

Liste des abréviations

IN	:	Infection Nosocomial.
IAS	:	Infections Associées Aux Soins.
CHU	:	Centre Hospitalier Universitaire.
DM	:	Dispositif Médical.
MO	:	Micro-organisme.
BMR	:	Bactérie Multi-Résistante.
SARM	:	<i>Staphylococcus Aureus</i> Résistant à la Meticilline.
BLSE	:	β-lactamase à Spectre Etendu.
CSP	:	Code de la Santé Publique.
CLIN	:	Comités de Lutte contre les Infections Nosocomiales.
PCA	:	PCA standard (<i>Plate Count Agar</i>)/ La gélose pour dénombrement.
UFC	:	Unité Formant Colonie.
BHI	:	Bouillon cœur cervelle.
CTINILS	:	Comité Technique des Infections Nosocomiales et des Infections Liées aux Soins.

SOMMAIRE:

Introduction générale 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I-INFECTIONS ASSOCIEES AUX SOINS (IAS):

1. Définition d'une infection associée aux soins (IAS)	2
2. Les causes des infections nosocomiales (IN)	2
a. Présence de germes en milieu hospitalier	2
b. Modes de contamination	3
c. Etat du malade:	3
3. Fréquence des infections nosocomiales au Maroc et principales bactéries impliquées:.	4
4. La prévention des IAS:	4

II- DISPOSITIFS MEDICAUX (DM):

1. Définition:.....	5
2. Classification des dispositifs médicaux	5
3. Gestion de l'entretien du matériel et opérations de traitement des DM	5
a. Dispositif médical à usage unique	6
b. Dispositif médical à usage multiple	6

III- LES COUVEUSES

1. Définition	6
2. Les fonctions de la couveuse.	7
a. Protection contre les infections.	7
b. Les paramètres qui sont prises en compte par l'appareil sont	7
3. Les types d'incubateurs	8
a. les incubateurs radiant pour la réanimation intensive	8
b. Les incubateurs fermés en soins intensifs, en maternité et en pédiatrie	8
4. Entretien des incubateurs,	8
a. L'entretien quotidien de l'incubateur	9
b. Entretien hebdomadaire ou entre deux enfants	9

IV- LES ENDOSCOPES:

1. Définition des endoscopes	9
2. Les infections nosocomiales liées aux endoscopes	10
a. Contamination d'endoscope suite à une mauvaise désinfection	10
b. Les types de contamination	10
3. Protocole de désinfection des endoscopes	11
4. Le contrôle microbiologique en endoscopie	11
a. Moment de prélèvement	12
b. Critère d'interprétation	12

MATERIEL ET METHODES:

1. Présentation de l'étude	13
2. Service de Néonatalogie et de Réanimation néonatale	13
a. moment de prélèvements	13
b. localisation des prélèvements	13
c. Technique de prélèvement	14
d. Technique d'Analyse de la surface des couveuses	14
e. Technique d'Analyse de l'eau du réservoir	14
3. Service des Explorations fonctionnelles	14
a. moment des prélèvements	15
b. localisation des prélèvements	15
c. Solution des prélèvements	15
d. Technique des prélèvements	15
e. Technique d'Analyse des prélèvements des endoscopes	16
f. Technique d'analyse de l'eau de rinçage	16
4. Identification biochimique des bactéries	17
a. Coloration de gram	17
b. Test d'oxydase	17
c. Test catalase:	18
d. Fermentation du glucose.....	18
e. Recherche d'uréase	19
f. Production d' indole	19
g. Test RM (au rouge de méthyle).	19

h. Milieu citrate de simmons:	20
i. Identification par Galerie Api 20E:	20
5. Antibiogramme:	22

RESULTATS ET DISCUSSION:

1. Résultats des prélèvements des couveuses:	24
a. Niveau de contamination des surfaces des couveuses:	24
b. Fréquence des bactéries isolées à partir des surfaces des couveuses:	25
c. Niveau de contamination de l'eau du réservoir des couveuses:	26
d. Fréquence des bactéries isolées à partir de l'eau du réservoir des couveuses:	26
e. Niveau de contamination de l'eau distillée dans les bidons de stocke:	27
f. Résultat de l'antibiogramme:	27
2. Discussion:	29
3. Résultats des prélèvements d'endoscopes:	29
a. Les endoscopes digestifs:	29
b. Les endoscopes bronchiques:	30
4. Discussion:	31
Conclusion:	32

Introduction générale

La surveillance microbiologique des dispositifs médicaux dans les établissements de santé est un sujet qui s'intègre dans l'actualité de la prévention des infections nosocomiales. La maîtrise du matériel médical devrait être basée sur des actions bien ciblées ayant démontré leur pertinence et leur impact sur la diminution des infections nosocomiales. Les contrôles microbiologiques de l'environnement sont un des outils de mesure qui permettent d'évaluer une situation de départ et l'efficacité des mesures correctives.

À l'hôpital, les surfaces susceptibles d'entrer en contact avec le patient soit directement, soit indirectement par l'intermédiaire de dispositifs médicaux ou les mains des personnes peuvent constituer des réservoirs microbiens. Les dispositifs médicaux constituent une aide précieuse, pour la prise en charge des patients. Leur utilisation est beaucoup plus répandue que l'on ne peut l'imaginer. Pourtant, ils sont fragiles et complexes et leur caractère, en particulier invasif, peut conduire à des infections nosocomiales.

Dans ce travail, nous avons choisi de travailler sur deux types de dispositifs médicaux qui diffèrent par leur utilisation mais aussi par le niveau du risque infectieux associé à cette utilisation. D'une part, les endoscopes qui sont des dispositifs médicaux dont le nettoyage et la désinfection peuvent poser des problèmes en raison de leurs conduits longs et étroits, leur structure interne complexe, etc. Et d'autre part, les couveuses qui sont utilisées en pratique courante dans les services de Réanimation Néonatale chargées de recevoir les prématurés et les nouveaux nés. Ils sont considérés comme des instruments à risques, abritant des patients fragiles et recevant des soins intensifs et invasifs.

La maîtrise des procédures de nettoyage-désinfection et/ou de bionettoyage contribue certainement à la prévention de l'infection nosocomiale liée à l'environnement et à la diffusion des bactéries multirésistantes (BMR) par transmission croisée de patients à patients.

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'efficacité des procédures de nettoyage-désinfection des endoscopes et des couveuses. Nous avons réalisé plusieurs prélèvements sur les surfaces des couveuses dans le service de néonatalogie et de réanimation néonatale, sur des endoscopes bronchiques et sur des endoscopes digestifs, dans le service des explorations

fonctionnelles du Centre Hospitalier Universitaire Hassan II de Fès. Ceci devrait contribuer à la validation des procédures et au repérage d'une situation potentiellement à risque infectieux.

I-INFECTIONS ASSOCIEES AUX SOINS (IAS):

Le terme des infections nosocomiales (IN) a été actualisé en novembre 2006 et elle est désormais intégrée dans les infections associées aux soins (IAS), cette modification a pour objectif de départager les fonctions dues aux soins.

Le problème de l'infection nosocomiale demeure un problème de santé publique important. D'après certaines études, la fréquence de l'infection au niveau hospitalier est alarmante, elle varie de 4,9% à 8,5% dans les pays européens et de 10% au Maroc selon une étude de prévalence réalisée dans huit hôpitaux universitaires de Rabat [1]. C'est ce qui justifie la priorité nationale de la lutte contre l'infection.

2. Définition d'une infection associée aux soins (IAS)

Une infection est dite associée aux soins, si elle survient au cours ou en dehors d'une prise en charge (diagnostique, thérapeutique, palliative, préventive ou éducative) d'un patient. Si l'infection n'est ni présente, ni en incubation au début de la prise en charge; lorsque l'état infectieux n'est pas connu précisément, ou survient au début de la prise en charge, dans un délai d'au moins 48 heures, ou un délai supérieur à la période d'incubation est couramment accepté pour définir une IAS.

Concernant les infections du site opératoire, on considère habituellement comme associées aux soins les infections survenant dans les 30 jours suivant l'intervention ou mise en place d'une prothèse ou d'un matériel prothétique dans l'année qui suit l'intervention. Toutefois, et quel que soit le délai de survenue, il est recommandé d'apprécier dans chaque cas la plausibilité de l'association entre l'intervention et l'infection, notamment en tenant compte du type de germe en cause [2].

3. Les causes des infections nosocomiales (IN)

L'apparition d'une infection nosocomiale dépend de nombreux facteurs [3]:

a . Présence de germes en milieu hospitalier:

❖ Les patients et le personnel constituent une importante source de germes. C'est bien normal, car tout être humain est porteur d'un grand nombre de germes, dont certains sont bénéfiques pour la santé comme les bactéries présentes dans l'intestin qui aident à la digestion.

- ❖ L'air, l'eau, l'alimentation contiennent des germes qui ne sont pas dangereux dans les conditions normales, mais peuvent provoquer des infections chez les patients fragiles adultes ou prématurés, ou bien lorsque ces germes sont introduits directement à l'intérieur du corps suite à une opération chirurgicale. L'environnement représente une source de germes, mais ceux-ci sont moins fréquemment mis en cause.
- ❖ Le matériel de soins et les surfaces sont recouverts naturellement de nombreux microbes et peuvent être aussi contaminés par les germes présents sur les mains et la bouche des personnes [3].

d. Modes de contamination:

Il existe plusieurs types d'infections nosocomiales relevant de modes de transmission différents [4]:

- Les infections d'origine «**endogène**»: le malade s'infecte avec ses propres micro-organismes, à la faveur d'un acte invasif et/ou en raison d'une fragilité particulière.
- Les infections d'origine «**exogène**»: Il peut s'agir d'infections croisées, transmises d'un malade à l'autre par les mains ou les instruments de travail du personnel médical ou paramédical, d'infections provoquées par les germes du personnel ou d'infections liées à la contamination de l'environnement hospitalier (eau, air, matériel, alimentation...). Il faut noter que le personnel peut lui aussi être facilement contaminé par ces microorganismes du fait de son travail, ce qui impose de sa part des précautions à prendre.

e. Etat du malade:

Quel que soit son mode de transmission, l'apparition d'une infection nosocomiale est favorisée par la situation médicale du patient [3]:

- **Son âge et sa pathologie:** les personnes âgées, les immunodéprimés, les nouveaux nés, en particulier les prématurés, les polytraumatisés et les grands brûlés sont particulièrement réceptifs.
- **Certains traitements** comme les antibiotiques qui déséquilibrent la flore des patients et sélectionnent les bactéries résistantes, les traitements immunosuppresseurs.
- **La réalisation d'actes invasifs** tels que la pose d'une perfusion, d'une sonde urinaire, les opérations chirurgicales nécessaires au traitement du patient.

