

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار - عنابة

Université Badji Mokhtar-Annaba



FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

LABORATOIRE : EAU ET ENVIRONNEMENT

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

En Microbiologie

Option : MICROBIOLGIE APPLIQUEE

Thème :

**Emergence en milieu hospitalier des bacilles Gram négatifs multirésistants aux antibiotiques : étude bactériologique et moléculaire**

Présentée par : Mme DEBABZA Manel

Devant le jury :

Directrice de thèse:	Mme CHETTIBI. H	MCA. Université Badji- Mokhtar (Annaba)
Président :	Mr BRANES. Z	Prof. Université Badji- Mokhtar (Annaba)
Examineur :	Mr ARHAB. R	Prof. Université Larbi Ben M'hidi (Oum El-Bouaghi)
Examineur :	Mr DJABRI. B	MCA. Université Larbi Tebessi (Tébessa)

N° DB...../2015

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2014-2015

## ملخص

يهدف هذا البحث إلى تقييم تواتر البكتيريا السالبة لصبغة غرام متعددة المقاومة في مختلف المواقع من المحيط الأستشفائي و تحديد خصائص جينات المقاومة التي تشفر إنزيمات البييتالاكتماز ذات الطيف الموسعة. إن السلالات المعزولة تم التعريف بها حسب الخصائص البكتريولوجية الكلاسيكية. ولقد تم دراسة حساسية السلالات البكتيرية المعزولة للمضادات الحيوية بطريقة الانتشار في الأقراص.

إن إنتاج إنزيمات البييتالاكتماز ذات الطيف الموسعة عند السلالات البكتيرية المعزولة أنجز عن طريق إجراء ثلاثة فحوص: فحص التصارع, فحص تقارب الأقراص, و الفحص ثنائي التصارع. أثبتت بلاسميدات المقاومة من خلال عملية التهجير الكهربائي على هلام الاغاروز و البحث عن الجينات *bla TEM* و *bla SHV*, *bla CTX-M-1* و *qnr* اجري باستعمال تقنية تفاعل البوليميرز المتسلسل.

306 سلالة من عصيات سالبة لصبغة غرام تم عزلها من المحيط الأستشفائي, منها 74,51 % بكتيريا معوية ممثلة أساسا بالمجموعة K.E.S. دراسة الحساسية للمضادات الحيوية بينت إن السلالات المعزولة أظهرت مقاومة لجميع عائلات المضادات الحيوية خاصة البييتالاكتامين مع فعالية ملحوظة للايميبينام و الامينوزيد و الفليوروكينولون . فحوص الكشف سمحت بتحديد 114 سلالة منتجة للبييتالاكتماز ذات الطيف الموسعة أي 50% من مجموع البكتيريا المعوية المعزولة.

إن تحليل مختلف البلاسميدات اظهر أن السلالات المتعددة المقاومة تحوي من 1 إلى 4 بلاسميدات ذات أحجام مختلفة من 1 كيلو قاعدة إلى 170 كيلو قاعدة. إن تجارب التزاوج البكتيري التي أجريت, أظهرت النقل المرافق للمقاومة ضد الجانتاميسين و ضد الكوتريموكزازول على بلاسميدات ذات حجم 10, 20, 125 أو 165 كيلو قاعدة .

إن تقنية تفاعل البوليميرز المتسلسل التي أجريت على السلالات المحولة بالتزاوج سمحت بالعثور على الجينات *bla TEM* و *bla SHV* و *bla CTX-M-1*. أما فيما يخص البحث الجزيئي للمقاومة ضد الكينولون, أظهرت النتائج نقل الجينات *qnr B* على بلاسميدات ذات 125 كيلو قاعدة.

هذه الدراسة أظهرت أن المحيط الأستشفائي في منطقة تبسة ملوث بعصيات سالبة لصبغة غرام متعددة المقاومة و خاصة البكتيريا المعوية المنتجة للبييتالاكتماز ذات الطيف الموسعة, و انه قد يكون مصدرا هاما للأمراض و هذا ما يتطلب اقتراح توصيات داخل المؤسسات الصحية.

**الكلمات المفتاحية:** المحيط الأستشفائي, عصيات سالبة لصبغة غرام, عدوى المستشفيات, المقاومة للمضادات الحيوية, البييتالاكتماز ذات الطيف الموسعة.

## Résumé

L'objectif de ce travail était d'évaluer la fréquence des bacilles à Gram négatif multi résistants dans différents sites du milieu hospitalier à Tébessa et de caractériser des gènes de résistance codant les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE). Les souches ont été identifiées suivant les critères bactériologiques classiques. Un antibiogramme a été réalisé par la méthode de diffusion des disques. La production de BLSE chez les souches a été détectée par les tests : test de synergie, test de rapprochement des disques et test du double disque. Les plasmides de résistance ont été révélés par électrophorèse sur gel d'agarose et la recherche des gènes *bla TEM*, *bla SHV*, *blaCTX-M-1* et des gènes *qnr* a été réalisée par PCR classique.

306 souches de bacilles à Gram négatif (BGN) ont été isolées de l'environnement de l'hôpital dont 74,51% des entérobactéries, représentées principalement par le groupe K.E.S. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a montré que les souches isolées expriment à des degrés variés, une résistance aux antibiotiques des différentes familles, en particulier aux  $\beta$ -lactamines, avec cependant une efficacité remarquable de l'imipénème, des aminosides et des fluoroquinolones. Les tests de détection des BLSE ont permis de caractériser 114 souches productrices de BLSE, soit 50% des entérobactéries isolées.

L'analyse des profils plasmidiques a montré que les souches de BGN multi résistantes hébergent de 1 à 4 plasmides de différentes tailles allant de 1Kb à 170Kb. Les expériences de la conjugaison réalisées ont montré le co-transfert de la résistance à la gentamicine et au cotrimoxazole sur des plasmides de 10Kb, 20Kb, 125Kb ou 165Kb. La PCR des souches transconjugantes a permis de détecter les gènes *bla CTX-M-1*, *bla TEM* et *bla SHV*. Concernant la recherche moléculaire de la résistance aux quinolones, les résultats ont montré la présence des gènes *qnrB* transférés sur des plasmides de 125Kb. Notre étude montre que l'environnement hospitalier dans la région de Tébessa est fréquemment contaminé par les BGN multi résistantes en particulier les entérobactéries productrices de BLSE, et qu'il peut être une source potentielle des épidémies ce qui incite à proposer des recommandations au sein des structures sanitaires.

**Mots clés :** environnement hospitalier, bacilles à Gram négatif, infections nosocomiales, résistance aux antibiotiques, bêta-lactamases à spectre étendu

## Abstract

The objective of this work was to evaluate the frequency of multi-resistant Gram-negative bacilli from different sites of the hospital environment at Tébessa and characterize resistance genes encoding beta-lactamase extended spectrum (ESBL). The strains were identified by conventional bacteriological criteria. Susceptibility testing was performed by disk diffusion method. ESBL production in strains was detected by testing: synergy test, approximation test and double disc assay. The resistance plasmids were revealed by electrophoresis on agarose gel and search of *blaTEM*, *blaSHV*, *blaCTX-M-1* and *qnr* genes was performed by standard PCR.

306 Gram-negative bacilli (GNB) strains were isolated from the hospital environment including 74.51% of enterobacteria, represented mainly by the K.E.S group. The study of antibiotic susceptibility showed that the strains isolated express resistance to antibiotics of different families, especially  $\beta$ -lactams with remarkable effectiveness of imipenem, aminoglycosides and fluoroquinolones. The ESBL detection tests have allowed characterizing 114 ESBL-producing strains, or 50% of enterobacteria isolated.

The plasmid analysis showed that multi resistant GNB strains harboring 1-4 plasmids ranging in size from 1 kb to 170Kb. The experiments of conjugation performed showed the co-transfer of resistance to gentamicin and cotrimoxazole on 10Kb plasmids, 20Kb, 125Kb or 165Kb.

The PCR of transconjugant strains have allowed to detecting the genes *bla CTX-M-1*, *bla TEM* and *blaSHV*. Regarding molecular research of resistance to quinolones, the results showed the presence of genes *qnrB* transferred by plasmids of 125Kb.

Our study shows that the hospital environment in the Tébessa region is frequently contaminated by multi resistant GNB especially enterobacteria producing ESBL and it can be a potential source of epidemics prompting propose recommendations within health structures.

