle est pourtant limitée en termes de durée de collecte car risque de dessiccation du milieu, et de débit d'air vu le risque de stress des microorganismes (**MATHILDE V., 2008**).

II-6-2- Mesurage de la contamination de surface

Le contrôle des contaminations biologiques de l'environnement (air, eaux, surfaces) est nécessaire pour assurer la protection du personnel et la prévention des risques sanitaires en environnement public (**MEITE S. et al, 2010**). Dans ce cas, 2 méthodes de prélèvement sont principalement utilisées. Il s'agit de :

❖ Méthode par écouvillonnage

L'écouvillon est une tige terminé par du coton stérile qu'on frotte sur la surface à tester. La façon de frotter consiste à faire des stries dans deux directions perpendiculaires, ainsi que la surface à couvrir, soit 20 ou 100 cm². Lors du prélèvement, l'utilisation d'un gabarit est conseillée. Le prélèvement est alors plongé dans une solution stérile, présente dans le tube dans lequel l'écouvillon est conservé. La solution est maintenue à 4°C pour limiter les phénomènes de multiplication de flore. Le diluant est ensuite agité pour mettre les bactéries en solution et remis en culture sur boîte de pétri. Un comptage en UFC des germes ayant poussé est réalisé après incubation (**Institut Pasteur de MADAGASCAR, 2015**). Cette

méthode a l'avantage de permettre des prélèvements dans des endroits peu accessibles aussi bien que sur les surfaces planes (**GUIRAUD J-P, 2006**).

❖ Méthode par boite de contact

Elle repose sur le principe de récupération par empreinte des microorganismes à l'aide de consommables prêts à l'emploi : lame gélosée à double face, boites contenant de 55mm de diamètre, tout en appliquant sur la surface à tester avec une pression constante pendant 10 secondes sur une surface de 25cm². Les boites de contact sont incubées pendant, 24 à 48heures à une température qui dépendra du germe recherché. Après incubation, un comptage des colonies qui ont poussé, est effectué et exprimé en UFC/cm² (**Institut de recherches Appliquées au contrôle de qualité, 2013**).

III. Prévention des infections nosocomiales

La surveillance microbiologique de l'environnement représente l'un des axes de la politique de lutte contre les infections nosocomiales. C'est l'un des outils de mesures qui permettent d'évaluer une situation de départ et l'efficacité demesures correctives(**Comite Technique National des Infections Nosocomiales, 2002**). La prévention des infections nosocomiales nécessite donc un programme intégré contrôlé, dont les éléments clés sont les suivants :

- ✚ Limiter la transmission d'agents microbiens de patient à patient pendant les activités de soins directs par le lavage adéquat des mains et le port des gants ; le respect de l'asepsie, de la stérilisation de la désinfection ainsi que de l'isolement des patients vulnérables ;
- ✚ Maîtriser les risques infectieux liés à l'environnement ;
- ✚ Protéger les patients par l'usage approprié d'anti-infectieux à titre prophylactique par le contrôle de l'alimentation, et par les vaccinations, ainsi que par le renforcement des pratiques de soins et la formation continue du personnel (**DUCEL G .et al, 2008**).

IV. Résistance Bactérienne aux Antibiotiques

Les Résistance s'étendent qualitativement mais aussi qualitativement, depuis plus de 20 ans, de nombreux déterminants de résistance ont été décrits avec l'émergence de bactéries de plus en plus résistantes.

L'impact de cette multi- résistance aux antibiotiques est essentiel au niveau clinique en termes de mortalité et de morbidité mais aussi sur le plan économique, car les infections liées aux bactéries multi-résistantes engendrent des couts d'hospitalisation élevés.

L'extension géographique des résistances se produit au niveau international mais aussi dans le milieu de vie.

Les infections causées par les bactéries résistantes et multi-résistantes, autrefois cantonnées au milieu hospitalier, deviennent communautaires, ainsi le nombre de personnes susceptibles d'être exposées à ce type de bactéries est continuellement démultiplié (**BERRADA S.,2016**).

Matériels et Méthodes

1- Type, lieu et période d'étude

Il s'agit d'une étude prospective réalisée au Laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu de Fès (LRDEHM), sur une durée de 2 mois allant du 01 avril au 31 mai 2017. Elle a comporté 2 volets : le 1^{er}a consisté à identifier des souches isolées de l'environnement d'un service hospitalier ; alors que le second volet a été consacré à l'évaluation de l'activité antibactérienne des antibiotiques sur des souches identifiées.

2- Matériels

2-1- Matériel biologique

L'identification des souches a concerné des isolats bactériens retrouvés dans l'environnement d'un service hospitalier.

2-2- Matériel, équipements et consommables utilisés

Le matériel nécessaire a comporté l'autoclave ($121\pm3^{\circ}\text{C}$), le four pasteur ($175\pm5^{\circ}\text{C}$), le bec bunsen, le vortex, les étuvés ($30\pm1^{\circ}\text{C}$, $37\pm1^{\circ}\text{C}$, $44\pm0,5^{\circ}\text{C}$, $22\pm2^{\circ}\text{C}$), la balance, le bain-marie, le réfrigérateur maintenu à $5\pm3^{\circ}\text{C}$, la pro pipette, les pipettes stériles, la pince, les boites de pétri ainsi que les milieux de cultures et les réactifs d'identification.

Les milieux de culture utilisés sont la gélose nutritive (GN), le milieu PCA, le Bouillon Heart Infusion (BHI), le milieu Slanetz, la Bile Azide Esculine(BEA), le Cétramide, le Chapman mannite, le milieu DNase Agar, le milieu King A et King B, le milieu Kligler-Hajna et le milieu Muller-Hinton.

Les réactifs utilisés pour les tests d'identifications sont le Cristal violet, le Lugol, l'alcool acétone, la Fushine, le plasma de lapin, l'urée, le Kovacs, disques oxydase, les disques ONPG.

N.B : La composition, la préparation et les contrôles qualités des milieux de culture sont décrits en (annexe 1).

2-3-Antibiotiques utilisés

Les antibiotiques testés sont ceux recommandés par le Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie (**CASF**, 2014).

Le tableau 1, montre les antibiotiques utilisés ainsi que leur charge

Tableau 1: Liste et charge des antibiotiques testés.

Famille et sous familles d'antibiotiques	AB testé	Sigle de l'AB	Charge de l'AB
Bêta-lactamines	Pénicilline	P	10 UI
	Ampicilline	AMP	10 µg
	Amoxilline + acide clavulanique	AMC	20/10 µg
	Oxacilline	OX	5 µg
Carbapénème	Imipénème	IPM	10µg
Céphalosporines	Céfoxitine	FOX	30µg
	Cefotaxime	CTX	30 µg
	Céfixime	CFM	10 µg
	Acide Fusidique	FD	10 µg
Glycopeptides	Vancomycine	VA	5 µg
	Colistine	CT	50µg
Aminoside	Tobramycine	TOB	30µg
	Kanamycine	K	
Lincosamides	Lincomycine.	MY	15 µg
Quinolones	Ciprofloxacine	CIP	5 µg
	Lévofloxacine	LEV	5µg
	Sulfaméthoxazole+triméthoprime	SXT	1.23/23.75 µg
Macrolide	Erythromycine	E	15 µg

3- Méthodes

3-1- Identification des souches isolées de l'environnement

Une purification de chaque type de colonie a été réalisée par ensemencement du milieu PCA ou GN, et incubation à $37\pm1^{\circ}\text{C}$ pendant 24h. Les souches isolées et purifiées ont fait l'objet d'une identification microbiologique, se basant notamment sur la coloration de Gram et sur la galerie biochimique classique.

3-1-1- Identification microbiologique

➤ Coloration de Gram

❖ Principe

C'est la coloration de base en bactériologie, elle permet une classification des bactéries selon leur structure, leur forme et leur Gram.

❖ Technique

A partir de la culture purifiée, on réalise un étalement sur une lame à l'aide d'une anse, puis on la fixe à la chaleur, ensuite on la couvre par la solution de violet de gentiane pendant 30 secondes, puis on élimine le violet de gentiane en rinçant avec de l'eau, on ajoute le Lugol, 2 fois pendant 15 secondes, et on rince avec de l'eau. Ensuite, on décolore à l'alcool-acétone par un mouvement de bascule, jusqu'à ce que l'alcool acétone n'entraîne plus de violet et soit bien incolore. On lave après à l'eau courante et on recolore avec la fuchsine diluée pendant 15 secondes. Ensuite, on rince bien et on séche, et enfin, on observe à l'huile d'immersion au fort

grossissement. Les germes à Gram positif apparaissent violets, et ceux à Gram négatif apparaissent roses (annexe 2).