Ceci explique que les infections sont plus fréquentes dans les services de réanimation (néonatale et adulte) où les patients déjà fragilisés par leur maladie, sont ventilés, sondés,

perfusés, plutôt qu'en médecine interne où les actes invasifs sont moins fréquents et où les patients accueillis sont généralement moins fragiles.

4. Fréquence des infections nosocomiales au Maroc et principales bactéries impliquées:

Le taux d'IN parmi les patients d'un établissement de santé est un indicateur de la qualité et de la sécurité des soins. La fréquence des IN varie selon les pays. Elle est de 5,4% en Norvège, 4,5% en France, 4,9% en Italie, 13,4% en Turquie et de 10,9% au Sénégal [1].

Les résultats de la première étude sur la prévalence des infections nosocomiales au niveau du Centre Hospitalier Universitaire Ibn Sina de Rabat, ont démontré qu'environ 10% des patients hospitalisés ont contracté une infection nosocomiale [1]. Les microorganismes les plus en cause sont: le staphylocoque, l'*Escherichia coli* et le *klebsiella pneumoniae*. Les secteurs hospitaliers où on contracte le plus d'infections nosocomiales sont les services de réanimation et de chirurgie. L'appareil urinaire et respiratoire ainsi que le siège de la plaie opératoire, sont les parties de l'organisme qui souffrent le plus de ces infections [5].

Une autre enquête de prévalence réalisée au CHU Hassan II de Fès a rapporté un taux de prévalence de 6,7 %. Les infections du site opératoire étaient les plus fréquentes et représentaient 46 % des infections nosocomiales, suivies par les infections urinaires (37 %), puis les infections respiratoires basses (11 %) et celles du système nerveux (5 %). Les micro-organismes les plus souvent isolés sont *Escherichia coli* qui représente le tiers des germes isolés d'infections nosocomiales documentées, *Candida albicans* 22,2 % et les infections à *Klebsiella pneumoniae* 22,2 % [6].

5. La prévention des IAS:

La prévention des infections nosocomiales nécessite un programme intégré, contrôlé, dont les éléments les plus importants sont les suivants [3, 7, 8]:

- Le lavage adéquat des mains** (voir annexe 1) **et le port de gants, en observant des pratiques et stratégies d'asepsie, d'isolement, de stérilisation, de désinfection appropriée:** ceci permet de limiter la transmission d'agents microbiens de patient à patient pendant les activités de soins directs;

- **maîtriser les risques infectieux liés à l'environnement:** l'identification de certaines niches écologiques potentiellement à l'origine d'IN rend indispensable la maîtrise de l'environnement hospitalier afin de protéger les patients, en particulier les plus fragiles, et on ne doit pas négliger le personnel soignant, car il est aussi une cible facile des infections, qui peut être accidentellement contaminé directement par le contact quotidien du matériels utilisés ou infecté par les patients ayant une maladie transmissible...etc.
- limiter le risque d'infection endogène par la réduction des gestes invasifs et par la promotion d'un usage optimal des anti-infectieux;
- surveiller les infections, identifier et maîtriser les flambées épidémiques;
- assurer la prévention des infections chez les membres du personnel;
- renforcer les pratiques de soins et assurer la formation continue du personnel.

II- DISPOSITIFS MEDICAUX (DM):

4. Définition

Un dispositif médical est destiné à être utilisé chez l'homme à des fins [9]

- De diagnostic, de prévention, de contrôle, de traitement, d'atténuation d'une maladie, de compensation d'une blessure ou d'un handicap.
- D'étude ou de remplacement ou modification de l'anatomie ou d'un processus physiologique.
- De maîtrise de la conception.

5. Classification des dispositifs médicaux

Les dispositifs médicaux sont classés en 3 niveaux en fonction de leurs destination lors de l'acte de soins y correspondant à 3 catégories de risque infectieux et donc à 3 niveau de traitement requis en fonction du spectre d'activité à atteindre [10].

Tableau 1: Classement des DM et niveaux de traitement requis.

Destination du matériel	Classement du matériel	Niveau de risque infectieux	Niveau de traitement requis
Introduction dans le système vasculaire ou cavité ou tissu stérile quelque soit la voie aborder	Critique	Haut risque	Stérilisation ou usage unique stérile ou à défaut désinfection de haut niveau
En contact avec muqueuse ou peau lésée superficiellement	Semi-critique	Risque médian	Désinfection de niveau intermédiaire

En contact avec la peau intacte du patient ou sans contact avec le patient	Non-critique	Risque bas	Désinfection de bas niveau
--	--------------	------------	-------------------------------

6. Gestion de l'entretien du matériel et opérations de traitement des DM

Il existe deux types de dispositifs médicaux, les DM à usage unique et les DM à usage multiple. Ces derniers nécessitent des étapes d'entretien rigoureuses puisqu'ils sont à risque infectieux.

a. Dispositif médical à usage unique

- L'élimination immédiate du matériel ou du dispositif médical à usage unique après utilisation [11]:

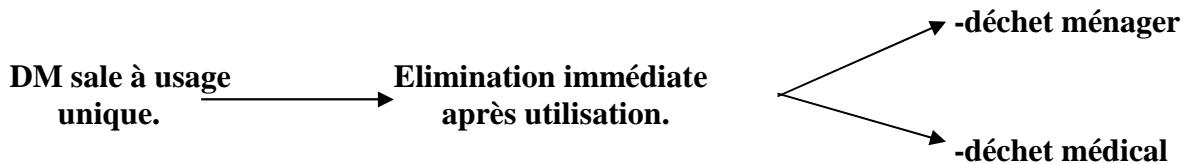


Figure1: méthode à suivre pour matériel à usage unique

b. Dispositif médical à usage multiple

Quel que soit le traitement appliqué à un dispositif médical à usage multiple, il débute par des étapes comme, la prédésinfection suivie du nettoyage. Puis en fonction de la désinfection du matériel (critique ou semi-critique), il sera stérilisé ou désinfecté [11].

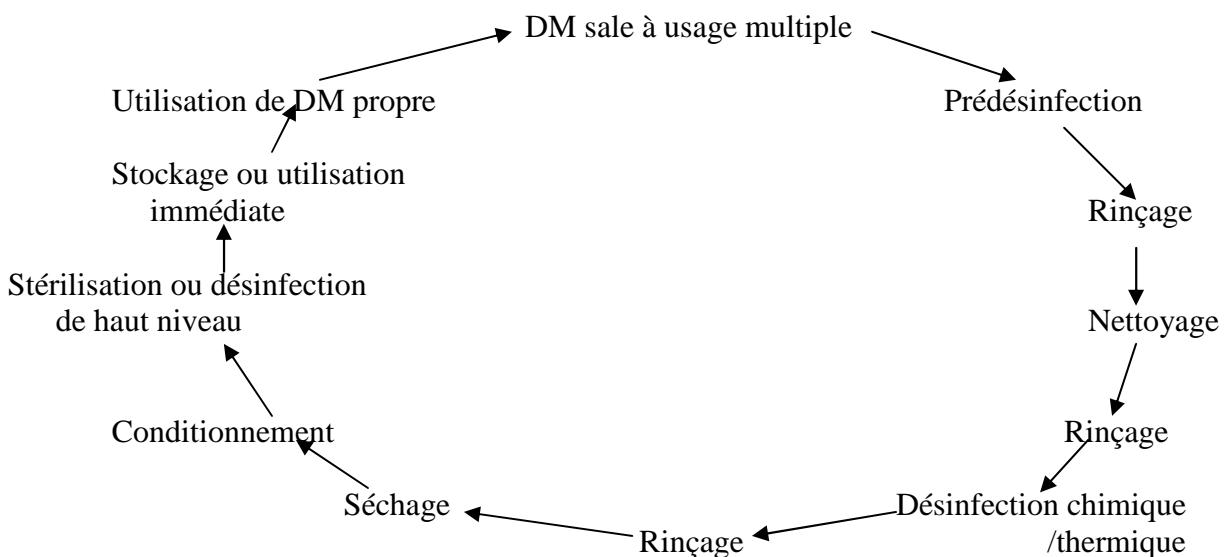


Figure 2: Cycle de nettoyage des matériels (DM) à usage multiple

III- LES COUVEUSES

Les couveuses sont des dispositifs médicaux non-critiques, à risque infectieux de bas niveau; néanmoins elles peuvent être la source d'infection chez les bébés. Par objectif de diminuer les risques d'infection des prématurés, les incubateurs néonatals subissent un traitement quotidien ou hebdomadaire de l'habitacle et du réservoir d'eau.

1. Définition:

L'incubateur néonatal appelé aussi couveuse, est un dispositif médical sous forme d'un caisson en plastique transparent fermé dans lequel on dépose un matelas. Il permet de maintenir des nouveaux nés, malades ou prématurés, dans des conditions climatiques favorables à une évolution positive de leur état, il permet également de les protéger le plus possible du courant d'air, bruit, microorganismes [12].