**Key words:** hospital environment, Gram-negative bacilli, nosocomial infections, antibiotic resistance, extended-spectrum beta-lactamases

## REMERCIEMENTS

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

*Je dois l'aboutissement de cette thèse à de nombreuses personnes. Tout d'abord, Je voudrais témoigner ma reconnaissance à ma directrice, Mme **CHETTIBI Houria**, pour m'avoir permis de travailler sur un projet des plus intéressants où j'ai pu me familiariser avec différentes techniques de microbiologie et de biologie moléculaire. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour sa grande disponibilité et pour son écoute attentive. Et delà de sa compréhension, j'ai beaucoup apprécié la confiance qu'elle m'a toujours accordée, et grâce à laquelle j'ai bénéficié d'une grande liberté dans mon travail.*

*A Mr **BRANES Zidane** pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury, qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse reconnaissance.*

*Je remercie vivement les membres examinateurs pour avoir accepté d'évaluer ce travail, particulièrement :*

*Le professeur **ARHAB Rabah** (université d'Oum Elbouaghi) pour avoir accepté de juger ce travail. Qu'il me soit permis de lui exprimer ma profonde reconnaissance et ma haute considération.*

*Monsieur **DJABRI Belkacem** (maitre de conférence à l'université de Tébessa) d'avoir accepté de juger ce travail. Je suis reconnaissante pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et je tiens à lui exprimer à cet égard mes sincères remerciements.*

*Je souhaite exprimer mes sincères et profonds remerciements à Mme **Toumi Nassima**, Docteur en Génétique et Biologie moléculaire à l'université de Tébessa, pour son aide, ses conseils très précieux, ses encouragements et l'ambiance amicale qu'elle a su créer. Je suis très reconnaissante de son soutien dans les moments difficiles que j'ai vécu au cours de la réalisation de la partie moléculaire.*

*Je tiens à remercier mes collègues **Dr Tine Fouzia** et **Dr Tine Samir** pour leur aide dans la réalisation des tests statistiques, ainsi que pour leurs encouragements et leur soutien.*

*J'adresse mes remerciements également à tous les étudiants que j'ai encadré en DES ou en Maser qui ont contribué à ce présent travail.*

*Enfin J'exprime toute ma reconnaissance à mon mari **BASSET** pour son incommensurable patience, sa compréhension, son soutien inconditionnel et sa collaboration dans ce travail.*

## DEDICACES

*A la mémoire de mon père*

*A ma mère*

*A ma petite famille : Basset, Taha Abderrahim et Mouataz Chahine*

*A mes sœurs : Chaouia et Souad*

*A mes frères : Salim, Tarek et Mahdi*

*A toutes mes amies : Nadjette, Fouzia, Salima, Nassima, Mabrouka  
et Hadda*

*A tous ceux qui m'ont aidé dans mes études*

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

## Liste des tableaux

N°	Titre du tableau	Page
<b>01</b>	Zones à risque à l'hôpital	<b>10</b>
<b>02</b>	Exemples de réservoirs environnementaux d'agents infectieux et leur degré d'implication dans la survenue d'infections	<b>15</b>
<b>03</b>	Exemples de réservoirs hydriques d'agents infectieux et leur degré d'implication dans la survenue d'infections	<b>15</b>
<b>04</b>	Principaux caractères distinctifs des <i>Proteus-Providencia</i>	<b>24</b>
<b>05</b>	Caractères différentiels des <i>Pseudomonas</i>	<b>29</b>
<b>06</b>	Entérobactéries et $\beta$ -lactamines : groupes de résistance naturelle	<b>43</b>
<b>07</b>	Résistances naturelles des entérobactéries aux $\beta$ -lactamines	<b>44</b>
<b>08</b>	Phénotypes de résistance des entérobactéries aux $\beta$ -lactamines	<b>45</b>
<b>09</b>	$\beta$ -lactamines et entérobactéries du groupe I	<b>46</b>
<b>10</b>	$\beta$ -lactamines et entérobactéries du groupe II	<b>47</b>
<b>11</b>	$\beta$ -lactamines et entérobactéries du groupe III et groupe IV	<b>47</b>
<b>12</b>	Phénotypes de résistance des entérobactéries aux aminosides	<b>48</b>
<b>13</b>	Phénotypes de résistance des entérobactéries aux quinolones	<b>49</b>
<b>14</b>	<i>P. aeruginosa</i> et $\beta$ -lactamines	<b>50</b>
<b>15</b>	Phénotypes de résistance de <i>P. aeruginosa</i> aux aminosides	<b>53</b>
<b>16</b>	<i>P. aeruginosa</i> et fluoroquinolones	<b>53</b>
<b>17</b>	Liste des antibiotiques testés sur les entérobactéries	<b>68</b>
<b>18</b>	Liste des antibiotiques testés sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>69</b>
<b>19</b>	Liste des antibiotiques testés sur <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> et <i>Burkholderia cepacia</i>	<b>69</b>
<b>20</b>	Liste des antibiotiques testés sur <i>Aeromonas</i> et autres BGN	<b>70</b>
<b>21</b>	Schéma du mode opératoire pour la détermination des CMI par la technique de dilution en milieu liquide	<b>77</b>
<b>22</b>	Amorces utilisées dans l'étude	<b>84</b>
<b>23</b>	Protocoles de PCR	<b>84</b>
<b>24</b>	Composition des mélanges réactionnels pour les PCR	<b>85</b>



### Liste des tableaux (suite)

N°	Titre du tableau	Page
25	Souches bactériennes utilisées comme contrôle positif pour les réactions de PCR	85
26	Répartition détaillée des souches isolées	89
27	Répartition des différentes catégories de BGN selon les servies	105
28	Distribution des différents groupes de BGN selon les sites de prélèvements	123
29	Taux de contamination des différentes catégories de sites	124
30	Pourcentage de sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries isolées	126
31	Phénotypes de résistance aux aminosides des souches de <i>P. aeruginosa</i>	133
32	Résultats des tests de détection des BLSE	143
33	Les différents échantillons présentant plusieurs souches EBLSE	150
34	Pourcentage de sensibilité aux antibiotiques des EBLSE isolées	155
35	Concentrations minimales inhibitrices, sensibilité aux antibiotiques et profils plasmidiques des souches EBLSE sélectionnées et leur souche réceptrice	159
36	Caractéristiques des souches transconjugantes	163
37	Classification des $\beta$ -lactamases d' après Bush-Jacoby-Medeiros	207
38	Prélèvements réalisés au cours de la période d'étude	208
39	Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api 20E	215
40	Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api 20NE	216
41	Solutions utilisées pour l'extraction de l'ADN plasmidique	217

## Liste des figures

<b>N°</b>	<b>Titre de la figure</b>	<b>Page</b>
<b>01</b>	Chaîne épidémiologique de transmission d'agents infectieux	<b>11</b>
<b>02</b>	Algorithme des principaux genres des BGNnF	<b>27</b>
<b>03</b>	Mécanismes de résistance des bactéries Gram-négatives, et les antibiotiques touchés	<b>38</b>
<b>04</b>	Description de l'image de synergie	<b>73</b>
<b>05</b>	Schéma explicatif du test de rapprochement des disques	<b>74</b>
<b>06</b>	Schéma explicatif du test du double disque	<b>75</b>
<b>07</b>	Principe de l'électrophorèse sur gel d'agarose	<b>80</b>
<b>08</b>	Production de la pyocyanine sur le milieu King A	<b>88</b>
<b>09</b>	Test de solubilité de la pyocyanine dans le chloroforme	<b>88</b>
<b>10</b>	Production de la pyoverdine sur le milieu King B	<b>88</b>
<b>11</b>	Test de fluorescence de la pyoverdine sous UV	<b>88</b>
<b>12</b>	Production de la pyorubine sur le milieu King A	<b>88</b>
<b>13</b>	Répartition des souches en fonction des groupes de BGN	<b>90</b>
<b>14</b>	Répartition des souches en fonction des espèces	<b>92</b>
<b>15</b>	Répartition des BGN nF en fonction des espèces	<b>95</b>
<b>16</b>	Répartition des souches en fonction des services	<b>104</b>
<b>17</b>	Répartition des entérobactéries et des BGNnF dans les différents services	<b>105</b>
<b>18</b>	Répartition des différents groupes de BGN selon les différentes catégories de sites environnementaux	<b>124</b>
<b>19</b>	Sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries isolées	<b>127</b>
<b>20</b>	Sensibilité aux antibiotiques des souches de <i>P. aeruginosa</i>	<b>131</b>