3-1-2- Identification biochimique

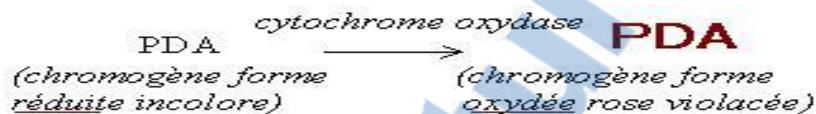
Le schéma général de l'identification des bactéries est montré en (annexe 3)

3-1-2-1- Identification biochimique des Bacilles Gram Négatif (BGN)

a. Recherche de l'oxydase

❖ Principe

Si une bactérie possède l'enzyme respiratoire, appelée cytochrome oxydase, alors elle peut faire la réaction suivante :



Les cytochromes sont des protéines qui appartiennent à la chaîne respiratoire, composée d'une succession de transporteurs d'électrons, en particulier les cytochromes c. En fait, ce test recherche le cytochrome c-oxydase.

La recherche de l'oxydase est un des critères les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des bactéries, surtout celles à Gram négatif. Cette recherche consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée, à oxyder la forme réduite incolore de dérivés N-méthylé du paraphénylène diamine, en leurs formes oxydées semi-quinoniques rose-violacées.

❖ Technique

A partir de la culture purifiée, un inoculum bactérien est déposé sur un disque d'oxydase à l'aide d'une pipette pasteur. La réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration violette à l'endroit où nous avons déposé la colonie, soit immédiatement, soit quelques secondes après (Voir annexe 5).

b- Test ONPG (Orthonitrophényl -D-Galactopyranoside)

❖ Principe

Le terme ONPG hydrolase est plus propre que celui de D-galactosidase dans la mesure où il précise que le substrat utilisé est l'ONPG et non le lactose.

En effet, il existe des germes qui reconnaissent l'ONPG du côté nitro-2-phénol et non celui du D-galactoside. Ces germes ont donc une activité ONPG hydrolase sans fermenter le lactose. Le test à l'ONPG est une technique basée sur l'action directe de l'enzyme sur une molécule chromogène pouvant être l'Orthonitrophényl-D-Galactopyranoside, ou le 2-naphtol-D-galactopyranoside.

Ceux-ci sont utilisés comme substrat et libèrent respectivement l'orthonitrophénol (jaune) et le b-naphtol.

Ce test est réalisé pour les BGN oxydase négative.

❖ Technique

A partir d'une culture purifiée de bacille Gram négatif et oxydase négative, nous avons réalisé une suspension dans 1 ml d'eau distillée stérile, puis nous avons ajouté un disque

imprégné d'ONPG. Une réaction positive se traduit par un virage du milieu au jaune (Voir annexe 5).

c- Milieu lactose-glucose-H₂S (Kligler-Hajna)

Ce milieu est un milieu complexe, qui permet la recherche de plusieurs caractères biochimiques. Il est très utilisé dans l'identification des *Enterobacteriaceae*.

❖ Principe

Il s'agit d'un milieu différentiel de couleur rouge qui permet de confirmer la fermentation du glucose et du lactose, la production des gaz, et aussi la réduction des composés soufrés qui se traduit par la production de H₂S. Comme ces milieux contiennent des sels de fer, la production de H₂S est révélée par la formation du sulfure métallique de couleur noire.

❖ Technique

A partir d'une culture purifiée de bacille Gram négatif oxydase négative, on ensemence la pente du milieu Kligler en stries serrées et parallèles, et le culot par piqûre centrale, on incube ensuite à 37±1°C pendant 18 à 24 h.

- Si la souche fermente le lactose, la surface inclinée vire au jaune. Sinon, sa couleur reste inchangée ;
- Si la souche fermente le glucose, le culot vire au jaune. Sinon, sa couleur reste inchangée ;
- Si la souche produit l'H₂S, il se produit un noircissement de la zone joignant le culot à la pente ;
- Si la souche produit du gaz, elle se traduit par la présence de bulles de gaz au niveau du culot (Voir annexe 5).

d. Test uréase

❖ Principe

Ce test se fait sur milieu urée tryptophane, appelé improprement milieu Urée Indole. Le milieu Urée Tryptophane est un milieu synthétique. C'est un milieu complexe qui permet de rechercher l'uréase et l'indole, utiles à l'identification de nombreuses bactéries appartenant aux *Enterobacteriaceae*.

Les bactéries Uréase (+) hydrolysent l'urée en ammoniac, ce qui entraîne une forte alcalinisation du milieu qui sera révélée par un virage de l'indicateur de pH, le rouge de phénol, à sa teinte basique de couleur rouge. (Voir annexe 5).

Uréase



❖ Technique

On ensemence le milieu urée avec l'isolat purifié sur milieu gélosé, puis on incube à 37±1°C pendant 18 à 24 h. L'apparition d'une couleur rouge traduit une alcalinisation du milieu, suite à l'hydrolyse de l'urée et formation de carbonate d'ammonium, la bactérie est Uréase positive. La persistance de la couleur orange montre qu'il n'y a pas eu d'alcalinisation, la bactérie est Uréase négative.

e. Test Indole

❖ Principe

Après addition du réactif de Kovacs, le diméthyl-amino-4-benzaldéhyde contenu dans le réactif de Kovacs réagit avec l'indole produit par l'activité de la tryptophanase, et produit un anneau rouge à la partie supérieure du milieu urée-indole préalablement ensemencé.

❖ Technique

Ajouter une goutte de Kovacs au milieu Urée-indole préalablement ensemencé. Si formation d'un anneau rouge, la bactérie est indole positif. Si absence d'un anneau rouge, elle est indole négatif (Voir annexe 5).

3-1-2-2- Identification de *Pseudomonas*

Pour les BGN oxydase positive, on les cultive sur milieu cétrimide et s'il le faut sur King A et King B.

a. Milieu cétrimide

La gélose au cétrimide est un milieu sélectif, qui permet l'isolement des *Pseudomonas* et notamment de *Pseudomonas aeruginosa*. Ce milieu est relativement pauvre et contient un antiseptique, le cétrimide (bromure de N-cét-N, N, N-triméthylammonium), composé ammonium quaternaire, qui agit comme inhibiteur d'une grande variété de germes, y compris les espèces de *Pseudomonas* autres que *Pseudomonas aeruginosa*.

Ce milieu, proche du milieu King A, favorise aussi la production par *Pseudomonas aeruginosa* de pigments.

La confirmation de *Pseudomonas aeruginosa* se fait sur milieu King A et King B qui favorisent le développement des pigments tels que la pyocyanine et la pyoverdine.

b. Milieux de King

Les milieux King (KingA et KingB) permettent de différencier entre elles les différentes espèces du genre *Pseudomonas* par la mise en évidence de la production de pigments spécifiques.

❖ Principe

L'élaboration des pigments est influencée par la composition du milieu, ce qui justifie l'utilisation de deux milieux différents :

- la production de pyocyanine, due spécifiquement à *Pseudomonas aeruginosa*, est favorisée par la présence d'ions inorganiques. La recherche de la production de pyocyanine est effectuée sur milieu King A ;
- la production de pyoverdine, est favorisée par une teneur élevée en phosphate. La recherche de la production de pyoverdine est effectuée sur milieu King B.

❖ Technique

A partir d'une culture purifiée de bacille Gram négatif oxydase positive, on ensemence la surface du milieu, puis on incube pendant 24 heures à 37°C, voire même de préférence à 42°C (l'incubation à 42°C permet un isolement spécifique de *P.aeruginosa*).

La présence de pigments diffusibles se traduit par l'apparition d'une couleur qui peut diffuser. Ainsi, sur toute la pente, si :

- couleur bleue sur le milieu King A, King A positif, la souche possède la pyocyanine

- couleur jaune-vert fluorescent sur le milieu King B, King B positif, la souche présente la pyoverdine (voir Annexe 5).

3.1.2.3- Identification des Staphylocoques et des Streptocoques

Test catalase

❖ Principe

Certaines réactions métaboliques aboutissent, dans les conditions de l'aérobiose, à la production de peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée ou H₂O₂). Ce composé peut être le produit de la chaîne respiratoire. Cependant, ce peroxyde d'hydrogène doit être éliminé car il est un poison cellulaire. Sa décomposition dans l'organisme microbien peut être réalisée soit par des peroxydases, soit par la catalase (la peroxydase ayant toutefois une activité plus faible). En l'absence de système enzymatique destructeur, la vie en aérobiose devient généralement impossible : les micro-organismes sont alors anaérobies strictes.

La catalase est une enzyme importante. Elle joue un rôle majeur dans l'élimination du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



La plupart des micro-organismes aérobies possèdent une catalase. Parmi les bactéries Gram positif, seules les *Streptococcaceae*, les *Lactobacillus* sont dépourvus de catalase.

Ce test a été appliqué pour les cocci Gram positif, ce qui a permis de différencier entre les *Streptococcus*, les *Micrococcus* et les *Staphylococcus*.