Figure 3: Photo d'une couveuse

2. Les fonctions de la couveuse

La couveuse joue un rôle primordial dans la protection du nouveau-né contre les infections de l'environnement et elle assure aussi leur développement fœtal par la maintenance d'un environnement adéquat grâce à des paramètres du climat régnant dans l'habitacle [13].

c. Protection contre les infections

La couveuse protège les nourrissons très sensibles contre les infections bactériennes et contre les autres agents de contamination qui se plaisent en milieu chaud et humide. Malgré les précautions, on peut avoir des complications qui proviennent des bactéries introduites

accidentellement dans la couveuse, donc il faut qu'elle soit ouverte le moins possible pour préserver sa stérilité.

b. Les paramètres qui sont pris en compte par l'appareil

- Régulation de la température de l'air: la couveuse permet de réguler la température de l'air qui entoure le nouveau-né.
- Régulation de l'oxygène: la couveuse apporte au nourrisson le supplément d'oxygène dont il a besoin.
- Régulation de l'humidité de l'air: La couveuse permet aussi de réguler le taux d'humidité de l'air, qui est apporté par un bac d'eau stérile soumis à la chaleur d'une résistance.

3. Les types d'incubateurs:

Ces équipements visent à réchauffer, à maintenir la température corporelle du nouveau-né à des valeurs normales en fonction de son âge gestationnel et de son poids. Deux types d'incubateurs sont utilisés à l'hôpital [14]:

b. les incubateurs radiants pour la réanimation intensive

Ils sont utilisés en salle de naissance comme table de réanimation pour les soins courants du nouveau-né, également en réanimation rapportée en phase aigue ou après une chirurgie lourde.

c. Les incubateurs fermés en soins intensifs, en maternité et en pédiatrie

On y contrôle plus facilement la température, il permet à la fois :

- Le réchauffement par ventilation brassant de l'air filtré, réchauffé sur des résistances.
- Le maintien thermique des prématurés.
- L'humidification de l'air de l'habitacle.

Ces incubateurs sont composés de trois parties:

☞ Accueil du bébé (habitacle): permet de déposer et de reprendre celui-ci grâce à un abattant, de bien l'observer à travers les parois transparentes en plexiglas. Les soins techniques lui sont prodigués par des hublots pour le passage des mains et l'introduction de tubulures.

☞ Un système de prise externe équipé d'un filtre, d'un système de réchauffement et d'humidification constitué d'un bac à eau.

☞ La partie mécanique permet le réglage de la hauteur et de la position de l'habitacle ainsi que la mobilité de l'incubateur.

5. **Entretien des incubateurs**

La réalisation d'un entretien systématique d'incubateur diminue le risque transmissible de microorganismes d'un enfant à l'autre. Le choix du produit détergent-désinfectant est un compromis entre efficacité, toxicité et compatibilité avec les plexiglas de l'incubateur. Ces procédures doivent être validées par le CLIN de l'établissement [15, 16].

a. **L'entretien quotidien de l'incubateur**

Il est réalisé avec une chiffonnette propre humidifiée avec l'eau stérile et un détergent-désinfectant, pour le nettoyage interne de l'habitacle. Pour le bac à eau, Il faut le vidanger, le tremper dans une solution détergente-désinfectante adéquate, le rincer à l'eau bactériologiquement maîtrisée ou à l'eau stérile, puis le sécher et le remplir d'eau stérile (voir annexe 2).

d. **Entretien hebdomadaire ou entre deux enfants**

L'entretien hebdomadaire peut être réalisé à l'aide d'une solution détergente-désinfectante ou à la vapeur ($> 100^{\circ}\text{C}$).

- Nettoyage avec une solution détergente-désinfectante: les éléments amovibles sont retirés et immersés dans la solution détergente-désinfectante (sauf le matelas et la sonde thermique). Ensuite il faudrait les nettoyer et les rincer, puis laver le plateau et le socle du matelas sans rinçage. Sécher le tout avec un linge propre et repositionner les éléments démontés (voir annexe 2).
- Nettoyage par la vapeur: retirer les éléments amovibles puis nettoyer l'habitacle et ses accessoires à la vapeur, les égoutter, les essuyer à l'aide d'un linge propre et sec, et enfin les repositionner.

IV- LES ENDOSCOPES:

Les endoscopes sont des dispositifs médicaux qui ne peuvent faire l'objet de mesure de stérilisation à cause de la complexité de certains de leurs constituants. La complexité de leur structure rend possible une accumulation de souillures minérales ou organiques qui peuvent elles-mêmes renfermer des éléments infectieux qui peuvent être la source d'infection nosocomiale chez les patients.

3. Définition des endoscopes:

Les endoscopes sont des tubes munis d'un système d'éclairage, ils peuvent être équipés de petites caméras qui transmettent l'image sur un écran. Des accessoires sont parfois adjoints à l'endoscope pour réaliser des actes chirurgicaux ou des prélèvements.



Figure 4: Photo d'un endoscope souple.

On distingue deux types d'endoscopes [17]:

- Les endoscopes rigides: ils sont démontables et compatibles avec les procédés de stérilisation à la vapeur d'eau.
- Les endoscopes souples ou fibroscopes sont constitués de fibres optiques conduisant la lumière. Ils sont plus complexes à nettoyer et ne supportent pas les procédés de stérilisation à haute température mais ils sont compatibles avec des procédés classiques de désinfection chimique utilisés en pratique hospitalière.

4. Les infections nosocomiales liées aux endoscopes

a. Contamination d'endoscope suite à une mauvaise désinfection:

Les infections identifiées et publiées, restent exceptionnelles, compte tenu du nombre important d'examens réalisés. Néanmoins, des cas d'infection ont été rapportés liés à des endoscopes bronchiques et des endoscopes digestifs [18,19]. Par ailleurs, 10 à 30 % des endoscopes semi-critiques prélevés après entretien restent contaminés par des micro-organismes à risque nosocomial majeur. Le risque infectieux post-endoscopique est bien réel. Ceci souligne l'importance du respect des procédures de nettoyage-désinfection réalisées après chaque acte endoscopique ou après stockage [20].

b. Les types de contamination:

Les contaminations bactériennes observées peuvent être [20]:

- ❖ **Des contaminations endogènes:** qui concernent davantage les gestes endoscopiques interventionnels que les gestes à portée diagnostique. Les principaux germes en cause sont les streptocoques, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*. Une antibioprophylaxie est recommandée en cas de risque élevé.
- ❖ **Des contaminations exogènes:** des infections consécutives à une endoscopie digestive ont fait l'objet de 317 cas rapportés de 1966 à 2002. Les principales causes rapportées ont été l'utilisation d'une machine contaminée, l'utilisation d'un désinfectant inadapté, le mauvais séchage des canaux internes avant stockage ou une erreur dans la procédure de traitement. *Pseudomonas aeruginosa* est le microorganisme le plus fréquemment isolé (227 cas sur 317).

i. Protocole de désinfection des endoscopes:

Les endoscopes sont considérés comme des dispositifs médicaux semi critique à risque infectieux médian et nécessitent une désinfection intermédiaire avec rinçage à l'eau de réseau pour les endoscopes digestifs et rinçage à l'eau bactériologique maîtrisée pour désinfection des bronchoscopes [21]. Le traitement automatisé des endoscopes (voir annexe 4) et le traitement manuel (voir annexe 3) des endoscopes sont réalisés en 7 étapes présentées dans le tableau n 2.

Tableau 2: La méthode de nettoyage-désinfection des endoscopes [17].

Etapes	But	Moyen	Remarque
Prétraitement	Eliminer les souillures visibles	Essuyage externe + aspiration-insufflation de tous les canaux	Réaliser un test d'étanchéité avant immersion lors du nettoyage
nettoyage	1^{er} nettoyage	Abaïsser le niveau de contamination et éliminer les souillures	Démontage et immersion complète
	1^{er} rinçage	Éliminer les salissures et les résidus de détergent	Immersion complète
	2^{eme} nettoyage	Abaïsser le niveau de contamination et éliminer les souillures	Immersion complète

2^{eme} Rinçage	Eliminer les résidus des matières organiques et des détergents	Immersion complète + rinçage externe	Abondant
Désinfection	Eliminer ou tuer les MO et ou les virus	Immersion complète	Abondant
Rinçage terminal	Réduire le risque toxique	Immersion complète	Abondant
Séchage	Elimination d'eau de rinçage	Air médical	Lors d'une utilisation ultérieure
Stockage	Protection vis avis de la contamination	Endroit propre et sec	Le stockage dans la mallette et a proscrire

Tout endoscope non utilisé dans les 12 heures est redésinfecté avant une nouvelle utilisation (immersion dans une solution désinfectante puis rinçage abondant)

4. Le contrôle microbiologique en endoscopie

La contamination résiduelle d'un endoscope par des bactéries peut témoigner de procédures de décontamination inadéquates ou défaillantes, de contamination des fluides utilisés lors de l'entretien, ou encore de problème de conception de l'endoscope. Les contrôles microbiologiques sont destinés à identifier un risque potentiel de contamination des patients. Des recommandations émanant de différentes sociétés savantes ont cadre les modalités du contrôle microbiologique [20].

a. Moment de prélèvement

Le moment des prélèvements est en général recommandé après une durée de stockage d'au moins 12 heures si on veut évaluer l'état général des canaux de l'endoscope (formation de biofilm), ou alors juste après la procédure de nettoyage désinfection dont l'objectif est de vérifier l'efficacité de la procédure utilisée.

b. Critère d'interprétation

Les critères d'interprétation à 3 niveaux sont définis [20]

- **niveau cible:** niveau de conformité,
- **niveau d'alerte:** nécessite des contrôles, voire des mesures correctives d'emblée,
- **niveau d'action:** impose la prise de mesures correctives immédiates.

En cas de prélèvements non conformes, une conduite à tenir détaillée est explicitée.

Tableau 3: Aide à l'interprétation des résultats pour la surveillance microbiologique des endoscopes (les valeurs sont données à titre indicatif).