### Liste des figures (suite)

N°	Titre de la figure	Page
21	Répartition des phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines de <i>P. aeruginosa</i>	133
22	Sensibilité aux antibiotiques des souches d' <i>A. baumannii</i>	135
23	Sensibilité aux antibiotiques des souches de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	136
24	Sensibilité aux antibiotiques des souches de <i>Burkholderia cepacia</i>	137
25	Sensibilité aux antibiotiques des souches d' <i>Aeromonas hydrophila</i>	138
26	Répartition des BGNMR selon les services	140
27	Taux de contamination des différents sites par les BGNMR	141
28	Test de synergie positif de la souche Sf9	144
29	Test de synergie positif de la souche Sp31	144
30	Test de rapprochement des disques positif de la souche Sf11	144
31	Test de rapprochement des disques positif de la souche Sm25	144
32	Test du double disque positif de la souche Sf11	145
33	Test du double disque positif de la souche EI9	145
34	Répartition des EBLSE selon les espèces	146
35	Répartition des EBLSE selon les services	148
36	Sensibilité aux antibiotiques des EBLSE	156
37	Gel d'agarose des produits PCR du gène <i>bla SHV</i>	161
38	Gel d'agarose des produits PCR du gène <i>bla CTX-M-1</i>	162
39	Gel d'agarose des produits PCR du gène <i>bla TEM</i>	162
40	Gel d'agarose des produits PCR du gène <i>qnr B</i>	167

## Liste des abréviations

**%** : Pourcent

**°C** : Degré Celsius

**AAC** : Aminoglycoside acétyltransférases

**ADH** : Arginine dihydrolase

**ADI** : Acide adipique

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AK** : Amikacine

**AMC** : Amoxicilline + Acide clavulanique

**Amino** : Aminopénicillines

**AMX** : Amoxicilline

**AMY** : Amygdaline

**ANT** : Aminoglycoside nucléotidyltransférases

**APH** : Aminoglycoside phosphotransférases

**API 20E** : Analytical profile index 20E (E= Entérobactéries)

**API 20NE** : Analytical profile index 20 Non Entérobactéries

**ARA** : L-arabinose

**ARN** : Acide ribonucléique

**ARNr** : Acide ribonucléique ribosomal

**ATB** : Antibiotique

**ATM** : Aztréonam

**BET** : Bromure d'éthidium

**BGN** : Bacille à Gram négatif

**BGNMR** : Bacilles Gram négatifs multi résistants

**BGNnF** : Bacille à Gram négatif non fermentaire

**BL** :  $\beta$ -lactamases

**bla** :  $\beta$ -lactamine

**BLSE** :  $\beta$ -lactamase à spectre élargi

**BMR** : Bactérie multirésistante

**C** : Chloramphénicol

**C1G** : Céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération

**C2G** : Céphalosporines de 2<sup>ème</sup> génération

**C3G** : Céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération

**C4G** : Céphalosporines de 4<sup>ème</sup> génération

**CAP** : Acide caprique

**Carbox**: Carboxypénicillines

**Case**: Céphalosporinase

**Case BN** : Céphalosporinase de bas niveau

**Case HN** : Céphalosporinase de haut niveau

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

**CAZ**: Ceftazidime

**CDC** : Centers for Disease Control and Prevention

**CIP**: Ciprofloxacine

**Clav**: Acide clavulanique

**CMI**: Concentration minimale inhibitrice

**COT**: Cotrimoxazole

**CPO**: Cefpirome

**CRO**: Ceftriaxone

**CTX**: Céfotaxime

**CTX-M** : Céfotaximase-Muenchen

**CXM**: Céfuroxime

**dNTP** : désoxyribonucléotide tri-phosphate

**EBLSE** : Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi

**EcBLSE** : *E. coli* productrices de de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu

**EDTA**: Éthylène-diamine-tétra-acétique

**EPH** : Etablissement public hospitalier

**ERV** : *Enterococcus* résistants à la vancomycine

**ESC** : Esculine

**F** : Nitrofuranes

**FEP**: Céfépime

**FOS**: Fosfomycine

**FOX**: Céfoxitine

**GC** : Gélose au cétrimide  
**GEL** : Gélatinase  
**GES** : Guyana Extended Spectrum bêta-lactamase  
**GLU** : Glucose  
**GN**: Gentamicine  
**GNT** : Potassium gluconate  
**H<sub>2</sub>S** : Sulfure d'hydrogène  
**I**: Intermédiaire  
**Imp** : imperméabilité  
**IN**: Infection Nosocomiale  
**IND** : Indole  
**INO** : Inositol  
**IPM** : Imipénème  
**IPMase** : imipénémase  
**IUN** : Infection urinaire nosocomiale  
**K**: Kanamycine  
**Kb** : Kilo base  
**KBLSE** : *Klebsiella* productrices de de β-lactamases à spectre étendu  
**KES** : *Klebsiella-Enterobacter-Serratia*  
**KF** : Céfalotine  
**KpBLSE** : *K. pneumoniae* productrices de β-lactamases à spectre étendu  
**LB** : bouillon Luria -Bertani  
**LDC**: Lysine décarboxylase  
**LED** : Lupus érythémateux disséminé  
**LPS**: Lipopolysaccharide  
**m** : mètre  
**MAL** : D-maltose  
**MAN** : D-mannitol  
**MC** : Gélose Mac Conkey  
**MCV**: Mucoviscidose  
**MDR**: Multiple drug resistance

**MEC:**Mécillinam  
**MEL :** D-melibiose  
**MEM:**Méropénème  
**MF :** Mac Farland  
**MH :** Mueller Hinton  
**MHLAC :** Mueller-Hinton liquide ajusté en cations  
**MLT :** Acide malique  
**mm :** millimètre  
**MNE :** D-mannose  
**MOX:** Moxalactam  
**N<sub>2</sub> :** Azote  
**NA:** Acide nalidixique  
**NAG :** N-acétyl-glucosamine  
**NET:** Nétilmicine  
**NIT :** Nitrate réductase  
**nm :** nanomètre  
**NO<sub>2</sub> :** Nitrites  
**NO<sub>3</sub> :** Nitrates  
**NOR :** Norfloxacin  
**ODC :** Ornithine décarboxylase  
**OFX :** Ofloxacin  
**ONPG :** Ortho-Nitrophényl-β-galactoside  
**ORL:** Oto-rhino-laryngologie  
**OXA:** Oxacilline  
**PAC :** Acide phénylacétique  
**Pase :** Pénicillinase  
**Pase BN :** Pénicillinase de bas niveau  
**Pase HN :** Pénicillinase de haut niveau  
**pb:** paire de base  
**PCR :** Polymerase chain reaction  
**PEF:** Péfloxacin

**Péni** : Pénicilline  
**PER** : P. Normann, E. Ronco, R. Labia  
**PHB** : Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate  
**PI**: Acide pipémidique  
**PIP**: Pipéracilline  
**PLP**: Protéines Liant les Pénicillines  
**PNPG** : 4-nitrophényl- $\beta$ D-galactopyranoside  
**qnr** : Quinolone resistance gene  
**R**: Résistant  
**RCA** : République centrafricaine  
**RHA** : L-rhamnose  
**Rif** : Rifampicine  
**rpm** : Rotation per minute  
**S** : Sensible  
**SAC** : D-saccharose  
**SARM**: *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline  
**SDS** : Sodium Dodécyl Sulfate  
**SHV**: SulfiHydroxyl Variable  
**SIDA** : Syndrome d'immunodéficience acquise  
**SOR** : D-sorbitol  
**SS** : Gélose *Salmonella-Shigella*  
**SXT**: Triméthoprime-Sulfaméthoxazole  
**TAE**: Tris Acétate EDTA  
**TCC**: Ticarcilline + Acide clavulanique  
**TDA**: Tryptophane désaminase  
**TE**: Tétracyclines  
**TEM** : Temnoniera  
**TIC**: Ticarcilline  
**Tm**: Temperature of melting  
**TMP**: Triméthoprime  
**TOB**: Tobramycine



**TRI:** TEM résistante aux inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases

**TRP :** L-tryptophane

**TTR :** Tétrathionate-réductase

**TZP :** Tazobactam

**UFC :** Unités formant colonie

**URE :** Uréase

**Uréido:** Uréidopénicillines

**USI :** Unités des soins intensifs

**UV:** Ultraviolet

**V :** Volt

**VEB :** Vietnam Extended Spectrum Bêta-lactamase

**VP:** Voges Proskauer

**$\mu\text{g}$  :** Microgramme

**$\mu\text{l}$  :** Microlitre

**$\mu\text{m}$  :** Micromètre

## TABLE DES MATIÈRES

	page
RÉSUMÉ (en Arabe).....	i
RÉSUMÉ (en français).....	ii
RÉSUMÉ (en Anglais).....	iii
REMERCIEMENTS.....	iv
DEDICACES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES ABREVIATIONS.....	xi
TABLE DES MATIÈRES.....	xvii
INTRODUCTION.....	01

## PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### CHAPITRE I : L'environnement hospitalier

1. Définition de l'environnement hospitalier.....	05
2. Les micro-organismes présents dans l'environnement hospitalier.....	05
3. Survie des micro-organismes dans l'environnement.....	06
4. Contamination de l'environnement par les micro-organismes.....	08
4.1. L'eau.....	08
4.2. L'air.....	08
4.3. Les surfaces.....	08
5. Zones à risque à l'hôpital .....	09
6. Place de l'environnement hospitalier dans la chaîne épidémiologique.....	10
7. Rôle de l'environnement dans la survenue des infections nosocomiales.....	13
7.1. Environnement et infections nosocomiales épidémiques.....	13
7.2. Environnement et infections nosocomiales endémiques.....	14