❖ Technique

A partir de la culture purifiée, nous avons prélevé à l'aide d'une pipette pasteur stérile une quantité suffisante de culture, et on l'a mise en suspension dans une goutte d'eau oxygénée. Une réaction positive se traduit par un dégagement gazeux d'oxygène (Voir annexe5).

➤ Identification des Staphylocoques

a- Milieu Chapman-mannité

Le milieu de Chapman est un milieu sélectif, utilisé surtout en microbiologie médicale. Il permet la croissance des germes halophiles, parmi lesquels figurent au premier rang les bactéries du genre *Staphylococcus*, mais aussi les *Micrococcus*, les *Enterococcus*, les *Bacillus*, et de rares bactéries à Gram négatif.

❖ Principe

Ce milieu contient du chlorure de sodium en forte concentration (75 g/l), ce qui permet un isolement sélectif de *Staphylococcus* tolérant les fortes concentrations en NaCl. Cependant, l'identification des *Staphylococcus* a été faite par le test catalase. Ce milieu permet aussi d'étudier la fermentation du mannitol par virage au jaune de l'indicateur coloré, le rouge de phénol, autour des colonies.

❖ Technique

A partir d'une culture purifiée de cocci Gram positif oxydase négative et catalase positive, on ensemence en stries serrés la surface du milieu Chapman manné, puis on incube à 37°C pendant 18-24 heures.

Les colonies mannitol + sont entourées d'une auréole jaune. Les colonies pigmentées en jaunes et mannitol + : forte suspicion de *S. aureus*

N.B : Ne pas confondre la pigmentation des colonies et le virage de l'indicateur coloré (Voir annexe 5).

b- Milieu DNase

❖ Principe

Le milieu gélose à l'acide désoxyribonucléique permet la recherche de l'ADN des bactéries, et particulièrement celle des *Staphylococcus aureus*.

La révélation se fait par l'acide chlorhydrique (1fois normal) qui, une fois appliqué et laissé pénétrer dans le milieu, les microorganismes positifs à la DNase, comme *Staphylococcus aureus*, sont entourés d'une zone claire d'ADN dépolymérisé, tandis que les parties du milieu plus éloignées de la bande d'ensemencement sont opaques et blanchâtres, sous l'effet de l'ADN polymérisé. Les colonies de microorganismes négatifs à la DNase ne présentent pas de zones plus claires en périphérie des colonies. Si la zone autour de la strie est claire, la souche est DNase (+) ; sinon, elle est DNase (-).

❖ Technique

A partir d'une culture purifiée identifiée de *Staphylococcus*, on ensemence par épuisement le milieu Gélosé à l'acide désoxyribonucléique à l'aide d'une anse à fil droit, on incube à 37°C pendant 24 h.

Si après addition de l'acide chlorhydrique, la zone autour de la strie est claire, la souche est DNase (+) (Voir annexe 5).

c- Test coagulase

❖ Principe

Le plasma de lapin est un milieu idéal pour la recherche de la coagulase libre de *Staphylococcus aureus*. La production de la coagulase permet de différencier les souches de *Staphylococcus aureus* des autres souches (*epidermidis*,...).

Les souches de *Staphylococcus aureus* provoquent la coagulation du plasma le plus souvent au cours des 3 premières heures. Dans certains cas, la coagulation est plus légère et plus tardive, mais la réaction ne doit être considérée comme négative que si le phénomène n'intervient pas après la 24ème heure.

❖ Technique

Après une étape d'enrichissement sur milieu BHI de l'inoculum de *Staphylococcus* préalablement identifié et confirmé DNase+, on prélève 0,5 ml de ce dernier, et on l'ajoute à 0,5 ml du plasma de lapin et on incube à 37±1°C pendant 24 h.

Si la coagulation se produit dans les 24 h, la souche de *Staphylococcus* à coagulase positive (voir annexe 5).

➤ Identification des Streptocoques

a- Milieu Slanetz

Le milieu slanetz est un milieu sélectif utilisé pour le dénombrement des entérocoques intestinaux, l'azide de sodium permet d'inhiber la croissance des micro-organismes à Gram

négatif. Le TTC est un indicateur de la croissance bactérienne, Il est réduit un format insoluble à l'intérieur de la cellule.

Cette réaction se manifeste par l'apparition de colonies rouge à marron, qui doivent être considérées comme caractéristiques des Streptocoques intestinaux.

Procéder la confirmation des colonies typique en utilisant une gélose BEA.

b- Milieu BEA

Milieu d'isolement sélectif des bactéries du genre *Streptococcus* appartenant au groupe D et les bactéries du genre *Enterococcus*. L'ensemencement se fait à partir des colonies rouges briques de milieux slanetz en BEA puis incubé à 40 °C pendant 2 h ou plus. la présence (avec noircissement) indique une présomption des bactéries du genre *Streptococcus* appartenant au groupe D et les bactéries du genre *Enterococcus*(uniquement présomption car les milieux ne sont pas sélectifs à 100%), Alors que l'absence indique que les bactéries étudiées ne sont pas des bactéries du genre *Streptococcus* appartenant au groupe D et les bactéries du genre *Enterococcus*.

3-2-Evaluation de l'activité antibactérienne des antibiotiques sur les isolats bactériens

L'étude de la résistance aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de Microbiologie (**CASF M,2014**). Elle a concerné (8) isolats bactériens préalablement identifiés.

❖ Technique

A partir d'une culture pure de 18 h su milieu d'isolement, on racle à l'aide d'une anse de platine quelque colonies bien isolées et parfaitement identiques. Puis, on décharge l'anse dans 3ml de BHI, on homogénéise la suspension bactérienne et on l'incube à 37±1°C pendant 3h. Ensuite, on ensemence par inondation le milieu Muller Hinton. Après une imprégnation de 5 minutes, l'excédent de l'inoculum est éliminé par aspiration. A la surface des boîtes inoculées, on dépose les disques d'antibiotiques commercialisés, contenant une quantité diffusible et on incube à 37±1°C pendant 24±3h et 30±1°C pour les disques d'Oxacilline.

❖ Lecture

On mesure avec précision, les diamètres des zones d'inhibition et on compare les résultats aux valeurs critiques figurant dans la table de lecture (**CASF M, 2014**).

Les résultats de l'antibiogramme utilisé sont décrits en (annexe 4).

4- Outil d'analyse

La saisie et le traitement des données ont été faits à l'aide du programme Excel.

Résultats

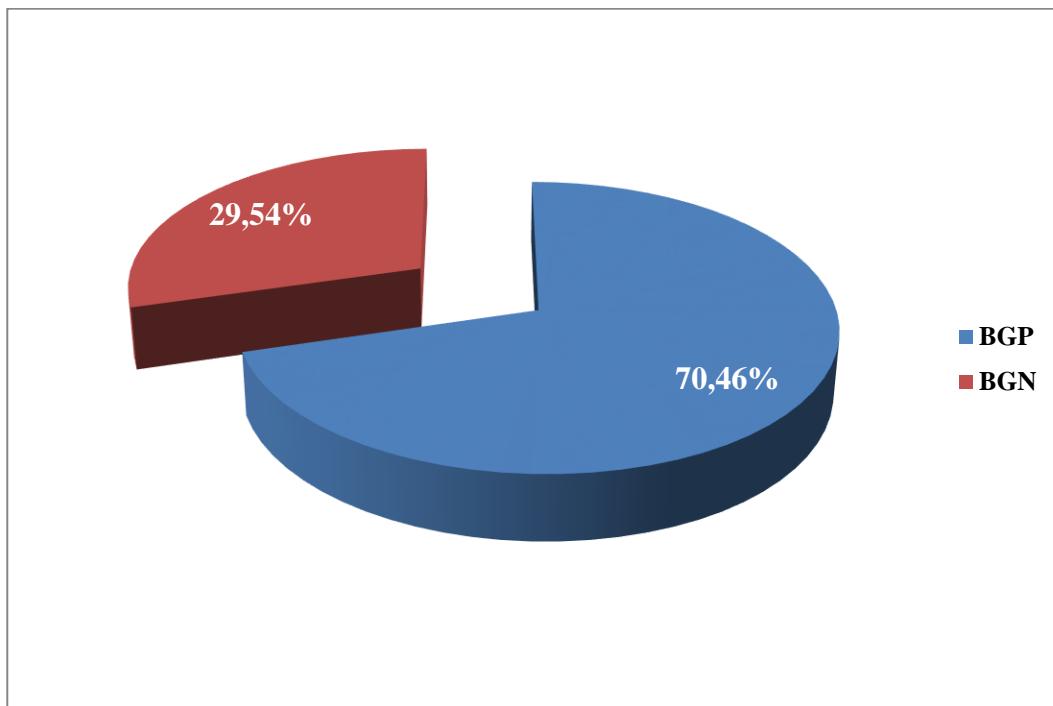
Durant notre étude, nous avons identifié les isolats bactériens retrouvés dans l'environnement d'un service hospitalier, et évalué la sensibilité antibactérienne aux antibiotiques de (8) souches préalablement identifiées.