Niveau de désinfection	Niveau cible	Niveau d'alerte	Niveau d'action
------------------------	--------------	-----------------	-----------------

Désinfection de niveau intermédiaire et rinçage à l'eau bactériologiquement maîtrisée ** Bronchoscope	Flore totale < 5 UFC et absence de micro-organisme indicateur*	Flore totale 5- 25 UFC et absence de micro-organisme indicateur*	Flore totale > 25 UFC ou présence de micro-organisme indicateur*
Désinfection de niveau intermédiaire et rinçage à l'eau pour soins standard ** Endoscope digestif	Flore totale < 25 UFC et absence de micro-organisme indicateur*	Flore totale 25- 100 UFC et absence de micro-organisme indicateur*	Flore totale > 100 UFC ou présence de micro-organisme indicateur*

* Principaux micro-organismes indicateurs : *Staphylococcus aureus*, *enterobacteries*, *pseudomonas aeruginosa* et autre *pseudomonas*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter sp*, *Candida sp*.

** il est recommandé pour l'interprétation des résultats d'avoir à disposition un résultat récent de contrôle microbiologiquement maîtrisé/BRNM : Bactéries à Risque Nosocomiale Majeur.

MATERIELS ET METHODES

MATERIEL ET METHODES:

Afin de sensibiliser le personnel hospitalier à l'intérêt du bio-nettoyage et de la désinfection adéquate des dispositifs médicaux, nous avons procédé au contrôle microbiologique de deux types de dispositifs médicaux à savoir les endoscopes (semi-critique) et les couveuses (non-critique).

4. Présentation de l'étude:

Notre stage de fin d'étude a été réalisé au laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès sur une période de 2 mois (avril-mai). Ainsi, 64 échantillons ont été prélevés sur des couveuses et des endoscopes, respectivement au service Néonatalogie et de Réanimation néonatale et au service des explorations fonctionnelles du Centre Hospitalier Universitaire Hassan II de Fès.

5. Service de Néonatalogie et de Réanimation néonatale:

Les prélèvements sont répartis comme suit:

- * 42 Prélèvements à partir de 3 points différents pour chaque couveuse, qui sont: 1 matelas du lit, 2 hublot pivotant et ses joints, 3 l'abattant avant et ses joints.
- * 11 prélèvements d'eau distillée à partir des réservoirs des couveuses (4^{ème} points).
- * 3 prélèvements à partir d'eau distillée du bidon de remplissage du réservoir des couveuses.

a. Moment de prélèvements:

Les prélèvements de surfaces et d'eaux des réservoirs des couveuses sont effectués de façon aléatoire sans préavis du personnel responsable de l'entretien.

b. Localisation des prélèvements:

Les prélèvements sur les couveuses sont réalisés au niveau de quatre points:

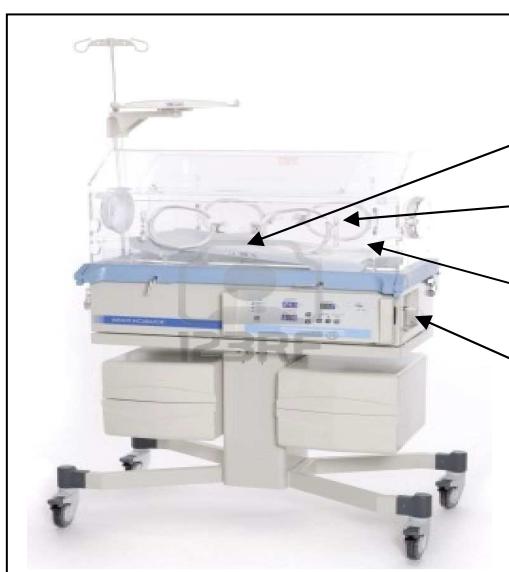


Figure 5: Points de prélèvements sur couveuse

c. Technique de prélèvement:

Le prélèvement de surface est réalisé par écouvillonnage de la surface choisie. Les écouvillons utilisés sont stériles (Eurotubo®) et préalablement remplis avec 3 ml de Bouillon cœur-cervelle BHI (Oxoid®).

Les surfaces ont été frottées latéralement et verticalement avec le coton-tige de l'écouvillon. Les échantillons d'eau du réservoir ont été prélevés à l'aide d'une seringue stérile et injectée directement dans un flacon stérile.

Traitement appliqué après le prélèvement: les surfaces des couveuses prélevées sont nettoyées à l'aide de lingettes contenant un désinfectant hydro-alcoolique. L'infirmière complète le niveau de l'eau du réservoir après chaque prélèvement.

Les prélèvements sont acheminés immédiatement au laboratoire de microbiologie de la faculté de médecine dans une enceinte réfrigérée maintenant l'échantillon à +4° C.

d. Technique d'analyse de la surface des couveuses:

Les écouvillons sont ensemencés en surface sur différents milieux sélectifs: gélose EMB (milieu Eosine Bleu de Méthylène), Gélose au Sang, gélose Chapman et gélose *Pseudomonas*. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37° C pendant 24h et 48 heures.

Les colonies qui ont poussé sur ces milieux de culture sont purifiées et ensemencées sur gélose nutritive pour une identification ultérieure.

e. Technique d'Analyse de l'eau du réservoir:

Pour optimiser l'analyse, nous avons traité le liquide de recueil par la méthode de filtration sur membrane. La membrane utilisée est en nitrate de cellulose de porosité 0,45 µm (Sartorius®). Les membranes filtrantes sont ensuite transférées sur un milieu de culture non sélectif adapté type PCA (Oxoid®) et incubées à 37° C. La lecture est réalisé après 24 heures, 48h, 72 heures et jusqu'à 5 jours en cas de culture stérile.

Les colonies qui ont poussé sont purifiées et ensemencées sur gélose nutritive pour une identification ultérieure.

6. Service des Explorations fonctionnelles:

Les prélèvements sur les endoscopes sont répartis comme suit:

- * 4 prélèvements sur des endoscopes bronchiques.
- * 3 prélèvements sur des endoscopes gastriques.
- * 1 prélèvement d'eau de rinçage terminal des endoscopes bronchiques.

a. Moments des prélèvements:

Les prélèvements sur les endoscopes sont réalisés juste après la procédure de nettoyage désinfection. Celle des endoscopes digestifs est manuelle alors que les endoscopes bronchiques subissent un traitement automatique.

b. Localisation des prélèvements:

Le prélèvement des endoscopes se fait au niveau des canaux internes du fait qu'ils constituent les surfaces les moins accessibles au nettoyage et à la désinfection.

Le prélèvement de l'eau de rinçage des endoscopes bronchiques est pris au niveau de l'automate de désinfection des endoscopes.

c. Solution des prélèvements:

Nous avons utilisé une solution de décrochage stérile dont la formulation est conforme à la norme Européenne NF EN ISO 11737-1 de juillet 2006 (tableau 4) [20].

Tableau 4: Composition de la solution de décrochage

Constituant	Quantité
Tween80	1 ml
Phosphate (KH_2PO_4)	9,11 g
Chlorure de sodium (NaCl)	4,30 g
Peptone	1 g
Eau distillée	1000 ml

d. Technique des prélèvements:

Après désinfection des extrémités proximales et distales de l'endoscope avec de l'alcool à 70°, nous avons procédé par l'injection de 200 ml de la solution de décrochage à l'aide d'une seringue stérile bien adaptée à l'orifice proximal du canal opérateur de l'endoscope. La solution de prélèvement est récupérée immédiatement après l'injection de la solution de décrochage dans un flacon unique stérile, en évitant que le tuyau de l'endoscope ne touche l'intérieur du flacon [20].

Traitement appliqué après le prélèvement: L'endoscope est rincé à l'eau de réseau afin d'éliminer les résidus de la solution de prélèvement avant qu'il ne subisse une procédure complète de traitement.

Les prélèvements sont transférés immédiatement au laboratoire de microbiologie de la faculté de médecine dans une enceinte réfrigérée maintenant l'échantillon à +4° C.

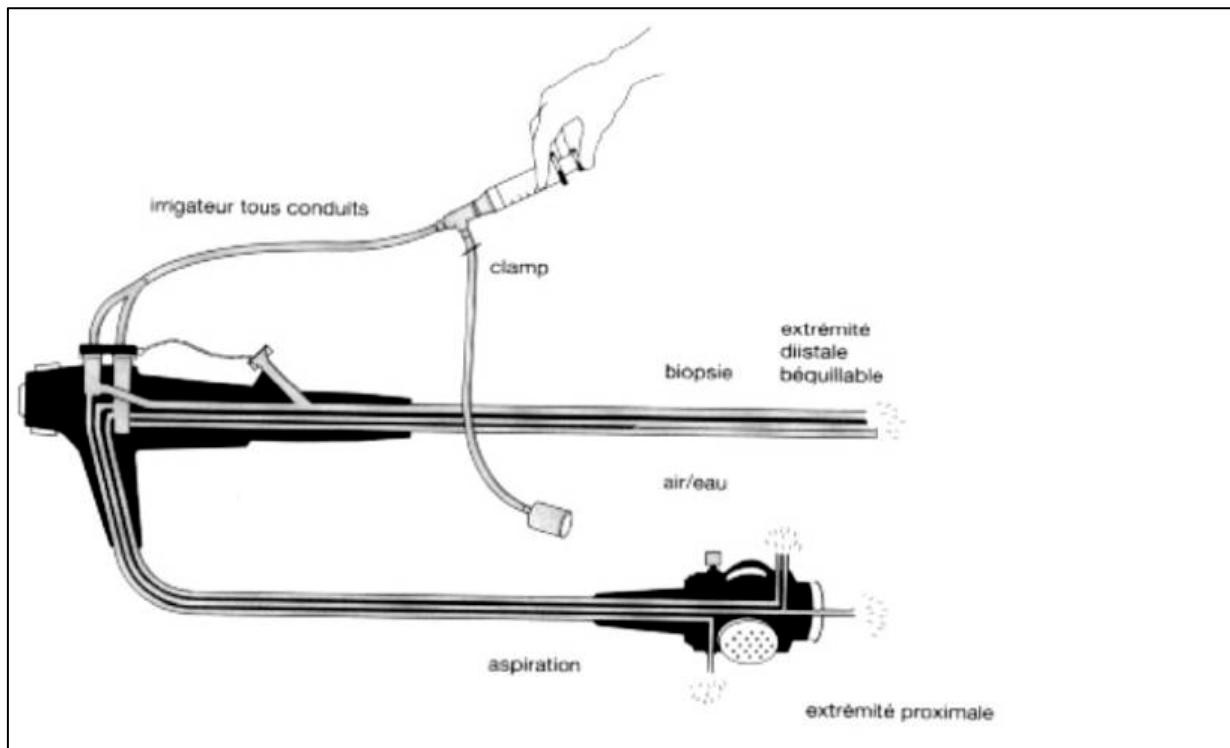


Figure 6: Prélèvement sur un endoscope.

e. Technique d'Analyse des prélèvements des endoscopes:

Le liquide de recueil a été traité par la méthode de filtration sur membrane en nitrate de cellulose de porosité $0,45 \mu\text{m}$. Le volume total du liquide recueilli est filtré et les résultats obtenus sont rendu par endoscope.