## CHAPITRE II : Bacilles Gram négatifs responsables des infections nosocomiales

<b>1.</b>	Entérobactéries .....	17
	1.1. <i>Escherichia coli</i> .....	17
	1.2. <i>Salmonella</i> .....	19
	1.3. <i>Klebsiella-Enterobacter-Serratia</i> .....	20
	1.3.1. <i>Klebsiella</i> .....	21
	1.3.2. <i>Enterobacter</i> .....	21
	1.3.3. <i>Serratia</i> .....	22
	1.3.4. Pouvoir pathogène du groupe K. E. S.....	23
	1.4. <i>Proteus-Providencia</i> .....	23
	1.5. <i>Citrobacter</i> .....	25
<b>2.</b>	Bacilles Gram négatifs non fermentaires .....	26
	2.1. Caractères généraux.....	26
	2.2. Sources et réservoirs des BGNnF en milieu hospitalier.....	27
	2.3. <i>Pseudomonas</i> .....	28
	2.3.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	29
	2.4. <i>Acinetobacter</i> .....	30
	2.5. <i>Burkholderia cepacia</i> .....	31
	2.6. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	33
<b>3.</b>	<i>Aeromonas</i> .....	34

## CHAPITRE III : Résistance aux antibiotiques des bacilles Gram négatifs

<b>1.</b>	Résistance aux antibiotiques.....	36
	1.1. Définition.....	36
	1.2. Types de résistance .....	36
	1.2.1. Résistance naturelle .....	36
	1.2.2. Résistance acquise .....	36
	1.3. Niveaux de résistance .....	37

1.4. Mécanismes de Résistance .....	38
1.5. Phénotype de résistance .....	39
2. Résistance des entérobactéries aux antibiotiques.....	39
2.1. Entérobactéries et $\beta$ -lactamines.....	39
2.1.1. Définition et classification des $\beta$ -lactamases.....	39
2.1.2. $\beta$ -lactamases à spectre élargi.....	41
2.1.3. Diversité des types de BLSE.....	42
2.1.4. Résistances naturelles.....	43
2.1.5. Résistances acquises.....	44
2.2. Entérobactéries et aminosides.....	48
2.3. Entérobactéries et quinolones.....	48
3. Résistance des BGNnF aux antibiotiques.....	49
3.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	49
3.1.1. Résistance aux $\beta$ -lactamines.....	50
3.1.1.1. Phénotypes de résistance .....	50
3.1.1.2. Mécanismes de la résistance acquise.....	50
3.1.2. Résistance aux aminosides .....	52
3.1.3. Résistance aux fluoroquinolones.....	53
3.2. <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	54
3.2.1. Résistance aux $\beta$ -lactamines.....	54
3.2.1.1. Résistance naturelle .....	54
3.2.1.2. Résistance acquise .....	54
3.2.2. Résistance aux aminosides.....	55
3.3. <i>Burkholderia cepacia</i> .....	55
3.4. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	56
3.4.1. Résistance aux $\beta$ -lactamines.....	56
3.4.2. Résistance aux aminosides .....	56
3.4.3. Résistance aux fluoroquinolones.....	56
4. <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	57
4.1. Résistance naturelle.....	57
4.2. Résistance acquise.....	57

## **PARTIE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES**

1. Cadre de l'étude.....	58
2. Réalisation des prélèvements.....	58
3. Isolement .....	59
4. Purification.....	59
5. Conservation des souches.....	60
6. Identification biochimique.....	60
6.1. Test d'oxydase.....	60
6.2. Identification biochimique par la galerie API20E .....	61
6.3. Identification biochimique par la galerie API20NE .....	63
6.4. Recherche des pigments spécifiques de <i>Pseudomonas</i> .....	65
7. Etude de la sensibilité aux antibiotiques.....	66
8. Recherche phénotypique des BLSE.....	72
8.1. Test de synergie .....	72
8.2. Test du rapprochement des disques.....	73
8.3. Test du double disque.....	74
9. Détermination des concentrations minimales inhibitrices .....	75
10. Extraction de l'ADN plasmidique.....	78
10.1. Extraction par la lyse alcaline.....	78
10.2. Qualité et quantification de l'extrait .....	79
11. Electrophorèse en gel d'agarose .....	80
12. Caractérisation des souches productrices de BLSE.....	82
12.1. Transfert des gènes de résistance par conjugaison.....	82
12.2. Amplification des gènes de résistance par PCR.....	83

## **PARTIE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION**

<b>1. Isolats bactériens .....</b>	<b>86</b>
<b>1.1. Aspect macroscopique des isolats .....</b>	<b>86</b>
<b>1.2. Aspect microscopique.....</b>	<b>87</b>
<b>2. Identification biochimique .....</b>	<b>87</b>
<b>2.1. Répartition des souches en fonction du groupe de BGN .....</b>	<b>90</b>
<b>2.2. Répartition des souches en fonction du genre .....</b>	<b>90</b>
<b>2.3. Répartition des souches en fonction des espèces.....</b>	<b>91</b>
<b>2.3.1. Entérobactéries.....</b>	<b>92</b>
<b>2.3.2. Les bacilles Gram négatifs non fermentaires .....</b>	<b>94</b>
<b>2.3.3. Autres BGN .....</b>	<b>101</b>
<b>2.4. Répartition des souches en fonction des services.....</b>	<b>103</b>
<b>2.5. Répartition des souches en fonction de l'origine du prélèvement.....</b>	<b>112</b>
<b>2.6. Répartition des souches par catégories de sites .....</b>	<b>123</b>
<b>2.7. Relation entre la qualité du nettoyage ou de désinfection des services, la contamination bactérienne environnementale et les infections nosocomiales .....</b>	<b>125</b>
<b>3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques .....</b>	<b>126</b>
<b>3.1. Entérobactéries .....</b>	<b>126</b>
<b>3.1.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....</b>	<b>128</b>
<b>3.1.2. <i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>128</b>
<b>3.1.3. <i>Ewingella americana</i>.....</b>	<b>129</b>
<b>3.1.4. <i>Cedecea neteri</i> .....</b>	<b>129</b>
<b>3.2. Bacilles Gram négatifs non fermentaires .....</b>	<b>130</b>
<b>3.2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....</b>	<b>130</b>
<b>3.2.2. <i>Acinetobacter baumannii</i>.....</b>	<b>133</b>
<b>3.2.3. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>.....</b>	<b>135</b>
<b>3.2.4. <i>Burkholderia cepacia</i>.....</b>	<b>135</b>
<b>3.3. Autres bacilles à Gram négatif.....</b>	<b>137</b>
<b>3.3.1. <i>Aeromonas hydrophila</i>.....</b>	<b>137</b>

3.3.2. <i>Pasteurella pneumotropica</i> .....	138
3.3.3. <i>Vibrio fluvialis</i> .....	138
<b>4. Bacilles à Gram négatif multirésistants .....</b>	<b>138</b>
4.1. Répartition des bacilles Gram négatifs multi résistants en fonction des services.....	140
4.2. Contamination des sites par les bacilles Gram négatifs multi résistants .....	141
<b>5. Entérobactéries productrices des BLSE.....</b>	<b>143</b>
5.1. Résultats des tests de détection des BLSE.....	143
5.2. Répartition des EBLSE selon les espèces.....	146
5.3. Répartition des EBLSE selon les services.....	148
5.4. Répartition des EBLSE selon les sites.....	149
5.5. Contamination des lavabos par les EBLSE .....	151
5.6. Résistance aux antibiotiques des souches EBLSE.....	154
<b>6. Etude moléculaire .....</b>	<b>156</b>
6.1. Détermination des supports génétiques de la résistance aux antibiotiques.....	156
6.2. Transfert de la résistance et analyse des plasmides .....	158
6.3. Détection des gènes codant pour la production des BLSE.....	161
6.4. Recherche moléculaire de la résistance associée.....	166
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>169</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>172</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>207</b>

# Introduction



## INTRODUCTION

La découverte des antibiotiques a été l'une des avancées thérapeutiques les plus importantes du vingtième siècle; leur utilisation a réduit de façon considérable le taux de morbidité et de mortalité lié aux maladies infectieuses, mais elle a été à l'origine d'une forte antibiorésistance touchant de plus en plus d'espèces et un nombre d'antibiotiques de plus en plus grand. Depuis le début des années 60, nous assistons à une augmentation du nombre de bactéries résistantes aux antibiotiques, et à l'émergence de nouvelles résistances (**Mirabaud, 2003**).