I- Identification des souches

L'identification a concerné 44 souches dont 28 sont issues des prélèvements de surface et 16 sont issues des prélèvements d'air.

1- Répartition des bactéries en fonction de la coloration de Gram

L'identification par la coloration de Gram des bactéries isolées a montré la présence de 31 bactéries à Gram positif, et de 13 bactéries à Gram négatif. On note une prédominance des Bactéries Gram positif (70,46%) par rapport aux Bactéries Gram négatif (29,54%).



Figure(1) : Répartition des bactéries en fonction de la coloration de Gram

2- Répartition des bactéries en fonction de la coloration de Gram et de la forme

Comme le montre la figure 2, nous avons noté que les Coccis à Gram positif occupent le première rang représentent environ 54,54%, les bacilles à Gram négatif sont présents à une fréquence de 29,53%. La fréquence des bacilles à Gram positif étaient relativement faible de (15,90%).

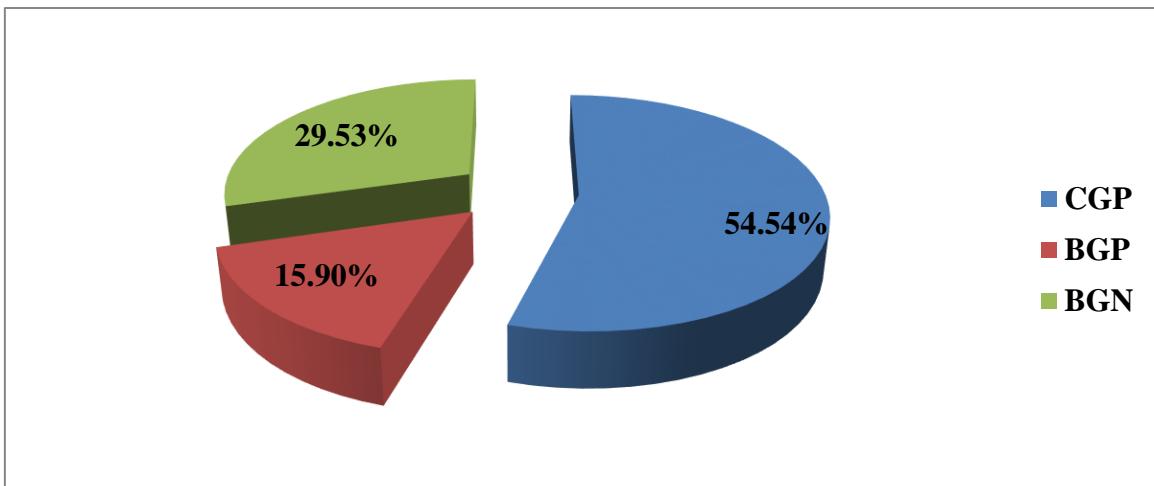
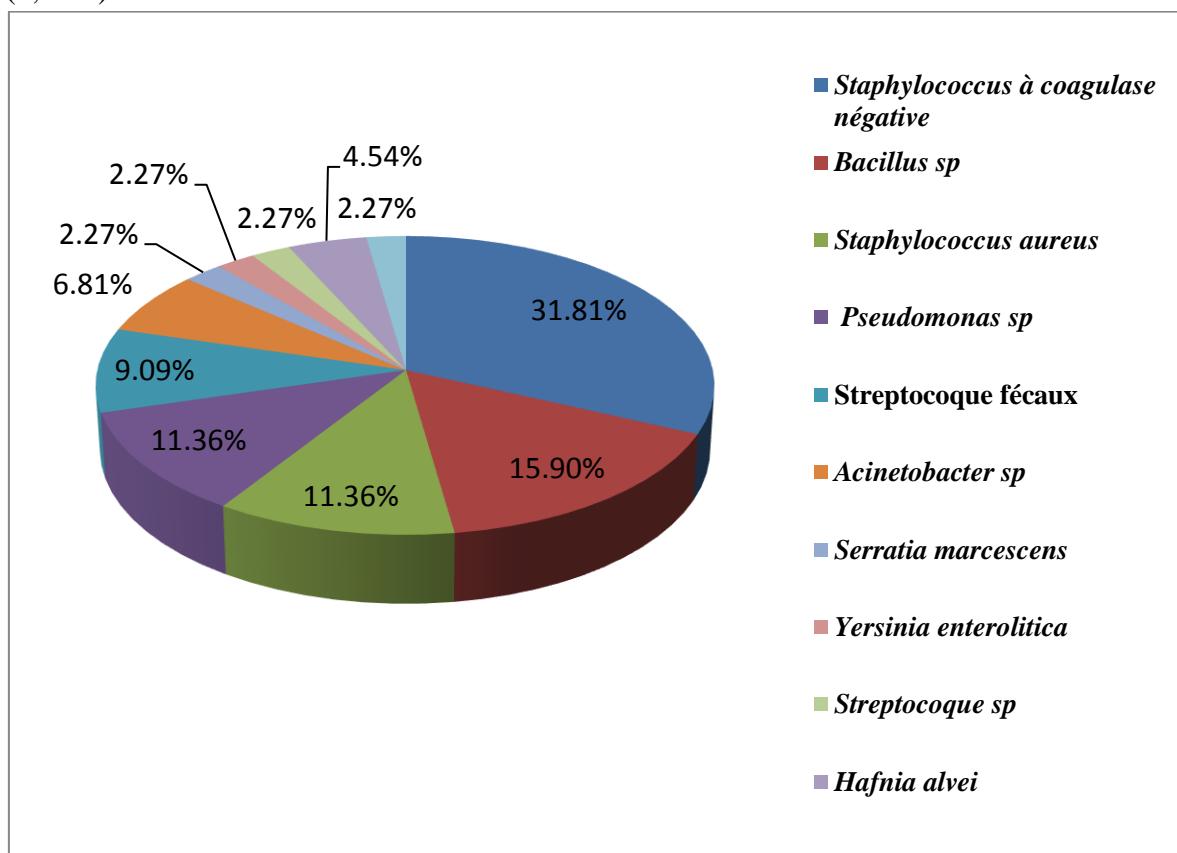


Figure (2) : Répartition des bactéries en fonction de la coloration de Gram et de la forme

3- Identification biochimique des bactéries isolées

L'identification biochimique des bactéries isolées a montré la prédominance des *Staphylococcus* à coagulase négative(31,81%), suivie des *Bacillus sp*(15,90%). Les *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas sp* sont au nombre de 5, soit une fréquence de (11,36%) ; les Streptocoques fécaux sont au nombre de 4, soit une fréquence de (9,09%). Les *Acinetobacter sp* sont au nombre de 3, soit une fréquence de (6,81%) ; *Hafnia alvei* sont au nombre de 2, soit une fréquence de (4,54%), alors que *Serratia marcescens*,*Yersinia enterolitica*,*Streptocoque sp* et *Aeromonas salmonicida* présentent les mêmes fréquences soit de (2,27%).