La membrane est rincée 3 fois avec 50 ml d'eau stérile pour éliminer l'effet moussant du détergent tween 80, qui est un tensioactif facilitant la récupération des microorganismes.

Les membranes sont ensuite transférées sur milieu PCA et incubées à 37°C en aérobiose. La lecture est réalisée après 24 heures, 48h, 72 heures et jusqu'à 5 jours en cas de culture stérile.

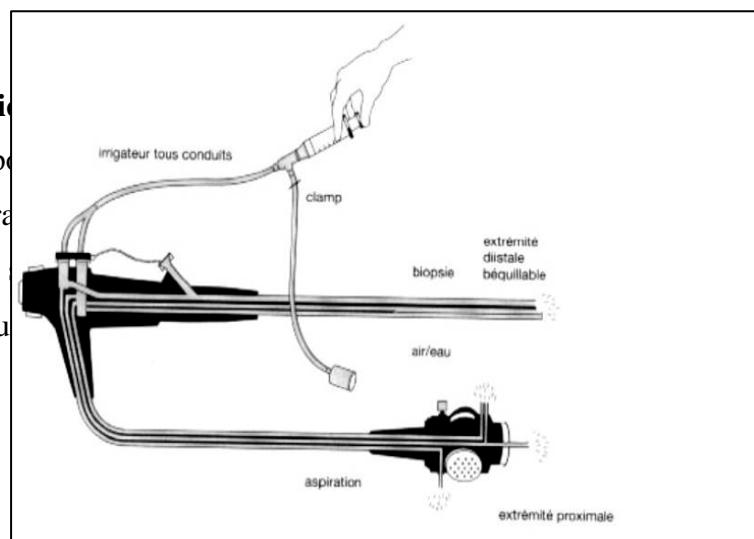
Les résultats sont exprimés en unités formant colonies UFC par endoscope. Les colonies dénombrées sont purifiées et ensemencées sur gélose nutritive pour une identification ultérieure [20].

f. Technique

L'eau utilisée pour la filtration sur membrane

Les membranes sont incubées pendant 24 et 48 heu

la méthode de filtration sur membrane en nitrate de cellulose de porosité $0,45 \mu\text{m}$. Les membranes sont incubées à 37°C en aérobiose



Les résultats sont exprimés en nombre d'unités formant colonies UFC par 100ml d'eau filtrée, les colonies obtenues sont purifiées et ensemencées sur la gélose nutritive pour une identification ultérieure.

5. Identification biochimique des bactéries:

Toutes les colonies qui ont poussés sur les différents milieux de culture utilisés dans ce travail ont été identifiées. Le 1^{er} test discriminatoire est la coloration Gram, suivi du test d'oxydase et de catalase, fermentation du glucose, du lactose et de la production de gaz. Les différents tests biochimiques utilisés sont détaillés ci-dessous.

a. Coloration de gram:

- #### ■ Principe:

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne pour distinguer et classer les bactéries à gram Positif, qui gardent la couleur violette des bactéries à gram négatif, qui prennent une coloration finale rose de fuchsine [22].

- #### ■ Mode opératoire:

- Préparation d'un frottis bactérien: un étirement d'une souche bactérienne aussi mince que possible est effectué à l'aide d'une anse stérile dans une goutte d'eau distillée déposée sur une lame, cette dernière est séchée à l'aide d'un bec benzène

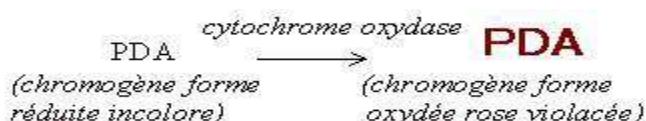
- Coloration de Gram: cette lame est recouverte de cristal violet pendant 1 minute, ensuite de lugol pendant 1 minute, puis d'alcool pendant 10 secondes et par le rose de fuschine pendant 1 minute. Un rinçage de la lame à l'eau courante après chaque étape est obligatoire.

- Observation microscopique: le frottis coloré est observé au microscope optique.

b. Test d'oxydase:

- Principe:

Ce test permet d'orienter l'identification des bacilles et coques Gram - par la mise en évidence de la présence d'une enzyme: la phénylène diamine oxydase qui est capable d'oxyder un réactif: le N diméthyl paraphénylène diamine(PDA). Ce réactif incolore libère un composant rose violacé à l'air et en présence de l'enzyme phénylène diamine oxydase [23].



- #### ■ Mode opératoire:

Un inoculum bactérien est écrasé sur un disque d'oxydase à l'aide d'une pipette Pasteur: l'oxydase positive se traduit par une coloration rose violacée sur le disque (exemple *Pseudomonas*), alors que le disque reste incolore dans le cas d'une oxydase négative (exemple: Entérobactéries et *Acinetobacter*).

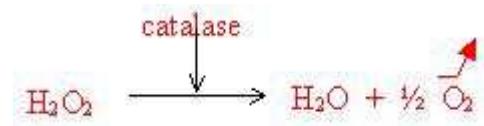


Figure 7: résultat positif du test oxydase.

c. Test catalase:

- Principe:

Ce test permet d'orienter l'identification des coques et bacilles Gram + positives, par la mise en évidence d'une enzyme: la catalase qui est capable de catalyser les peroxydes en eau avec libération d'oxygène, selon la réaction suivante [23]:



- Mode opératoire:

Sur une lame propre et sèche une goutte d'eau oxygénée est déposée, puis additionné d'un inoculum bactérien. L'apparition de bulles indique un dégagement gazeux de dioxygène, donc la bactérie possède une catalase (elle est dite catalase positive).



Figure 8: résultats du test catalase.

d. Fermentation du glucose:

- Principe:

Le milieu Kligler -Hajna est un milieu gélosé complexe coulé en tube; il est très utilisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae*. La technique d'ensemencement du milieu Kligler-Hajna permet de distinguer les phénomènes selon leur lieu, pente ou culot:

- Les bactéries à **glucose négatif** alcalinisent le milieu en utilisant les peptones et donnent une coloration rouge sur la pente et le culot.

- Les bactéries **glucose positif et lactose négatif** acidifient le milieu dans un premier temps par l'utilisation du glucose qui sera rapidement épuisé, car il est en faible concentration, cela se traduit par une coloration jaune du culot et rouge de la pente dans un premier temps. Les bactéries utilisent par la suite les peptones, ce qui conduit à une alcalinisation du milieu, qui se traduit par une recoloration du culot par le rouge. Dans le culot l'utilisation de la source de carbone se fait sous anaérobiose. Les principaux acides organiques produits sont non volatils: ils restent enfermés dans la gélose.

- Les bactéries **glucose positif et lactose positif** acidifient le milieu, qui se traduit par une coloration jaune aussi bien de la pente que du culot. Sur la pente l'utilisation de la source de carbone est aérobie. Si la capsule est correctement dévissée, le principal acide produit, est le dioxyde de carbone.

La présence de thiosulfate de sodium et de fer III dans ce milieu permet de révéler la capacité des bactéries à produire de l'H₂S à partir de thiosulfate, qui se traduit par la formation d'un précipité noir de sulfure de fer.

La production bactérienne du gaz est un autre caractère qui peut être apprécié à l'aide de ce milieu se traduit par une dislocation de la gélose.

e. Recherche d'uréase:

- Principe

On utilise le milieu d'Urée-indole prêt à l'emploi en ampoule versable. Ce milieu d'identification permettra de rechercher un certain nombre d'enzymes présentes ou non chez les bactéries à identifier. Sous l'action d'une uréase, il y a donc alcalinisation du milieu qui se traduit par une coloration rouge du milieu.

f. Production d'indole

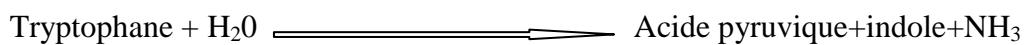
- Principe

Les bactéries dégradent le tryptophane en indole grâce à une tryptophanase.

- La technique:

On ensemence le milieu d'Urée-indole avec la culture du germe à étudier et on l'incube à 37° C pendant 24h à 48heures.

Après addition du réactif de Kovacs, le diméthyl-amino-4-benzaldéhyde contenu dans ce dernier réagit avec l'indole, produit de l'activité de la tryptophanase, et forme un composé coloré en rouge.



g. Test RM (au rouge de méthyle):

Les acides produits par la voie des fermentations acides mixtes sont mis en évidence par le test RM (au rouge de méthyle). Cette voie conduit à la production des acides organiques plus ou moins forts et du CO₂ acide faible et volatil, donc il va y avoir une forte acidification qui se révèle par une coloration rouge après l'ajout d'une goutte de rouge de méthyle (test positif). Cette souche est donc RM⁺.

h. Milieu citrate de Simmons:

Dans le milieu citrate de Simmons, le citrate est l'unique source de carbone. Son utilisation se traduit par une alcalinisation du milieu qui est révélée par le virage de l'indicateur de PH (bleu de bromothymol) au bleu et donc la souche est citrate de Simmons positive [23].

i. Identification par Galerie Api 20E:

La suite des identifications a été réalisée sur les Api 20 E.