L'antibiorésistance bactérienne devient aujourd'hui un problème majeur de santé publique extrêmement préoccupant, dont les conséquences se mesurent en termes de difficultés thérapeutiques accrues (**Gassama Sow, 2004; Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006**).

La situation apparaît particulièrement préoccupante en milieu hospitalier parce que c'est un environnement favorable aux échanges de matériel génétique entre les bactéries propices au développement des résistances bactériennes multiples. La pression de sélection exercée par l'antibiothérapie importante et la diffusion épidémique des souches résistantes sont les deux facteurs principaux conditionnant cette évolution **Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006**).

La diffusion des infections nosocomiales provient souvent de la contamination croisée, les moyens les plus communs de transfert des pathogènes se produisent entre les mains de personnel de santé et les patients (**Drees et al., 2008**). Cependant, l'environnement de l'hôpital peut contribuer à la diffusion des agents pathogènes. En effet, il a été constaté que, dans des situations endémiques et épidémiques, il y a une contamination environnementale et un transfert des bactéries entre les patients et l'environnement (**Oliveira et Damasceno, 2010**). Bien que les micro-organismes survivent dans l'environnement, le rôle que les surfaces jouent dans la diffusion reste incertain (**Sexton et al., 2006; Hayden et al., 2008**). Les résultats sont parfois difficiles à interpréter car le germe isolé de l'environnement est-il l'origine ou le reflet de l'infection constatée chez le patient ? (**Zoutman, 2013**).

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

Cependant, il a été démontré que les agents pathogènes nosocomiaux sont excrétés par les patients et peuvent contaminer les surfaces en milieu hospitalier à des concentrations suffisantes pour la transmission, peuvent survivre pendant de longues périodes, peuvent persister malgré la désinfection, et peuvent être transférés aux mains des personnels soignant (Otter *et al.*, 2011).

L'émergence croissante des bactéries multirésistantes (BMR) dans les hôpitaux est d'une grande préoccupation, et continue de contester au contrôle de l'infection et à la pratique de l'épidémiologie de l'hôpital dans le monde entier (Goldmann et Hoskins, 1997). Cette dissémination entre les patients hospitalisés, souvent fragilisés, est à l'origine d'une augmentation considérable de la mortalité, de la morbidité ainsi que du coût d'hospitalisation. La surveillance de ces BMR est donc un moyen fiable pour connaître l'ampleur du problème et instaurer des stratégies d'intervention et de lutte adaptées à nos hôpitaux (Ben Romdhane *et al.*, 2007).

Les bacilles à Gram négatif occupent une place très importante parmi les micro-organismes responsables d'infections nosocomiales (Pagès, 2004). Ces pathogènes appartiennent à différentes familles bactériennes représentées majoritairement par les entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* etc.), les *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*), les *Acinetobacter* (*A. baumannii*) et les *Stenotrophomonas* (*S. maltophilia*). Différant par leur virulence, ils présentent en commun la propriété d'avoir naturellement (résistance naturelle), ou de développer (résistance acquise) des résistances aux antibiotiques, facteur essentiel de leur sélection en milieu hospitalier. La dissémination des résistances résulte soit de la dissémination d'une souche résistante dans l'environnement soit de la dissémination de gènes de résistance au sein d'espèces bactériennes différentes (Liassine, 2000).

Pratiquement, trois types de problèmes se posent au monde médical: pour le clinicien, un problème thérapeutique (prescrire un antibiotique efficace et éviter la sélection de mutants résistants); un problème microbiologique car certaines résistances sont difficiles à détecter au laboratoire et nécessitent la mise en œuvre de méthodes spécifiques (p.ex.  $\beta$ -lactamases à spectre élargi); un problème épidémiologique pour les équipes du contrôle de l'infection qui doivent limiter la dissémination des souches résistants (Liassine, 2000).

La contamination de l'environnement hospitalier inanimé par les pathogènes Gram positif comme les *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM) ou les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV), particulièrement dans une situation épidémique, a été fréquemment abordée. Toutefois, peu de données sont disponibles concernant le degré de contamination de l'environnement hospitalier des patients hébergeant des bactéries Gram négatif multi résistantes par rapport aux bactéries Gram positifs (**Lemmen et al., 2004**).

Il est donc important d'évaluer le rôle de l'environnement dans les IN pour proposer des stratégies qui permettraient de réduire la contamination par des agents pathogènes et leur diffusion (**Oliveira et Damasceno, 2010**).

Parmi les bactéries multi résistantes, les bactéries sécrétrices des bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) prennent une place de plus en plus importante. Elles ont largement été diffusées dans le monde depuis leur première mise évidence en 1983 et font l'objet de nombreuses études (**Paterson et Bonomo, 2005**). Les gènes des BLSE sont généralement portés par des plasmides sur lesquels ils sont souvent associés à des gènes codant pour d'autres types de résistance (**Jacoby et Sutton, 1991; De Champs et al., 1991**). Ces résistances à médiation plasmidique étaient pour la majorité présentes chez *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* et *Escherichia coli* (**Jacoby et Sutton, 1991; Boyd et al., 2004**). La situation épidémiologique est marquée par la diffusion rapide de souches d'EBLSE de type CTX-M depuis le début des années 2000. Les années précédentes, d'autres EBLSE de type TEM et SHV préférentiellement portées par *Klebsiella pneumoniae* et *Enterobacter spp.* diffusaient de manière épidémique au sein des structures hospitalières (**Lucet et Birgand, 2011**). En effet, le problème lié aux BLSE est surtout la présence fréquente de corésistances comme, par exemple, celle aux aminosides et quinolones, rendant les souches multi résistantes (**Jacoby et Sutton, 1991; Boyd et al., 2004**).

Dans cette intention, on s'est intéressé dans notre travail à la caractérisation phénotypique et moléculaire des souches de bacilles Gram négatifs multi résistants, isolées à partir de milieu hospitalier. Pour se faire, on a procédé à :

- L'isolement et l'identification des bacilles Gram négatifs, à partir de différents sites du milieu hospitalier dans différents établissements hospitaliers de la wilaya de Tébessa.
- L'étude de la sensibilité aux antibiotiques, afin de cibler les souches multi résistantes.

- La recherche des souches productrices de BLSE par trois tests de détection : test de synergie, test de rapprochement des disques et test du double disque.
- L'extraction de l'ADN plasmidique, des souches multi résistantes par la méthode de la lyse alcaline.
- La révélation de l'ADN plasmidique par l'électrophorèse sur gel d'agarose.
- La recherche par PCR des gènes de résistance codant pour les BLSE : *bla*<sub>CTX-M1</sub> et *bla*<sub>SHV</sub> et *bla*<sub>TEM</sub>.
- La recherche par PCR des gènes *qnr A, B* et *S* codant la résistance aux quinolones associée à la résistance par BLSE.

Les objectifs de ce travail sont donc :

- Evaluer le taux de contamination de l'environnement hospitalier par les bacilles Gram négatifs multi résistants.
- Discuter le rôle de l'environnement dans la diffusion de la résistance aux antibiotiques et la transmission croisée.
- Caractériser des gènes de résistance à médiation plasmidique qui sont les gènes codant les BLSE.

**Partie I :**

**Revue  
bibliographique**

# **Chapitre 01 :**

## **L'environnement hospitalier**

## 1. Définition de l'environnement hospitalier

On regroupe habituellement sous le terme d'environnement hospitalier les éléments suivants : air, eau, surfaces (sols, murs, mobilier, équipement), linge, aliments, dispositifs médicaux, déchets. Ces éléments supportent de nombreux micro-organismes et cette contamination environnementale est très variable qualitativement et quantitativement d'un établissement à l'autre et au sein d'un même établissement en fonction des services, des patients (sains, colonisés, infectés), des soins et des techniques pratiqués (**Hajjar et al., 2000**).

## 2. Les micro-organismes présents dans l'environnement hospitalier

Malgré les efforts considérables déployés pour éliminer les microorganismes ou restreindre leur croissance en milieu hospitalier, cet endroit constitue un immense réservoir de divers agents pathogènes (**Tortora et al., 2003**).

L'environnement hospitalier est largement contaminé par des microorganismes d'origine humaine ou spécifiquement environnementaux (**CTIN, 2002**). Cette contamination est diffuse et sa maîtrise, qui entraîne des procédures contraignantes, complexes et coûteuses, n'est le plus souvent que partielle et transitoire (**Hajjar et al., 2000**).

Les microorganismes présents dans l'environnement hospitalier sont extrêmement variés (bactéries, levures, champignons filamenteux, virus et parasites) et peuvent appartenir aussi bien aux espèces opportunistes qui ne manifestent leur virulence que sur un organisme dont les défenses immunitaires sont affaiblies, qu'aux espèces habituellement pathogènes pour l'homme (**CTIN, 2002**).