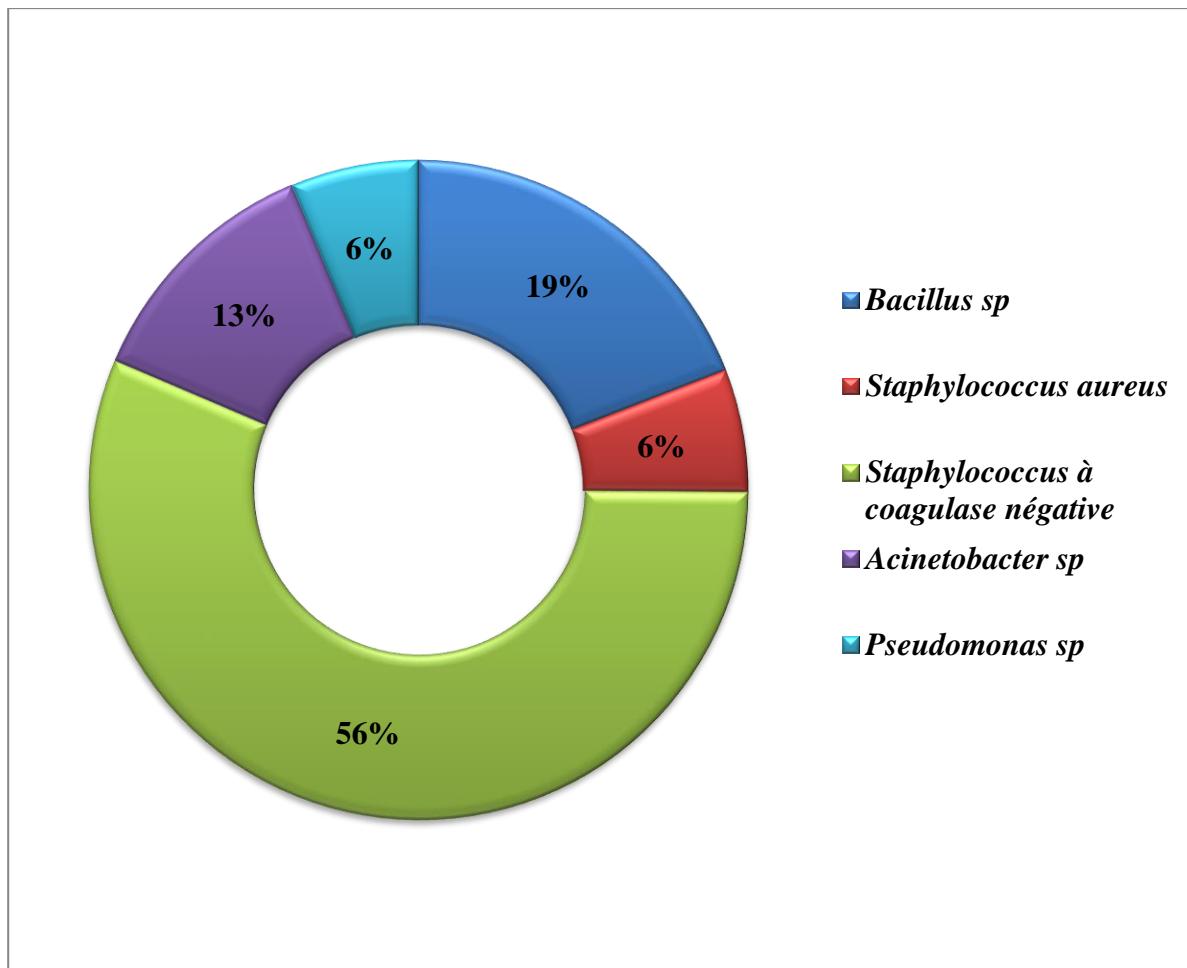


Figure(3) : Identification biochimique des bactéries isolées

4- Répartition des bactéries isolées en fonction de la nature du point de prélèvement

4-1- Bactéries isolées de l'air

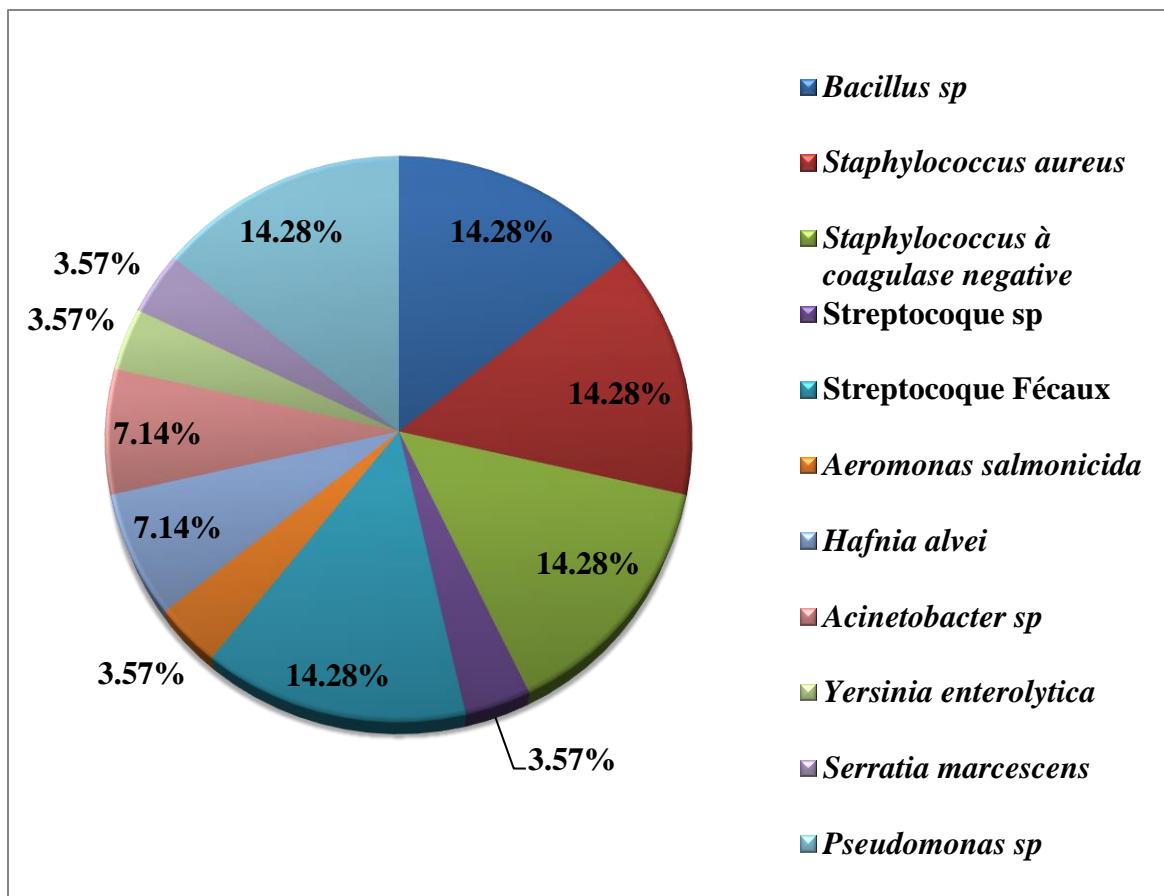
Comme présenté en figure 4, on remarque que les *Staphylococcus* à coagulase négative sont prépondérants dans l'air avec un pourcentage de (56%), suivies par les *Bacillus sp* et l'*Acinetobacter sp*, avec des fréquences respectives de 19% et de 13%. Les *Staphylococcus aureus* et le *Pseudomonas sp* ont été retrouvées à des fréquences plus faibles (6%).



Figure(4) : Répartition des bactéries isoléesde l'air

4-2- Bactéries isolées des surfaces

La répartition des bactéries isolées à partir des surfaces, présenté en figure 5, montre que la surface comporte plusieurs genres de bactéries. Leur identification a révélé la présence à une même fréquence (14,28%) des *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* à coagulase négative, des Streptocoque fécaux, des *Pseudomonas sp* et des *Bacillus sp*. En outre, *Hafnia alvei* et *Acinetobacter sp* ont été retrouvées à une fréquence de 7,14%. *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia enterolitica*, *Serratia marcescens* et les Streptocoque sp ont été notés à une fréquence de 3,57%.



Figure(5) : Répartition des bactéries isolées de la surface

II- Profil d'antibio-résistance des souches vis-à-vis des antibiotiques

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été réalisée sur 8 isolats bactériens qui comprend : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus à coagulase négative*, *Pseudomonas sp*, *Acinetobacter sp*, *Streptocoque sp* et les Entérobactéries. Ces dernières sont représentées par *Hafnia alvei*, *Yersinia enterolitica*, et *Serratia marcescens*.

Le tableau suivant montre le profil de résistance et de sensibilité des isolats vis-à-vis des antibiotiques.

Tableau(2) : Profil de résistance et de sensibilité globale vis-à-vis des antibiotiques

ATB	Streptocoque sp	S. aureus	S à coagulase négative	Acinetobacter sp	Pseudomonas sp	Entérobactéries
<i>Catégorie d'interprétation</i>						
AMP	R	NE	NE	R	R	R
P	R	R	R	NE	NE	NE
TOB	R	R	R	NE	NE	NE
VA	S	R	NE	NE	NE	NE
E	R	S	S	NE	NE	NE
CIP	S	R	S	NE	S	NE
OX	NE	R	NE	NE	NE	NE
CTX	NE	R	R	R	R	R
FD	NE	R	S	NE	NE	NE
MY	NE	R	R	NE	NE	NE
AMC	NE	NE	R	NE	NE	NE
IMP	NE	NE	S	R	S	NE
SXT	NE	NE	NE	R	R	NE
AK	NE	NE	NE	RI	S	NE
CFM	NE	NE	NE	NE	NE	R
FOX	NE	NE	NE	NE	NE	R
CT	NE	NE	NE	NE	NE	R
LEV	NE	NE	NE	NE	NE	S
K	NE	NE	NE	NE	NE	S

S : Sensible

R : Résistante

RI : Résistance intermédiaire

NE : Non effectué

Comme le montre le tableau 2, nous avons constaté que la résistance et la sensibilité bactériennes varie d'une part en fonction de la famille de antibiotiques testés et d'autre en fonction du genre bactérien.

Ainsi, la souche de *Streptocoque sp*, a révélé une résistance élevée à la famille de Béta-lactamines(Ampicilline et Pénicilline), ainsi qu'à la Tobramycine (TOB) et à l'Erythromycine (E). Les quinolones et les Glycopeptides gardent une bonne activité sur ce germe, avec une sensibilité pour la Ciprofloxacine (CIP) et la Vancomycine (VA).