- Principe:

L'Api 20E est un système standardisé pour l'identification des Entérobacteraceae et autres bacilles Gram-négatifs non fastidieux, elle comporte 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

Son principe est basé sur une fermentation et une oxydation de 10 sources de carbone et l'utilisation de 10 tests enzymatiques par Entérobacteraceae gram négatifs; L'Api 20E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture des réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

- Mode opératoire:

Pour ensemencer une Api 20E, on passe par les étapes suivantes:

a- Préparation de la Galerie:

D'abord inscrire la référence de la souche dans la longuette latérale de la boite fermée. Ensuite créer une atmosphère humide en répartissant 5ml d'eau distillée dans les alvéoles du fond de la Galerie et la placer dans la boite d'incubation.

b- Préparation de l'inoculum:

Réaliser une suspension bactérienne bien homogène par ensemencement d'une colonie provenant d'une culture jeune (18 à 24h) dans un tube stérile contenant 5ml d'eau physiologique stérile.

c- Inoculation de la Galerie:

Introduire la suspension dans la galerie: on crée l'anaérobiose en remplissant leurs cupules avec l'huile de paraffine; pour les tests CIT, VP, GEL, on remplit les tubes et les cupules et enfin pour les autres tests non soulignés on remplit uniquement les tubes. Ensuite, on met la boîte d'incubation dans l'étuve à 36° C +/- 2° C, pendant 18 à 24h.

d- Lecture de la Galerie

Elle doit se faire en se référant au tableau de lecture. Les tests: TDA, IND et VP sont révélés après addition des réactifs: on ajoute une goutte du réactif JAMES pour le TDA et on ajoute une goutte des réactifs VP1 et VP2 pour les tests IND et VP.

e- Interprétation

La détermination du profil numérique se réalise sur une fiche de résultat, dont les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. La galerie API 20E comporte 20 tests; on réalise aussi la réaction de l'oxydase qui constituera le 21^{ème} test, celle-ci est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive. On additionne à l'intérieur de chaque groupe, (chaque groupe correspond à 3 tests, ce qui fait un total de 7 groupes si on leur ajoute le test de l'oxydase), la somme de valeurs correspondantes aux réactions positives et on obtient 7 chiffres. La figure suivante démontre un exemple de détermination d'un profil numérique d'une galerie API 20E.

Résultats de la galerie:

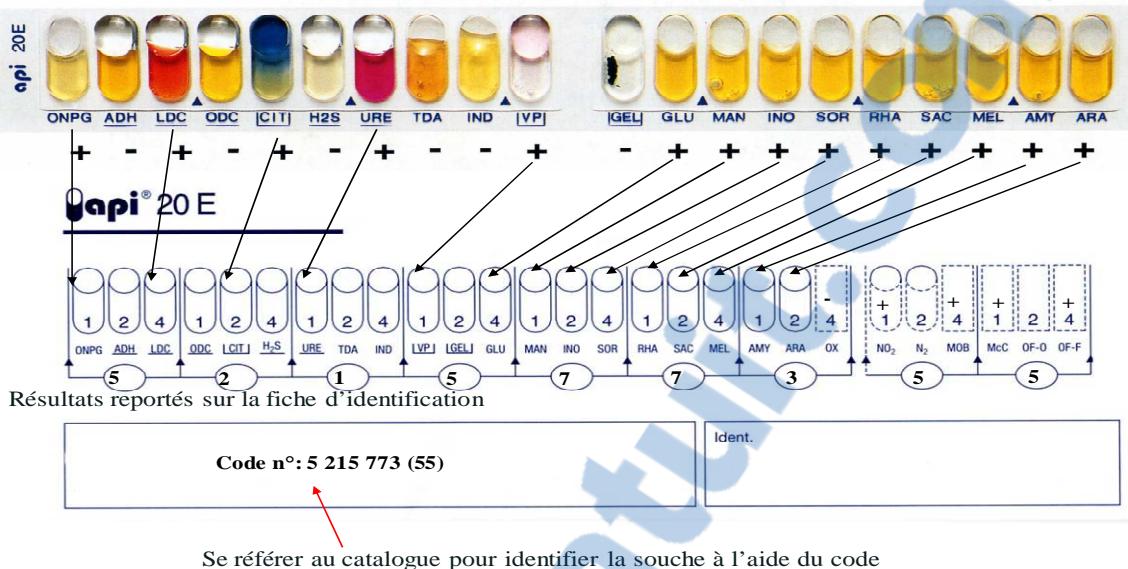


Figure 9: Méthodologie suivie pour la lecture des résultats d'une Galerie Api

f- Identification

Elle est réalisée à partir de la base de données à l'aide du catalogue analytique, on recherche le profil numérique dans la liste des profils.

6. Antibiogramme:

L'antibiogramme des *Enterobacteriaceae* et des *Staphylococcus aureus* ont été réalisés après l'identification des souches bactériennes [24].

a. Principe:

L'antibiogramme est une technique qui permet de tester la sensibilité d'une souche bactérienne aux antibiotiques déposés dans une boîte de Pétri et à observer les conséquences sur leur développement. Trois catégories cliniques ont été retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité *in vitro* : Sensible (S), Résistant (R) et sensibilité Intermédiaire (I).

b. Mode opératoire:

a- Préparation de l'inoculum:

A partir d'une culture de 18-24 h sur milieu gélosé non sélectif, préparer une suspension en solution saline (0,9 % NaCl) équivalente au standard McFarland 0,5 ($\sim 10^8$ UFC/ml).

b- Ensemencement sur gélose de Mueller-Hinton (MH):

Enterobacteriaceae: l'ensemencement se fait par la méthode de diffusion; la suspension inoculum a été diluée au 1/100 ($\sim 10^6$ UFC/ml) et ensemencée par écouvillonnage sur toute la surface du milieu Muller Hinton (MH).

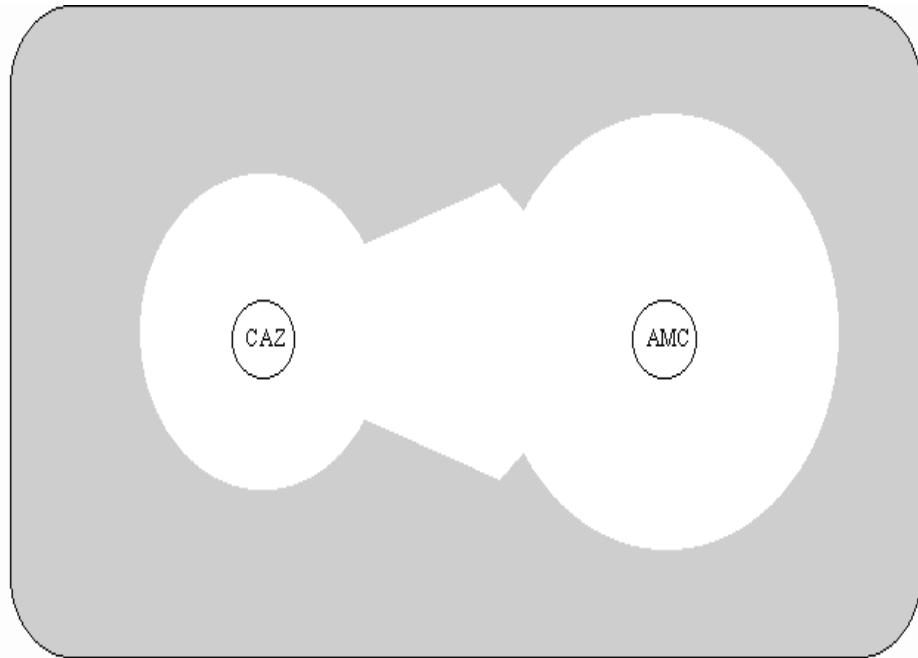
Staphylococcus aureus: ensemencé par la méthode de diffusion, et dilution de la suspension inoculum au 1/10 ($\sim 10^7$ UFC/ml) et incubation à 37° C sur milieu MH.

c- Dépôt des disques:

Utiliser les disques de la liste d'antibiotiques standard, selon le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM).

Pour les entérobactéries, les 12 antibiotiques testés sont: Amoxicilline (AML), Céfotaxime (CTX), Ceftazidime (CAZ), Imipénème (IPM), Céfalotine (KF), Acide Clavulanique (AMC), Acide nalidixique (NA), Norfloxacine (NOR), sulfaméthoxazole (STX), Gentamicine (CN), Ofloxacine (OFX), Amikacine (AK).

Une β -lactamase à spectre élargie (B.L.S.E.) est détectée par le test de synergie qui consiste à placer côté à côté deux disques, une C3G et une d'acide clavulanique. On obtient une image caractéristique de synergie d'action en "bouchon de champagne" (fig. 10).



Céphalosporinase à spectre étendu ; AMC = Amox + ac clav. , CAZ = Ceftazidime

Figure 10. test de synergie.

Pour les *Staphylococcus aureus*, Les 16 antibiotiques testés sont: Pénicilline G (PG), Kanamycine (K), Tobramycine (Tm), Gentamicine (Gm), Tétracycline (Te), Erythromycine (E), Lincomycine (L), Pristinamycine (PT), Chloramphénicol (C), Péfloxacine (Pef), Fosfomycine (Fos), Céfoxitine (Fox), Acide fusidique (FA), Rifampicine (RF), Vancomycine (VA) et Triméthoprime-sulfaméthoxazole (Cotrimoxazole) (SXT).

La recherche de la résistance à la méthicilline a été effectuée par la méthode de diffusion du disque de céfoxitine. Un diamètre d'inhibition autour du disque de moins de 27 mm témoigne de la suspicion de la présence d'un SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline). Les boîtes de pétries sont incubées à l'étuve à 37° C, pendant 18 à 24h.

d- Lecture des résultats:

Pour chaque antibiotique, mesurer le diamètre de la zone d'inhibition en millimètre, déterminer la catégorie clinique de la bactérie vis à vis de chaque antibiotique testé (S, I, R). L'interprétation de l'antibiogramme se fait selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM).