Parmi ces microorganismes, les bactéries jouent un rôle potentiel dans les infections hospitalières. Deux types de bactéries peuvent être retrouvés dans l'environnement des patients :

- **des bactéries d'origine humaine (la flore commensale)** parmi lesquelles des bactéries multirésistantes aux antibiotiques comme *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (EBLSE) ou les

*Enterococcus* résistants à la vancomycine (ERV) (Talon, 1999). Certains germes pathogènes peuvent aussi contaminer l'environnement à partir d'un réservoir humain comme les salmonelles, *Clostridium difficile*, etc. (Hajjar et al., 2000).

- des bactéries d'origine environnementale (flore saprophyte) dont certaines ont de fréquentes résistances naturelles aux antibiotiques, notamment les bacilles à Gram négatif (BGN) comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Legionella pneumophila* ou les mycobactéries atypiques.

Lorsque les patients sont colonisés et surtout lorsqu'il existe une infection patente, leur environnement immédiat est en général fortement contaminé par ces microorganismes (Weber et Rutala, 1997 b; Boyce et al., 1997; Talon, 1999; Rampling et al., 2001).

### 3. Survie des micro-organismes dans l'environnement

La survie et éventuellement la multiplication des bactéries conditionnent l'importance de la colonisation environnementale et la capacité de l'environnement à devenir un réservoir dans lequel le micro-organisme persiste et éventuellement une source à partir de laquelle le micro-organisme va pouvoir être transmis. Cette survie dans l'environnement, favorisée par la formation de biofilms au niveau des surfaces, varie selon les bactéries et la nature des surfaces contaminées (Talon, 1999).

La survie des micro-organismes dans l'environnement est de durée très variable, dépendant de différents facteurs comme la nature du germe, la température, le taux d'humidité, le type de surface et leur degré de salissure, en particulier leur teneur en matières organiques (Hajjar et al., 2000). Différents travaux ont évalué la durée de survie des micro-organismes dans l'environnement. Par exemple, pour *Enterococcus faecalis*, cette durée varie de 30 minutes sur la membrane d'un stéthoscope à 5 jours sur le dessus d'un plan de travail (Weber et Rutala, 1997 b). De même, la survie sur les surfaces d'*Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine peut atteindre une semaine (Noskin et al., 1995; Bonilla et al., 1996). Des SARM peuvent survivre dans l'environnement pendant plus de 7 jours (Farrington et al., 1992). Ainsi, des souches de



*Staphylococcus* et *Pseudomonas* peuvent survivre jusqu'à 145 jours sur différents tissus hospitaliers (draps, champs opératoires, pyjamas d'opérés, blouses, habits), la survie la plus longue étant observée sur les draps (Auajjar *et al.*, 2006). La survie des staphylocoques et des entérocoques dépend étroitement du type de tissu : la survie est plus longue sur le polyester que sur le coton (Neely et Maley, 2000).

*Staphylococcus aureus* et *Acinetobacter baumannii* sont les espèces parmi les plus résistantes à la dessiccation et peuvent survivre plusieurs semaines sur des surfaces sèches, devant *Pseudomonas aeruginosa*, certaines entérobactéries comme *Serratia marcescens* et les entérocoques qui peuvent survivre plus d'une semaine (Noskin *et al.*, 1995; Oie et Kamiya, 1996; Jawad *et al.*, 1996; Wendt *et al.*, 1997; Jawad *et al.*, 1998; Wendt *et al.*, 1998). *Escherichia coli*, entérobactérie la plus fréquente dans les infections nosocomiales est beaucoup moins résistante à la dessiccation (Jawad *et al.*, 1996; Wendt *et al.*, 1998). Des survies particulièrement longues, atteignant plus de 6 mois sont décrites, en particulier avec certaines souches épidémiques de SARM (Wagenvoort *et al.*, 2000). Dans des conditions d'humidité et en présence de matières organiques, la survie est encore plus longue (Jawad *et al.*, 1996). La forme sporulée du *Clostridium difficile* lui confère une résistance aux principaux antiseptiques ce qui lui permet de persister dans l'environnement pendant plusieurs jours (Carle, 2005).

Dans l'ensemble, les bactéries Gram-négatives ont été décrites pour persister plus longtemps que les bactéries Gram positives (Hirai, 1991). Les conditions humides améliorent la persistance pour la plupart des types de bactéries, comme *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* (Williams *et al.*, 2005). Les températures, par exemple de 4°C ou 6°C, améliorent également la persistance de la plupart des types de bactéries, comme *E. coli* (Williams *et al.*, 2005; Wilks *et al.*, 2005). Bien que certains chercheurs signalent que le type de matière n'a pas d'influence sur la persistance (Bale *et al.*, 1993; Wendt *et al.*, 1997), d'autres auteurs ont décrit une persistance plus longue sur le plastique (Pérez *et al.*, 1990; Neely, 2000), et d'autres encore voient un avantage de survie sur l'acier (Webster *et al.*, 2000). Certaines études suggèrent également qu'un inoculum élevé est associé à une plus longue durée de persistance (Neely, 2000). Une persistance plus longue a été décrite en présence du sérum (Hirai, 1991), d'expectorations (Kramer *et al.*, 2006).

## 4. Contamination de l'environnement par les micro-organismes

### 4.1. L'eau

L'eau potable contient naturellement une flore aquatique complexe (légionelles, mycobactéries atypiques, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, protozoaires divers, etc.). A l'intérieur de l'établissement hospitalier ces micro-organismes en quantité faible peuvent proliférer aux niveaux des bras morts, des extrémités des canalisations, des brise-jets des robinets, des pommes de douche, et dans les circuits d'eau chaude (**Riou, 1993; Stout et Yu, 1997**).

La consommation d'eau en milieu hospitalier est très importante. Sur le plan microbiologique, certains microorganismes présentent un risque spécifique dans ce milieu ; ce sont avant tout des bacilles à Gram négatif pour lesquels le milieu hydrique est un réservoir de choix (par exemple, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Xanthomonas*, etc.). La voie cutanéomuqueuse par contact est la plus classique pour la contamination, mais la voie respiratoire après aérosolisation (*Legionella*) voire la voie digestive (*Yersinia*, *Listeria*) sont de plus en plus souvent retrouvées. Les mycobactéries atypiques et les virus ont une importance plus limitée mais peuvent être à l'origine de petites épidémies tout à fait caractéristiques (**Meyer et al., 2004**).

### 4.2. L'air

Les micro-organismes de l'air sont généralement véhiculés par des supports de taille variable : poussières (10 à 100  $\mu\text{m}$ ), gouttelettes et micro-gouttelettes émises par les voies respiratoires humaines ou par aérosolisation (10 à 1 000  $\mu\text{m}$ ) et noyaux de condensation (*droplet nuclei*) issus de l'évaporation des gouttelettes (2 à 5  $\mu\text{m}$ ). Les plus petites particules, de l'ordre du micron, persistent dans l'atmosphère de manière prolongée car leur vitesse théorique de chute est lente (environ 1 mètre en 8 heures) ; elles peuvent être maintenues en suspension et diffuser à distance de leur point d'émission ; elles peuvent pénétrer profondément dans l'appareil respiratoire et atteindre les alvéoles pulmonaires (**Hajjar et al., 2000**).

### 4.3. Les surfaces

Les surfaces sont contaminées soit par contact, soit par sédimentation des micro-organismes présents dans l'air. La répartition de cette contamination des surfaces se fait le plus souvent de

manière hétérogène. L'adhérence des bactéries est possible selon l'état de la surface et elle peut s'accompagner de la création d'un biofilm. Du fait de conditions de croissance défavorables, certaines bactéries peuvent se miniaturiser (bactéries naines) et sont alors difficiles à mettre en évidence dans les prélèvements (bactéries viables et non cultivables). D'autres bactéries peuvent prendre une forme sporulée (*Clostridium difficile*) (Hajjar *et al.*, 2000).

Les surfaces les plus contaminées sont : le sol, les barrières de lit, les tables, les vêtements portés par les patients, les oreillers et les matelas (Boyce *et al.*, 1997).

Toutefois, toutes les espèces bactériennes isolées à partir de ces surfaces ne sont pas obligatoirement pathogènes mais la flore issue de l'activité humaine comme les bactéries de la flore cutanée ou des flores muqueuses et certaines espèces bactériennes des flores hydriques naturelles comme *Pseudomonas aeruginosa* peuvent être responsables des infections nosocomiales (Rouillon *et al.*, 2006).