Nous avons également noté une résistance totale de la souche *Staphylococcus aureus* vis à vis de la Pénicilline(P), de l'Oxacilline (OX), de la Tobramycine (TOB), de la Vancomycine (VA), du Cefotaxime CTX), de l'Acide Fusidique(FD), de la Lincomycine (MY) et de la Ciprofloxacine (CIP). Sauf l'Erythromycine(E) qui a montré une efficacité sur cette bactérie.

La souche de *Staphylococcus* à coagulase négative est très sensible à la plupart des antibiotiques tels que l'acide Fusidique (FD), la Ciprofloxacine (CIP),l'Imipénème (IMP) et à l'Erythromycine (E). Cependant, elle a montré une résistance à la famille de Béta lactamines (AMC et P), à la Tobramycine (TOB), au Cefotaxime (CTX), et au Lincomycine (MY).

Nous avons remarqué que la souche d'*Acinetobacter sp*, était insensible à la plupart des antibiotiques comme (SXT, AMP, CTX, IMP). Elle a aussi présenté une résistance intermédiaire pour l'Amikacine (AK).

Concernant la souche *Pseudomonas sp*, elle a révélé une résistance à l'Ampicilline (AMP)au Sulfaméthoxazole+Triméthoprime(SXT) et au Cefotaxime (CTX). Cependant, cette souche reste sensible à l'Imipénème (IMP),à la Ciprofloxacine (CIP) et à l'Amikacine(AK).

Nous avons noté que les Entérobactéries présentent une résistance élevée vis-à-vis de la famille de Céphalosporines y compris (CTX, CFM, FOX), ainsi que pour la Colistine (CT) et l'Ampicilline (AMP). Cependant, une sensibilité globale face au Lévofloxacine (LEV) et à la Kanamycine (K) est notée.

La résistance globale des souches testées était élevée vis-à-vis de la famille de Beta-lactamines y compris (P, AMP, AMC, OX), les Céphalosporines y compris (FOX, CTX, CFM), les Lincosamides et les Sulfamides. Les quinolones et les glycopeptides gardent une bonne activité sur les souches testées.

Discussion

La part des infections nosocomiales liées à une contamination d'origine environnementale est difficile à apprécier et l'importance du contrôle microbiologique demeure controversée. Toutefois, les recommandations internationales reconnaissent aujourd'hui les intérêts multiples de la surveillance microbiologique de l'environnement dans la prévention des infections nosocomiales, à savoir : la prise en considération de la contamination des surfaces et la recherche des réservoirs microbiens à l'origine des cas groupés d'infections ou d'épidémies (**BERRADA S.*et al*, 2017**).

Dans ce cadre et suite aux contrôles de l'environnement d'un service hospitalier, nous avons réalisé ce travail afin d'identifier les germes isolés et d'évaluer leur activité antibactérienne vis-à-vis des antibiotiques.

L'identification a porté sur 44 souches bactériennes dont 28 ont été retrouvées au niveau des surfaces et 16 au niveau de l'air. Leur répartition par coloration de Gram a montré une prédominance des Bactéries Gram positif (70,46%) par rapport aux Bactéries Gram négatif (29,54%). Ce résultat est en accord avec des études antérieures (**SAOUIDE EL AYNE N *et al*, 2014 ;BERRADA S.*et al*, 2017**), mais diffère du profil bactériologique signalé à Abidjan par **MEITE S.*et al*, (2010)**.

La répartition des Bactéries selon la forme et la coloration de Gram a révélé la prédominance des cocci à Gram positif par rapport aux bacilles à Gram négatif, ces résultats se rapprochent à ceux enregistrés par d'autres auteurs (**EL RHAZI K.*et al*, 2007 ; REBAIAHI S-A.*et al*, 2014**).

La prédominance des BGP par rapport aux BGN pourrait être expliquée par la capacité de ces germes à résister aux conditions hostiles comme la dessiccation. L'environnement hospitalier constitue en effet un réservoir pour les bactéries à Gram positif, très largement dispersées par l'activité humaine (**BERRADA S, 2016**).

L'identification biochimique des Bactéries isolées a révélé la prédominance des *Staphylococcus* à coagulase négative avec un pourcentage de (31,81%), ces résultats se rapprochent à celui obtenu par (**EL KHADER M, 2011**).

La mise en évidence d'un pourcentage élevé des bactéries issues de la flore cutanée reflète une activité humaine intense dans les locaux des services hospitaliers.

Parmi les bactéries retrouvées au niveau de l'air, les cocci à Gram positif sont les plus fréquemment rencontrées, avec une représentativité importante pour les *S.non aureus*, soit une fréquence de 56%. Ce résultat ne concorde pas à celui trouvé par **MARCILA *et al* (2012)** Ces auteurs n'ont pas trouvé ce genre de bactéries.

L'identification bactériologique des souches isolées de la surface a montré la présence d'une flore diversifiée. La présence de bactéries à Gram positif est notée. Les *S. aureus*, les *S. non aureus*, les Streptocoques fécaux, les *Bacillus sp* et les *Pseudomonas sp* ont été isolées à une fréquence (14,28%). *Hafnia alvei* et *Acinetobacter sp* ont été retrouvées à une fréquence de 7,14%. *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia enterolitica*, *Serratia marcescens* et les Streptocoque sp ont été notés à une fréquence de 3,57%. Ces résultats diffèrent de ceux trouvés par **SAOUIDE EL AYNE. N. et al (2014)**. Ces auteurs avaient trouvé la prédominance de *Bacillus* (27%), et ont pu isolés d'autres genres d'Entérobactéries tels que *Enterobacter cloacae* et *Proteus vulgaris*.

L'activité antimicrobienne des antibiotiques a été testée sur 8 souches bactériennes préalablement identifiées. Nous avons remarqué une résistance très élevée pour la majorité des antibiotiques testés. Nous avons aussi noté que la résistance varie d'un genre bactérien à l'autre et d'un antibiotique à l'autre.

Pour le Streptocoque *sp*, nous avons noté une résistance pour l'AMP, la P, la TOB et à l'E et une sensibilité pour la VA et la CIP. Ce résultat se rapproche à celui noté par (**BERRADA S., 2016**).

Pour le *Staphylococcus aureus*, nous avons noté une résistance vis-à-vis de la plupart des Antibiotiques (P,OX,TOB,VA,CIP,CTX,FD,MY)et une sensibilité seulement pour l'E. Ces résultats sont semblables à ceux mentionnés par (**REBIAHI S-A.et al,2014**).

Le *S.non aureus* présente une résistance face à certains antibiotiques testés (AMC,P,TOB,CTX, MY) et une sensibilité à la CIP, l'E, l'IMP et à l'FD. Ce résultat est similaire à celui obtenu par **BERRADA S. (2016)**.

Les Entérobactéries ont présenté une résistance pour (CTX,CFM,CT,FOX,AMP) et une sensibilité pour(K et LEV). Ces résultats se rapprochent de ceux trouvés par d'autres auteurs (**AMARA I.et al ,2015 ; BERRADA S., 2016**).

Concernant *Pseudomonas sp*, il était sensible à (IMP, AK, CIP), mais résistant aux (AMP,SXT,CTX). Ce résultat rappelle celui trouvé par **CHABLOU M. (2011)**.

Acinetobacter sp possède une résistance élevée pour (AMP, CTX, SXT, IMP). Sa résistance est intermédiaire face à l'AK. Ces résultats sont concordants à ceux obtenus par (**CHABLOU.M, 2011**).

La multi résistance bactérienne aux antibiotiques que nous avons notée pourrait être liée à l'utilisation extensive des antibiotiques couplées à un déséquilibre dans l'hygiène hospitalière traduisent par une évolution abusive de ces infections (**AMARA I. et al, 2015**).

Cette multi résistance impose la prise de conscience dans l'immédiat pour protéger les antibiotiques et prévenir les échecs thérapeutiques des infections par la tenue d'une politique de gestion des antibiotiques visant l'utilisation prudente et contrôlée dans tous les secteurs (**BERRADAS., 2016**).

Conclusion, recommandations et perspective

➤ En guise de ce travail, nous pouvons conclure que :

- L'environnement hospitalier est contaminé par une multitude de germes pathogènes et opportunistes tels que *S.aureus*, *Staphylococcus* à coagulase négative, Streptocoque fécaux, *Pseudomonas sp*, *Bacillus sp*, *Acinetobacter sp*, *Hafnia alvei*, *Serratia marcescens*, *Yersinia enterolitica*, *Aeromonas salmonicida* ;
- Les germes isolés ont montré une multi résistance à la plupart des antibiotiques (AMP, P, TOB, OX, CTX, MY, AMC, SXT, CFM FOX, CT) ;
- Les quinolones et les glycopeptides gardent une bonne activité sur les souches testées.