RESULTATS ET DISCUSSION:

Sur une période de deux mois, Soixante-quatre prélèvements ont été réalisés sur des couveuses et des endoscopes dans deux services au CHU Hassan II de Fès.

Ces prélèvements ont concerné 42 échantillons à partir de 3 points de surface des couveuses, 11 prélèvements d'eau distillée à partir des réservoirs des couveuses et 3 prélèvements d'eau distillée à partir du bidon de remplissage des réservoirs des couveuses dans le service de Néonatalogie et de Réanimation néonatale, ainsi que 3 prélèvements sur des endoscopes gastriques, 4 prélèvements sur des endoscopes bronchiques et 1 prélèvement d'eau de rinçage terminal des endoscopes bronchiques dans le Service des Explorations fonctionnelles.

5. Résultats des prélèvements des couveuses:

Les couveuses sont classées parmi les dispositifs médicaux non-critiques, qui correspondent à un risque infectieux bas, nécessitant un niveau de désinfection bas, [10].

a. Niveau de contamination des surfaces des couveuses:

Pour déterminer l'écologie des bactéries adhérentes aux surfaces des couveuses, 42 prélèvements de surfaces sur 14 couveuses ont été réalisé au niveau de 3 point différents (hublot pivotant, matelas et abattant avant). Les Staphylocoques à coagulase négative (SCN) et *Escherichia coli* ont été isolés sur toutes les couveuses prélevées indépendamment du site de prélèvement. Les autres bactéries isolées sont les suivantes: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp*, *Enterococcus sp*, et *Pseudomonas aeruginosa*. Les résultats et les dates de prélèvements sont affichés dans le tableau 5.

Tableau 5: Résultats des prélèvements au niveau des surfaces des couveuses.

Prélèvements	Date	Matelas	Hublot pivotant	Abattant avant
1 (C15)	18/04/11	<i>Escherichia coli</i> SCN	-	SCN
2 (C16)	18/04/11	<i>E. coli</i> SCN	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
3 (C13)	25/04/11	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i> <i>S. aureus</i>	SCN
4 (C10)	25/04/11	SCN	<i>Escherichia. coli,</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	SCN <i>P. aeruginosa</i>
5 (C12)	02/05/11	SCN	<i>K. pneumoniae</i> SCN	<i>E. coli</i> SCN <i>S. aureus</i>
6 (C16)	02/05/11	<i>K. pneumoniae</i> SCN	<i>E. coli</i> <i>S. aureu</i> <i>s Enterococcus</i>	<i>Enterococcus</i> SCN, <i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>
7 (C18)	02/05/11	<i>E. coli</i> SCN	<i>K. pneumoniae, SCN</i>	<i>E. coli</i> SCN
8 (C4)	05/05/11	<i>E. coli</i> SCN	<i>SCN</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	SCN
9 (C5)	05/05/11	<i>E. coli</i> SCN	<i>K. pneumoniae</i> SCN <i>Enterococcus</i>	<i>K. pneumoniae, SCN</i> <i>Enterococcus</i>
10 (C7)	05/05/11	SCN	SCN	SCN
11 (C8)	05/05/11	<i>K. pneumoniae</i> SCN <i>Enterococcus sp.</i>	<i>Escherichia coli</i> SCN	<i>S. aureus</i>
12(C3)	11/05/11	<i>K. pneumoniae</i> <i>E. coli</i> SCN	SCN	<i>E. coli</i> <i>Enterococcus</i> SCN
13(C6)	11/05/11	<i>E. coli</i> SCN <i>Enterococcus</i>	<i>E. coli</i> SCN	<i>E. coli</i> SCN
14(C12)	11/05/11	<i>E. coli</i> SCN	<i>E. coli</i> SCN	<i>E. coli</i> SCN <i>Enterococcus</i>

Staphylococcus à coagulase négative: SCN

g. Fréquence des bactéries isolées à partir des surfaces des couveuses:

Nous avons identifiés 81 souches de bactéries isolées sur les surface des couveuses, qui sont composés de 7 genres de bactéries à des pourcentages variable entre 2%, représentés par des Streptocoques non groupables et 42% représentés par les SCN. *Escherichia coli* a été isolé à 22% suivis de *K. pneumoniae* (11%). *Staphylococcus aureus* vient en 5ème position avec 9% suivis de *Pseudomonas aeruginosa*.

Le tableau 6 présente la fréquence des bactéries au niveau des surfaces des couveuses.

Tableau 6: fréquence des bactéries isolées au niveau des surfaces des couveuses.

Bactéries isolées	Nombre de bactérie isolée	Pourcentage %
SCN	34	42 %
<i>Escherichia coli</i>	18	22 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9	11 %
<i>Enterococcus</i> sp.	8	10 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	9 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	4 %
<i>Streptococcus</i> sp.	2	2 %

h. Niveau de contamination de l'eau du réservoir des couveuses:

Après analyse de l'eau provenant de 11 réservoirs d'eau des couveuses, nous avons identifiés 2 genres de bactéries distinctes qui sont: *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus* à coagulase négative. Les résultats et les dates de prélèvements sont représentés dans le Tableau 7.

Tableau 7: Résultats du prélèvement de l'eau du réservoir des couveuses.

Prélèvements	Date	Eau de réservoir
1 (C10)	19/05/11	SCN
2 (C11)	19/05/11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SCN
3 (C13)	19/05/11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
4 (C16)	19/05/11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
5 (C17)	19/05/11	SCN
6 (C18)	19/05/11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
7 (C4)	23/05/11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SCN
8 (C6)	23/05/11	SCN
9 (C8)	23/05/11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
10 (C9)	23/05/11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
11 (C5)	23/05/11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SCN

i. **Fréquence des bactéries isolées à partir de l'eau du réservoir des couveuses:**

Nous avons identifiés 14 souches de bactéries dans l'eau du réservoir des couveuses, qui sont composés de 2 genres de bactéries à pourcentages rapprochés. Résultats sur le tableau 8.

Tableau 8: Pourcentage des microorganismes isolés au niveau de l'eau du réservoir des couveuses.

bactéries isolées	Nombre de bactérie isolée	Pourcentage %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	57%
SCN	6	43%

j. **Niveau de contamination de l'eau distillée dans les bidons de stock:**

Pour confirmer la source de contamination des réservoirs d'eau des couveuses, nous avons effectué 3 prélèvements à partir du stock d'eau distillée qui est prévue pour le remplissage de ces réservoirs (tableau 9).

Tableau 9: Résultats du prélèvement de l'eau des bidons de stocke.

Prélèvements	Eau des bidons de stock
1	SCN <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
2	SCN <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3	SCN

P. aeruginosa a été isolé même dans les stocks des réservoirs d'eau, ce qui confirme l'origine de la contamination de l'eau des réservoirs des couveuses.

k. **Résultat de l'antibiogramme:**

➤ Résultats de l'antibiogramme d'*Escherichia coli*:

L'antibiogramme réalisé sur les souches d'*Escherichia coli* a permis de révéler que sur les 18 souches identifiées, 11 sont de phénotype sauvage et 7 souches sont porteuses de β-lactamase à spectre élargie B.L.S.E (39%). 27,7% résistantes à l'imipénème, Les résultats sont représentés dans le tableau10.

Tableau10: Fréquence des souches d'*Escherichia coli* BLSE isolées sur les surfaces.

Souche identifiée	Phénotype	Nombre de bactéries	pourcentage
<i>Escherichia coli</i>	Sensible	11	61%
<i>Escherichia coli</i>	BLSE	7	39%

➤ Résultats de l'antibiogramme de *Klebsiella pneumoniae*:

D'après les résultats de l'antibiogramme de *Klebsiella pneumoniae*, nous avons 3 souches de phénotype sauvage et 6 souches BLSE (β -lactamase à spectre étendu). Les résultats sont représentés dans le Tableau 11. 5/9 sont résistantes aux fluorquinolones.

Tableau 11: Fréquence des souches de *Klebsiella pneumoniae* BLSE isolées sur les surfaces.

Souche identifiée	Phénotype	Nombre de bactéries	pourcentage
<i>K. pneumoniae</i>	Sensible	3	33%
<i>K. pneumoniae</i>	BLSE	6	67%

➤ Résultats de l'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*:

Nous avons identifié 6 souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline SARM. Les résultats sont représentés dans le Tableau 12. Les autres sont résistantes à 85,7% à la pénicilline, 100% résistantes à l'érytromycine, et 100% sont sensible aux glycopeptides.

Tableau 12: résultats de l'antibiogramme *Staphylococcus aureus*.

Souche identifiée	Phénotype	Nombre de bactéries	pourcentage
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sauvage	1	14%
<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	6	86%

D'après les résultats de l'antibiogramme des entérobactéries et des *staphylococcus aureus*, nous avons obtenus: 39% d'*Escherichia coli* et 67% de *Klebsiella pneumoniae* qui sont productrices des β -lactamase à spectre étendu (BLSE) et 86% de *Staphylococcus aureus* résistant à la mithicilline (SARM). Ce sont des bactéries multirésistantes aux antibiotiques (BMR), elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotique habituellement actif en thérapeutique. Certaines d'entres elles sont à la fois commensales et donc susceptibles de disséminer dans la population générale et à fort potentiel pathogène.

6. Discussion:

La surveillance microbiologique de l'environnement hospitalier est un élément important dans une politique de prévention de l'infection associée aux soins. Elle permet de mettre en œuvre des mesures correctives lorsqu'un mauvais résultat est rendu.

Dans ce travail, nous avons isolé à partir des surfaces des couveuses des taux importants de BMR: 39% d'*E. coli* BLSE, 67% de *K. pneumoniae* BLSE et 86% de *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline SARM.

Ces bactéries multi résistantes (BMR) sont des indicateurs de qualité qui représentent un risque de transmission et d'acquisition aux patients. Et bien que l'acquisition ou le portage n'est pas synonyme d'infection nosocomiale, ceci ne dispense pas des mesures strict d'hygiène observés par le personnel hospitalier.