## 5. Zones à risque à l'hôpital

Les locaux hospitaliers sont classés selon le risque infectieux en 4 types de zones (Tableau 01) :

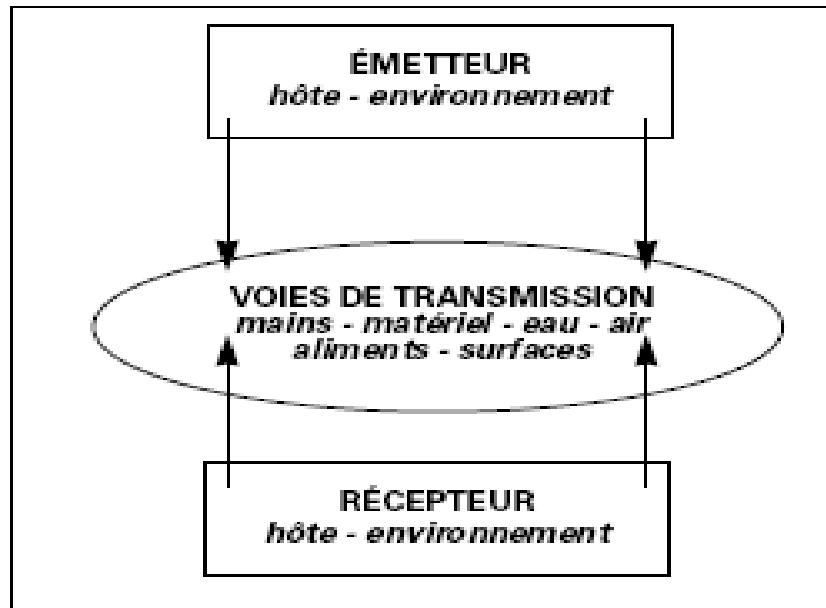
- **Zones à risques minimales** : zone administrative, couloirs, bureaux...
- **Zones à risques moyens** : long séjour, maternité, psychiatrie...
- **Zones à risques sévères** : chambres où se trouvent les malades immunodéprimés, atteints d'un cancer ou d'une cirrhose.
- **Zones à très hauts risques** : chambres de malades qui ont, du fait de leur maladie, peu de défenses immunitaires, c'est le cas des services des grands brûlés, de greffes, le bloc opératoire, la néonatalogie (Figarella *et al.*, 2007).

Tableau 01 : Zones à risque à l'hôpital (Figarella *et al.*, 2007)

1	2	3	4
Risques minimales	Risques moyens	Risques sévères	Très hauts risques
Halls Bureaux Services administratifs Services techniques  Maison de retraite  Résidence pour personnes âgées	Circulations Ascenseurs  Escaliers  Salles d'attente  Consultation externe  Salle de rééducation fonctionnelle Maternité Unité d'hébergement pour personnes âgées Services long et moyen séjour Psychiatrie Stérilisation centrale (zone lavage) Pharmacie Blanchisserie Sanitaires	Soins intensifs Réanimation  Urgences  Salle de « petite chirurgie » Salle de soins post interventionnelle (salle de réveil)  Salle d'accouchement  Nursérie  Biberonnerie  Pédiatrie  Chirurgie  Médecine  Hémodialyse Radiologie Laboratoires Exploration fonctionnelle Salle d'autopsie  Imagerie médicale interventionnelle Oncologie Oncohématologie Hématologie Hémodynamique Endoscopie	Néonatalogie Bloc opératoire  Service de greffe  Service de brûlés

## 6. Place de l'environnement hospitalier dans la chaîne épidémiologique

La chaîne épidémiologique de transmission d'agents infectieux est caractérisée par un réservoir émetteur et un réservoir récepteur reliés par un mode de transmission infectieux (Hajjar *et al.*, 2000) (figure 01).



**Figure 01 : Chaîne épidémiologique de transmission d'agents infectieux (Hajjar *et al.*, 2000)**

L'eau joue fréquemment le rôle de réservoir émetteur et les exemples les plus frappants sont constitués par la présence de *Legionella* dans les réservoirs d'eau chaude ainsi que la colonisation quasi permanente des siphons d'installation sanitaire par *Pseudomonas aeruginosa*. L'eau peut aussi jouer le rôle de transmetteur par la libération de micro-organismes, comme cela se rencontre par exemple avec certains systèmes d'humidification, les douches, les bains bouillonnants ou encore par aérosolisation à partir des siphons et robinets (Hajjar *et al.*, 2000). En effet, un robinet ouvert projette des particules d'eau jusqu'à une distance de 1 mètre. Ces particules peuvent contenir des bacilles à Gram négatif (BGN) et peuvent contaminer le matériel d'hygiène individuelle (Figarella *et al.*, 2007).

L'air est également un mode de transmission classique à partir d'un patient porteur d'une infection respiratoire (tuberculose par exemple). Les *droplet nuclei*, issus de l'évaporation des gouttelettes émises dans l'air par le patient source vont se transporter à distance et pouvoir pénétrer dans l'appareil respiratoire du sujet receveur.

Enfin, les surfaces du proche environnement du patient constituent un réservoir récepteur secondaire qui, s'il n'est pas maîtrisé, sera responsable de transmission indirecte d'infection (**Hajjar et al., 2000**). Il a été démontré dans une étude que l'environnement hospitalier joue un rôle important dans le risque infectieux nosocomial : il constitue un réservoir important de contaminations par les SARM (**Ahoyo et al., 2006**). Dans une autre étude, il a été rapporté que la contamination par le biais de l'environnement pourrait expliquer la propagation persistante de bactéries productrices de BLSE au sein d'un centre hospitalo-universitaire à Strasbourg. En effet, des réservoirs inertes (bocaux, siphons de lavabos, équipements. . .) peuvent être contaminés et constitueraient un relais à la transmission entre deux personnes (**Claudon et al., 2002**).

Les interactions entre les différents éléments de la chaîne épidémiologique sont particulièrement complexes car l'hôte et l'environnement sont à la fois émetteurs et récepteurs et leurs composants, réservoirs et voies de transmission. De plus, des facteurs liés à l'hôte (âge, immunodépression, procédure invasive, site de l'infection. etc.) et à l'agent infectieux (virulence, taille de l'inoculum, etc.) vont jouer un rôle important dans la survenue d'une éventuelle infection (**Hajjar et al., 2000**).

Ainsi, concernant la contamination environnementale, pour jouer un rôle important dans l'acquisition d'un pathogène nosocomial, ce dernier doit démontrer certaines caractéristiques microbiologiques :

- Agent pathogène capable de survivre pendant de longues périodes de temps sur des surfaces de l'environnement.
- Capacité à maintenir la virulence après l'exposition environnementale.
- Capacité à coloniser des patients (*Acinetobacter*, *C difficile*, SARM, ERV).
- Capacité à coloniser de façon transitoire les mains du personnel de santé.
- Transmission via les mains contaminées de personnel soignant.
- Résistance relative aux désinfectants utilisés sur des surfaces environnementales (**Weber et al., 2010**).

## 7. Rôle de l'environnement dans la survenue des infections nosocomiales

La contamination de l'environnement par des micro-organismes fait poser la question de leur responsabilité dans la genèse des infections nosocomiales (IN) (Veskey et Streifel, 1996). L'eau et plus rarement l'air ont été régulièrement mis en cause lors d'infections, voire d'épidémies contractées à l'hôpital (Durocher *et al.*, 2002).

La contamination des surfaces peut varier entre les périodes épidémiques et endémiques. Pendant les épidémies, la contamination de l'environnement peut être plus élevée. Néanmoins, dans des situations endémiques, on a également rapporté les surfaces qui ont été contaminées par des souches semblables à celles des patients (Oliveira et Damasceno, 2010).

### 7.1. Environnement et infections nosocomiales épidémiques

Pendant les épidémies, l'environnement peut jouer un rôle important pour la transmission des agents pathogènes nosocomiaux. Ceci a été décrit pour divers types de micro-organismes, tels que *Acinetobacter baumannii* (Fierobe *et al.*, 2001; Ling *et al.*, 2001; Lemmen *et al.*, 2004), *Clostridium difficile* (Kaatz *et al.*, 1988; Hanna *et al.*, 2000; Verity *et al.*, 2001), le SARM (Fitzpatrick *et al.*, 2000; Lemmen *et al.*, 2004), *Pseudomonas aeruginosa* (Buttery *et al.*, 1998; Engelhart *et al.*, 2002; Lemmen *et al.*, 2004), ERV (Bonten *et al.*, 1996; Falk *et al.*, 2000; Gray et George, 2000; McCarthy *et al.*, 2000; Hanna *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2003; Lemmen *et al.*, 2004; Duckro *et al.*, 2005), *Legionella* sp (Stout et Yu, 1997; Berthelot *et al.*, 1998 b; Goetz *et al.*, 1998). Toutefois, la preuve pour soutenir un rôle de contamination de l'environnement n'est pas aussi forte pour tous les types des agents pathogènes nosocomiaux. Pour *Clostridium difficile*, le SARM et l'ERV, les données sont plus fortes que d'autres agents pathogènes, tels que *Pseudomonas aeruginosa* ou *Acinetobacter baumannii*, dont plusieurs types sont détectés dans l'environnement, et qui ne sont pas toujours en corrélation avec la souche acquise (Hota, 2004).