➤ Suite à ce travail, et afin de réduire les infections nosocomiales et notamment celles des bactéries multi-résistantes, il serait recommandé d'agir à plusieurs niveaux :

- Sensibiliser le personnel et les patients sur le respect des bonnes pratiques d'hygiène,
- Développer de nouveaux antibiotiques,
- Rechercher des procédés de lutte contre certaines espèces bactériennes,
- Consolider l'éducation et la formation des professionnels et des usagers des antibiotiques.

➤ En perspective, il serait intéressant d'évaluer l'action antibactérienne de molécules naturelles sur les germes isolés.

Annexes

Annexe 1 : Composition, préparation et contrôle qualité des milieux de culture utilisés

1- Composition et contrôle qualité des milieux de culture

Les formules de chaque milieu sont données en gramme par litre d'eau distillée.

Les milieux qui sont préparés sont tous stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 20 min

❖ Milieu PCA

Tryptone	5.0
Extrait autolytique de levure	2,5
Glucose	1.0
Agar	15.0

pH du milieu : 7,0 +/- 0,2

❖ Milieu BHI

Infusion cœur-cervelle (matières solides)	8.0
Digestion peptique de tissu animal	5.0
Digestion pancréatique de caséine	16.0
Chlorure de sodium	5.0
Glucose	2.0
Phosphate d'hydrogène disodique	2.5
Gélose	13.5

pH du milieu : 7.4±0.2

❖ Gélose à l'ADN

Hydrolysat trypsique de caséine	20.0
ADN	2.0
Chlorure de sodium	5.0
Agar	12.0

pH du milieu : 7.3

❖ Chapman mannité

Peptone	10.0
Extrait de viande de bœuf	1.0
Chlorure de sodium	75.0
Mannitol	10.0
Rouge de phénol	0.025

Agar	15.0
------	------

pH du milieu : 7.4

King A

Peptone dite A	20.0
Glycérol	10.0
Sulfate de potassium	10.0
Chlorure de magnésium	1.4
Agar purifié	12.0

pH du milieu : 7.2

❖ King B

Peptone dite B	20.0
Glycérol	10.0
Hydrogénophosphate de potassium	1.5
Sulfate de magnésiumheptahydraté	1.5
Agar purifié	12.0

pH du milieu : 7.2

❖ HajnaKligler

Extrait de viande de bœuf	3.0
Extrait de levure	3.0
Peptone (riche en lysine)	20.0
NaCl	5.0
Citrate ferrique	0.3
Thiosulfate de sodium	0.3
Lactose	10.0
Glucose	1.0
Rouge de phénol	0.024
Agar	12.0

pH du milieu : 7.5±0.2

❖ Plasma de lapin

Peptone de viande	4.0
Peptone de gélatine	1.0
Extrait de viande	2.0
Chlorure de sodium	5.0

pH du milieu : 7.0±0.

❖ Milieu urée-indole

L-Tryptophane	0.3g
KH ₂ PO ₄	0.1g
KHPO ₄	0.1g
NaCl	0.5g
Urée	2.0g
Alcool à 95°	1.0ml
Rouge de phénol à 1%	0.25ml
Eau distillée	100ml

Afin d'avoir des résultats fiables, nous avons procédé à un contrôle qualité de tous les paramètres (milieux de cultures, mesure Température des étuves et des réfrigérateurs, contrôle de la qualité de la verrerie et du consommable utilisé).

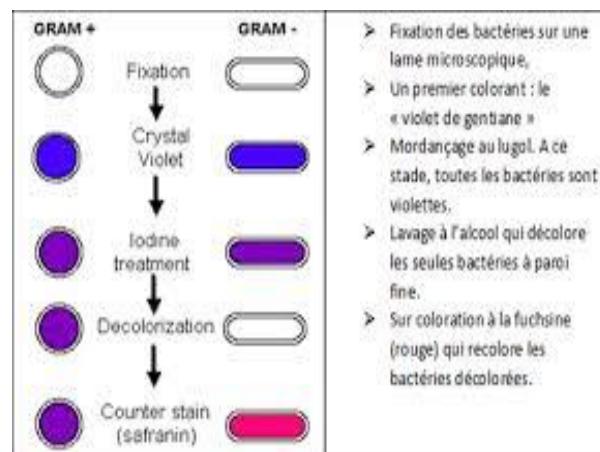
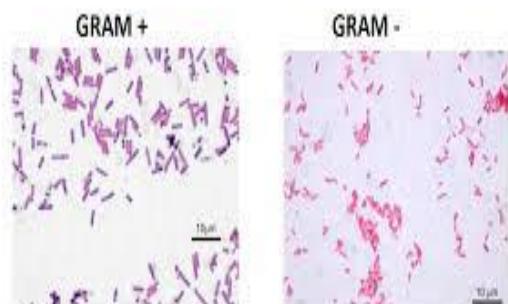
2- Contrôles qualité des milieux de cultures

Ce contrôle est basé sur les manipulations suivantes :

- Effectuer un calibrage de la balance,
- Utiliser une eau distillée préalablement contrôlée (pH, conductivité, ...),
- Préparer les milieux de cultures dans un champ stérile, à côté d'un béc benzène,
- Utiliser une verrerie contrôlée,
- Dissoudre complètement les composants du milieu préparé,
- Respecter la durée et le temps d'autoclavage,
- Contrôler le niveau d'eau de l'autoclave avant utilisation,
- Contrôler l'efficacité de l'autoclave à chaque stérilisation par le ruban indicateur et mensuellement par l'indicateur biologique (Stérikon),
- Couler les milieux stérilisés dans un champ stérile,
- Contrôler la stérilité du milieu préparé avant utilisation, par incubation d'une boîte si milieu solide ou d'un tube si bouillon à l'étuve à 36±2°C pendant 48H.

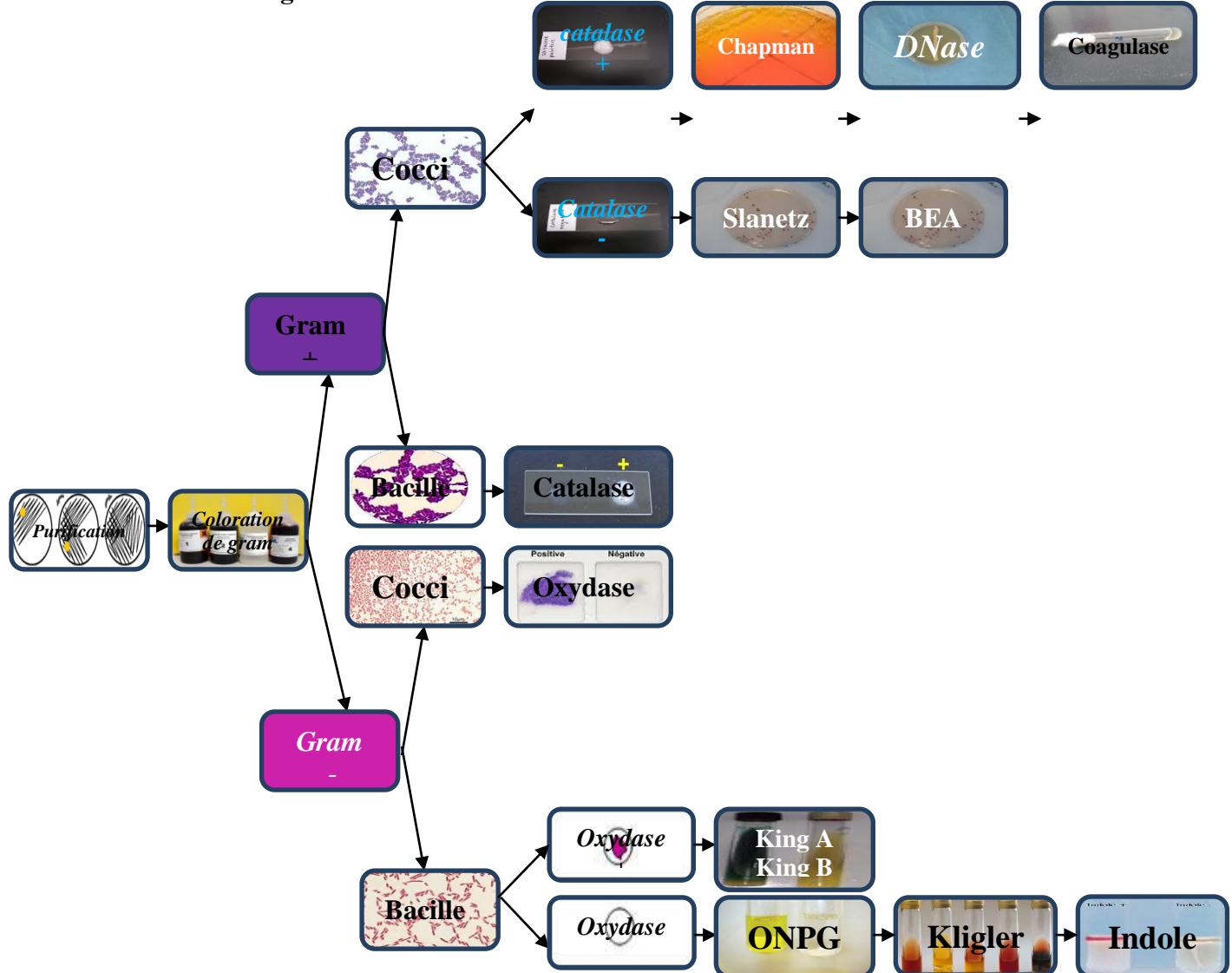
Annexe 2 : Identification bactériologique