Les bactériémies à SARM survenant à l'hôpital représentent l'un des meilleurs marqueurs de l'impact clinique de la transmission croisée. Les conséquences de leur diffusion sont cliniques, écologiques et financières. L'environnement hospitalier, les mains des soignants, des visiteurs et les patients constituent un réservoir microbien, susceptible de créer une contamination réelle des couveuses par certaines espèces bactériennes telles que *Staphylococcus aureus*. La prévention de la transmission des microorganismes à partir du matériel ou de l'environnement se base principalement sur les méthodes de bionettoyage adaptées, de désinfection et de stérilisation adéquates.

7. Résultats des prélèvements d'endoscopes

Les endoscopes sont classés parmi les dispositifs médicaux semi-critiques, qui correspondent à un risque infectieux médian, nécessitant un niveau de désinfection intermédiaire, [10].

c. Les endoscopes digestifs

➤ Niveau de contamination des endoscopes:

Selon les critères d'interprétation proposés par le CTLNILS [20], le niveau cible sur un endoscope digestif est atteint lorsque la flore totale <25 UFC/endoscopes avec absence de microorganismes indicateurs dites aussi bactéries à risque nosocomial majeur: *Staphylococcus aureus*, Entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et autre *Pseudomonas*.

Les 3 prélèvements effectués sur des endoscopes digestifs après nettoyage et désinfection, ont démontré une absence de microorganismes indicateurs (*Staphylococcus aureus*,

entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa*, et autres *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter sp* et *Candida sp*). Les *Staphylococcus* à coagulase négative ont été les seuls bactéries isolées. Ceci est probablement dû à une contamination au cours du prélèvement malgré les précautions d'asepsie que nous avons utilisées. Un niveau cible est défini pour le dénombrement de la flore totale qui est < 25 UFC/ endoscope. Les résultats des contrôles microbiologiques des endoscopes digestifs sont représentés dans le Tableau 13.

Tableau 13: Résultats des prélèvements des endoscopes digestifs

Prélèvement	FMAT UFC/endoscope	Bactérie isolées	Niveau de contamination
1	5	SCN	Cible
2	4	SCN	Cible
3	7	SCN	Cible

d. **Les endoscopes bronchiques:**

➤ **Niveau de contamination des endoscopes:**

Selon les critères d'interprétation proposés par le CTLNILS, [20], le niveau d'alerte est atteint lorsque la flore totale varie entre 5 et 25 UFC/endoscopes et absence de microorganisme indicateur (*Staphylococcus aureus*, Entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et autre *pseudomonas*).

Les 4 prélèvements effectués sur des endoscopes bronchiques après nettoyage et désinfection, ont démontré des charges microbiennes élevées avec présence de bactéries indicatrices de type *Pseudomonas aeruginosa*. Ainsi, le niveau d'action est atteint à la majorité des prélèvements. Les bactéries qui ont été isolées sont *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus* à coagulase négative, avec des valeurs supérieures au niveau cible. Les résultats sont représentés dans le Tableau 14.

Tableau 14: Résultats des prélèvements des endoscopes bronchiques.

Prélèvement	FMAT UFC/endoscope	Bactérie isolées	Niveau de contamination
1	140	<i>P. aeruginosa</i>	Action
2	8	SCN	Alerte
3	200	<i>P aeruginosa</i>	Action
4	200	<i>P aeruginosa</i>	Action

➤ Fréquence des bactéries isolées à partir des bronchoscopes:

Pseudomonas aeruginosa de 98% est l'espèce la plus abondante sur les bronchoscopes prélevées. Résultats sur le Tableau 15.

Tableau 15: Pourcentage des microorganismes isolés au niveau des canaux interne des bronchoscopes.

Bactéries isolées	pourcentage
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98%
SCN.	2%

➤ Niveau de contamination de l'eau de rinçage terminale des bronchoscopes:

Pour juger de la qualité de rinçage terminal, nous avons réalisé un prélèvement d'eau de rinçage terminal du laveur-désinfecteur, après constatation d'une présence importante de la flore hydrique (fréquence élevée) dans les canaux des endoscopes bronchiques. Les résultats sont indiqués dans le tableau suivant (Tableau 16).

Tableau 16: Résultats du prélèvement de l'eau de rinçage de l'automate.

Prélèvement	FMAT UFC/endoscope	Bactérie isolées	Niveau de contamination
Eau de rinçage	128	SCN <i>P. aeruginosa</i>	Action

8. Discussion:

D'après les résultats, nous avons retrouvé un niveau cible en ce qui concerne les endoscopes digestifs. C'est un résultat satisfaisant qui témoigne de l'efficacité des procédures de désinfections.

Par contre, nous avons constaté un niveau d'action en ce qui concerne les bronchoscopes, qui estime qu'il existe un risque infectieux potentiel pour les patients. Ce niveau doit impérativement déclencher une réaction immédiate par arrêt de l'utilisation de l'endoscope, analyse des causes du dysfonctionnement et mise en œuvre d'actions correctives.

D'après les résultats obtenue à partir d'un prélèvement réaliser sur l'eau de rinçage terminal du laveur-désinfecteur, nous avons isolé les même genres bactériennes (*Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus à coagulase négative*) obtenu lors de l'analyse des bronchoscopes, ce qui implique qu'il peut y avoir une contamination entre les endoscopes

lors du traitement parce que ces derniers subissent un nettoyage dans la même solution de désinfection.

Conclusion

Au terme de ce travail, les résultats des analyses microbiologiques ont révélé la présence de bactéries multirésistantes (BMR) notamment: *Escherichia coli* BLSE, *Klebsiella pneumoniae* BLSE et *Staphylococcus aureus* SARM, et *Pseudomonas aeruginosa*. Cette contamination est due essentiellement à un dysfonctionnement dans la procédure d'entretien des couveuses et de la désinfection des endoscopes. Cette étude a permis de mettre en évidence l'importance du contrôle microbiologique dans une démarche qualité, ainsi que l'impact des procédures d'entretien et de désinfection des dispositifs médicaux correctement appliqués dans la prévention de l'infection nosocomiale et dans le contrôle de la dissémination des BMR. Des protocoles et des procédures doivent être rédigés, validés et régulièrement évalués par le Comité de Lutte contre l'Infection Nosocomiale (CLIN) de chaque établissement de soin.

Référence bibliographique

- (1) Etat des lieux des Infections Nosocomiales dans huit Hôpitaux Universitaires de Rabat 8 juin 2006.
- (2) Avril JL & Carlet J. Les infections nosocomiales et leur prévention. Ellipses, Paris, 1998, 679
- (3) Pole Santé Sécurité Soins du Médiateur de la République, 1, 3 p.
- (4) Vincent A, Saint Genis Laval et al. Fiche conseils pour les préventions du risque infectieux infection Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiale Sud-Est Octobre 2008.
- (5) Alaoui A.S., M. Zouhdi, A. A Benouda, M Bourjouane, M A Alaoui. Infections nosocomiales Biologie Infectiologie 1999-Tome V- N I. Les infections nosocomiales. Med et Hyg 1995; 53: 1687-9.
- (6) El Rhazi K, S. Elfakir, M. Berraho, N. Tachfouti, Z. Serhier, C. Kanzaa, C. Nejjari. 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, 2007.
- (7) Cavallo JD., G. Antoniotti, N. Baffoy et al. Surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé Air,eaux et surfaces,Ministère chargé de la santé, DGS/DHOS, CTIN, 2002
- (8) Steinmetz Anne-Claire, Blandine Larcher-Micouin. Le praticien en anesthésie-réanimation, 2005, 9, 6. (491-494 pages)
- (9) Université Claude Bernard –Lyon I Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques 6/11/2003.
- (10) Steinmetz Anne-Claire, Blandine Larcher-Micouin. Le praticien en anesthésie-réanimation, 2005, 9, 6. (488-489 pages)
- (11) Hygiène Prévention et Contrôle de l'infection Précautions Standard - dispositifs médicaux et matériel. V. 2.0 du 19/12/2007.
- (12) Aubril.A, M Ciais, N. Didier.,et al Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiale Paris Nord Mars 2002.
- (13) Travaux de Synthèse, BE L Electronique Septembre 2000
- (14) Eric Charles, Journaliste, M D Report, cahiers de la pouéri culture- Septembre 2006-N° 199.
- (15) Adam N., Calleman, D.Bloc, et al. Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiale Ouest Recommandation pour l'Entretien des Incubateurs de néonatalogie version 2-1999.9.
- (16) Azcon F., F.Baute, J.Bendayon, et al. , Hygiène et Neonatalogie Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiale Sud –Est, vention 1, Octobre 1997.

- (17) Gourieux .B, Strasbourg. Entretien du materiel d'endoscopie Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiale Sud -Est, Mai 2004.
- (18) Bou R, Aguillar, Perpinan. J et *al*, Nosocomial, (autbreat of pseudomonas aeruginosa infections related to a tlexible bronchoscope) J Hosp Infect 2006; 64(2): 129-35
- (19) Marchetti B, L Pinneau, et *al* Infection à agents transmissibles conventionnels liées à l'endoscopie digestive. Hygiène 2002; X(6): 379-87.
- (20) B Marchetti, B.Pozzetto, et *al*, Acta Endoscopica 2006, 2:498 p.
- (21) Steinmetz-A-C, L-M Blandine, donnée pratiques sur le traitement des dispositifs médicaux des Infections de Stérilisation. Le praticien en anesthésie- réanimation, 2005, 9, 6.
- (22) Bonnes pratiques de désinfection des dispositifs médicaux. (2003). Guide pour l'utilisation des laveurs désinfecteurs d'endoscopes. Ministère de la Santé, de la Famille et des Personnes handicapées.
- (23) Standards New Zealand. 2001. DZ8149-Guide line for microbiological surveillance of flexible hollow endoscopes. Wellington, New Zealand.
- (24) CAVALLO J D, H CHARDON, C CHIDIAC, et *al* comité de l'antibiogramme de la Société Française de microbiologie. Janvier 2005.