1- Coloration de Gram

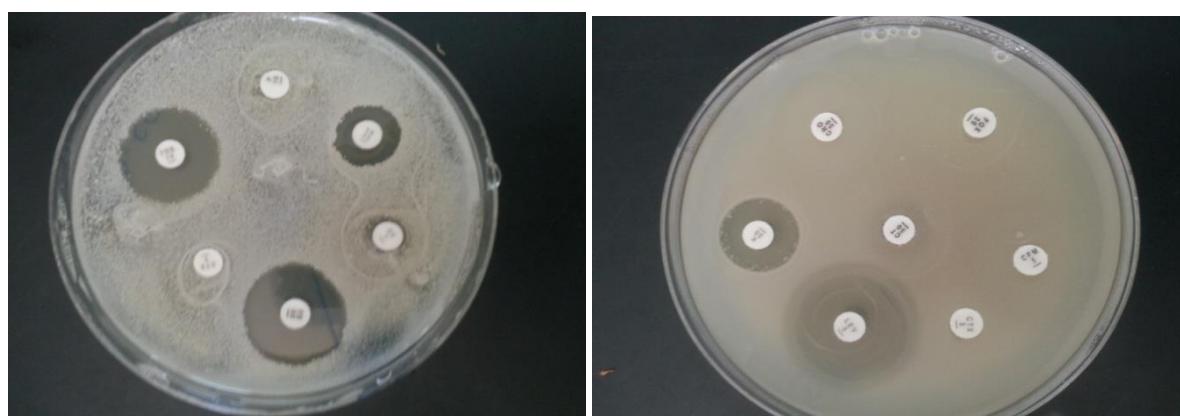


Annexe 3 : Identification biochimique et lecture des résultats

1- Schéma générale d'identification



Annexe4 : Lecture de l'antibiogramme



Annexe 5 : Identification biochimique

1-Test oxydase



2- Test de la catalase



3- TEST ONPG



Test ONPG - Test ONPG+

4- Milieu lactose-glucose-H₂S (Kligler-Hajna)



5- Test indole



Indole - Indole+

6- Milieux de King

King A	King B	King A	King B	King A	King B
Production de pyocyanine et pyoverdine	Production de pyoverdine uniquement			Pyocyanine - et pyoverdine -	

7- Milieu Chapman mannéité



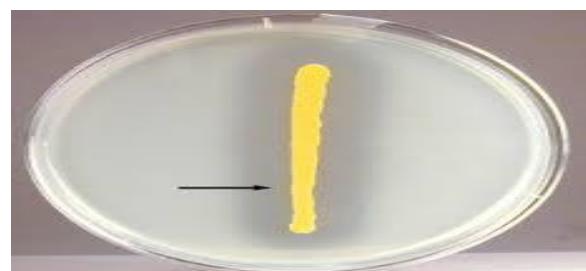
Milieu Chapman avant utilisation

Milieu Chapman positif

8- Recherche de la DNase



DNasenégatif



DNase positif

9- Test coagulase :



Coagulase négative



Coagulase positive

Références bibliographiques

- **Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments**, 2009.Risques liés à la présence de Moisissures et levures dans les eaux conditionnées.
- **AMARA I., KHALDI Z.**, 2015. isolement, identification et étude de l'antibiorésistance des souches bactériennes isolées à partir de service du réanimation et d'hémodialyse de CHU, Projet de fin d'étude pour l'obtention d'un Master à la Faculté de OUARGHA.
- **AMRANIJ**. Résultats de l'enquête de prévalence des infections nosocomiales au niveau de 24 hôpitaux. Ministère de la Santé, 1994. Rabat.
- **BENSLIMANI A.**,2008. Infection nosocomiales, Faculté de Médecine d'Alger, Algérie.
- **BERRADA S.**, 2016. Gestion du risque infectieux en hémodialyse par la mise en place d'une démarche qualité : Cas du centre d'hémodialyse de l'hôpital Al Ghassani. Thèse de Doctorat. Faculté des Sciences Dhar El Mehraz. Fès
- **BERRADA S., BENJELLOUN TG., BENNANI L., DIARRA A.S., OUMOKHTAR B., EL OUALI L.A., SQUALI H.F.Z., SQALLI H.T**, 2017. Exploration microbiologique des surfaces d'un centre d'hémodialyse de la ville de Fès : étude descriptive transversale. Revue francophone internationale de recherche infirmière. Sous presse.
- **CHABLOU M.**, 2011.Les infections nosocomiales au service de réanimation polyvalente de Fès. Thèse pour obtention de doctorat en médecine, Faculté de médecine et de pharmacie.
- **Comité Technique National des Infections Nosocomiales**, 2002. Surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé DGS/DHOS :Ministère chargé de la santé.
- **Comité de l'antibiogramme de la Société française de Microbiologie**, Recommandations, 2014.
- **CONDAIR**, 2008. Analyse de la qualité de l'air intérieur, France.
- **DUCEL G., FABRY J., NICOLLE L**, 2002. Prévention des infections nosocomiales, Guide Pratique.
- **EL KHADER M**, 2011. Surveillance Microbiologique des Surfaces de l'hôpital d'IBN KHATAB de Fès et étude de l'effet des huiles essentielles sur les souches hospitalières, Projet de fin d'étude pour obtention de Master à la Faculté des sciences et techniques.
- **EI RHAZI K., ELFAKIR S., BERRAHO M., TACHFOUTI N., SERHIER Z., KANJAA C.,NEJJARI1C**,2007.Prévalence et facteurs de risque des infections nosocomiales au CHU Hassan II de Fès (Maroc). La Revue de Santé de la Méditerranée orientale (Vol. 13), N°1, page 58.
- **GUIRAUD J.P**, Juillet2006.Microbiologie alimentaire, Analyse microbiologique des aliments, p 343-344.

- **IDRISSI OUADGRIRI A**, 2011.Surveillance microbiologique des dispositifs médicaux couveuses et endoscopes, Mémoire de fin d'étude à la Faculté des sciences et techniques de Fès.
- **Institut de Recherche Appliquée au Contrôle de Qualité**, 2013.
- **Institut National de santé Publique du QUEBEC**, 2002.les risques à la santé associés à la présence de Moisissures en milieu hospitalier intérieur.
- Institut Pasteur de MADAGHASCAR,2005. Recommandations sur les prélèvements d'échantillon en vue d'une analyse microbiologique.
- **LANGLOIS J**, 2000.Les infections nosocomiales et les infections a l'occasion des soins hors de l'hôpital, rapport adopté lors de la session du conseil national des médecines.
- **LEMARIEC., RAMONT C., BREJON V., BARBUT F**, 2013.Dépistage aux contrôles environnementaux.
- **MARCILA S., KABBAJA H., CHERKAOUIA O., NADAHA M., ALAOUIA A.E., SEFFAR M**, 2012. Endophtalmies bactériennes : étude rétrospective clinique et microbiologique à l'hôpital des spécialités de Rabat.
- **MATHILDE V.**, 2008.Qitterie DES Jonqueures.Cntrôle de la qualité de l'air en salle propre.
- **MEITE S., BOAI C., MONEMO P., TANOA M., FAYE6 KEITT2 H., DOSSO H.**, 2010. Surveillance microbiologique des surfaces au niveau d'un établissement Hospitalier ; de niveau tertiaire ; exemple CHU de YOUNGON, ABIDJAN, Code d'ivoire.
- **OMS, 2009.** Manuel D'hygiène Hospitalière Et De Prévention Des Infections Nosocomiales. Royaume du Maroc Ministère de la Santé.
- **REBIAHI S-A., RAHMOUN M., SEDDIKI S,M,L., KDI K., BELHADJI F., CHABNI N., KUNKEL D**, 2014.Infections nosocomiales causées par *Staphylococcus aureus* producteur de biofilm dans l'unité de néonatalogie de Tlemcen.
- **SAOUIDE AL AYNE N., ECHELH A., CHAOUCH A., AUJJAR N., HAMAMA S.**, 2014.rôle de l'environnement hospitalier dans la prévention des infections nosocomiales : surveillance de la flore des surfaces a l'hôpital EL Idrissi de Kenitra ;
- **SELLAMI A., SELLAMI H., HAKMI F., BAHLOUL M., CHEIKH F**, 2006. La condidurie en milieu de réanimation, signification et intérêt de la numération des levures dans les urines, p 584-588.