Lors des IN survenant sur un mode épidémique, le microorganisme responsable de l'épidémie peut être retrouvé dans l'environnement. Si ce dernier peut être une source de transmission à l'homme, la preuve formelle de sa responsabilité exclusive dans la genèse de l'infection reste difficile à apporter (Weber et Rutala, 1997a; Boyce *et al.*, 1997). En effet, les épidémies d'IN

sont presque toujours associées à une transmission inter-humaine, ou à la contamination de dispositifs médicaux ou d'un liquide normalement stérile (Rhame, 1998). La place de la transmission directe interhumaine est reconnue comme prépondérante par rapport à la transmission liée à l'environnement (Maki *et al.*, 1982; Bauer *et al.*, 1990).

## 7.2. Environnement et infections nosocomiales endémiques

Le rôle de l'environnement est plus difficile à mettre en évidence dans les infections de type endémique. Un certain nombre de réservoirs hydriques ont été associés à des infections résultant de l'aérosolisation de bactéries contenues dans ces réservoirs comme par exemple *Pseudomonas* dans les robinets et les siphons (Grundmann *et al.*, 1993) et dans les piscines (McGuckin *et al.*, 1981). Le rôle de l'air dans la survenue des infections du site opératoire a essentiellement été étudié dans la chirurgie orthopédique par Lidwell (Lidwell *et al.*, 1982) qui a démontré, pour ce type d'interventions seulement, que le niveau de contamination de la plaie opératoire ainsi que le taux d'infection post-opératoire étaient liés au niveau de contamination de l'air du bloc opératoire (Lidwell *et al.*, 1983). La mise en place dans les blocs de filtration de haut niveau de l'air a permis de diminuer de plus de deux fois le taux d'infections post-opératoires (de 3,4 % à 1,6%) (Lidwell *et al.*, 1987; Mangram *et al.*, 1999). Ces résultats ont suggéré indirectement la responsabilité, au moins partielle, d'une transmission aérienne à partir de particules mises en suspension, véhiculées par les turbulences d'air et déposées directement ou indirectement dans la plaie lors de l'intervention chirurgicale. Les agents le plus souvent mis en cause dans ces infections sont des bactéries d'origine cutanée ou muqueuse, comme les staphylocoques avec au tout premier plan l'espèce *Staphylococcus aureus* (Lidwell *et al.*, 1983).

Si l'aérobiocontamination a pu être impliquée comme source d'infections nosocomiales du site opératoire, il n'existe pas d'arguments pour mettre en cause l'environnement inerte du bloc opératoire comme les sols, les murs ou les autres surfaces (Ayliff, 1991). En revanche, la literie en salle d'hospitalisation peut être une source de contamination au cours des infections post-opératoires (Dembele, 2005).

Dans une revue, Weber et Rutala (1997a) ont classé les réservoirs environnementaux impliqués dans les épidémies décrites selon quatre degrés d'implication : élevé, modéré, bas ou non démontré (Tableaux 02 et 03). L'implication est élevée pour les travaux extérieurs



associés à un système de traitement d'air inadéquat, les humidificateurs et les nébuliseurs, les endoscopes, les antiseptiques ; elle paraît modérée pour les filtres, les aérosols, les respirateurs, les eaux de dialyse, les glaçons ; elle serait basse pour les faux-plafonds, les douches, les thermomètres électroniques. Elle est non démontrée pour les lits fluidisés, les tapis, les fleurs, les animaux, les stéthoscopes, les sanitaires.

**Tableau 02 : Exemples de réservoirs environnementaux d'agents infectieux et leur degré d'implication dans la survenue d'infections (Weber et Rutala, 1997a)**

Réservoir	Micro-organisme	Transmission	Degré d'implication
Humidificateur	<i>Legionella, Pseudomonas</i>	Aérienne / droplet	Elevé
Antiseptique	<i>Pseudomonas</i>	Contact	Elevé
Filtre (air)	<i>Aspergillus</i>	Aérienne	Modéré
Respirateur	<i>Pseudomonas</i>	Inhalation	Modéré
Thermomètre	<i>Clostridium difficile</i>	Contact	Bas
Douche	<i>Legionella</i>	Aérienne	Bas
Tapis	-	-	non démontré
Stéthoscope	<i>Staphylococcus</i>	-	non démontré

**Tableau 03 : Exemples de réservoirs hydriques d'agents infectieux et leur degré d'implication dans la survenue d'infections (Weber et Rutala, 1997a)**

Réservoir	Micro-organisme	Transmission	Degré d'implication
Eau potable	<i>Legionella, Pseudomonas</i> Mycobactéries	Contact	Modéré
Machine à glaçons	<i>Salmonella, Pseudomonas</i> <i>Cryptosporidium</i>	Ingestion contact	Modéré
Eau de dialyse	BGN	Contact	Modéré
Eau unité dentaire	<i>Legionella, Pseudomonas</i>	Contact/endotoxine	Bas
Evier	<i>Pseudomonas</i>	Contact	Bas ou non démontré
Sanitaire	BGN	Contact/droplet	Non démontré
Fleurs	BGN <i>Aspergillus</i>	-	Non démontré

La responsabilité de l'environnement dans la survenue des infections nosocomiales reste souvent difficile à démontrer car on ne sait pas si cette contamination environnementale est la cause ou la conséquence de l'infection (c'est le cas par exemple des siphons) (**Hajjar et al., 2000**). Cependant, grâce aux techniques actuelles de biologie moléculaire (**Grattard et Pozzetto, 1999**), l'implication de l'environnement comme source de colonisation et/ou d'infection pourrait être plus facilement établie ainsi que semble le montrer une étude faite dans un service de réanimation concernant le suivi pendant 7 mois de patients ventilés et de leur environnement comme source de contamination et d'infection à *Pseudomonas aeruginosa* (**Berthelot et al., 1998a**).

La maîtrise de l'environnement hospitalier apparaît donc comme indispensable dans nos établissements. Cette maîtrise repose sur la mise en œuvre de démarches d'analyse des risques s'appuyant sur la définition de niveaux de qualité requis adaptés à chaque situation. Ceci permet de développer une vigilance environnementale ciblée associant des procédures codifiées et d'éventuels prélèvements microbiologiques de contrôle (**Hajjar et al., 2000**).

## **Chapitre 02 :**

# **Bacilles Gram négatifs responsables des infections nosocomiales**

## 1. Entérobactéries

En milieu hospitalier, environ 40 à 50% des bactéries isolées appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*. Cette famille est constituée de genres bactériens qui sont rassemblés en raison des caractères bactériologiques communs: aéro-anaérobies facultatifs, mobiles grâce à une ciliature polaire, ou immobiles, non sporulés, poussant rapidement sur des milieux ordinaires, ne possédant pas d'oxydase, réduisant les nitrates en nitrites, utilisant le glucose par métabolisme fermentatif avec ou sans production de gaz (Eyquem *et al.*, 2000; Avril *et al.*, 2000).

### 1.1. *Escherichia coli*

*E. coli* est l'espèce type du groupe des entérobactéries. Elle est appelée communément «colibacille». C'est l'espèce bactérienne qui a été la plus étudiée par les fundamentalistes, pour des travaux de physiologie et de génétique (Berche *et al.*, 1988; Flandrois, 1997).

#### a) Habitat

Les *E. coli* sont des hôtes normaux de l'intestin: ils représentent près de 80% de la flore intestinale aérobie de l'adulte. On peut les trouver également au niveau de diverses muqueuses chez l'homme et chez les animaux. La présence des *E. coli* dans l'environnement ou dans les aliments signe une contamination fécale.

Les souches d'*E. coli* responsables d'entérites sont transmises par ingestion d'eau ou d'aliment contaminé par les selles de malades ou de porteurs. Les infections urinaires, néonatales et aussi nosocomiales, trouvent surtout leur origine dans la flore endogène du tube digestif ou tractus génital, mais peuvent également être transmises d'un sujet à l'autre à partir du matériel contaminé (Avril *et al.*, 1992; Flandrois, 1997).

#### b) Caractères bactériologiques

##### ➤ Caractères morphologiques et culturels

Bacille de taille comprise entre 1 et 1,5 µm de largeur et 2 à 6 µm de longueur et souvent mobile. *E. coli* donne des colonies non pigmentées de 2 à 3 mm, de type "S" smooth: lisses et brillantes, ou de type "R" rough: présentant une surface sèche et rugueuse. Certaines colonies

sont particulièrement mucoïdes et correspondent à la présence d'une capsule liée aux lipopolysaccharides de la membrane externe (Avril *et al.*, 1992; Avril *et al.*, 2000).

#### ➤ Caractères biochimiques

Sur milieux lactosés, les colonies sont généralement lactose (+). Sur gélose au sang elles peuvent être hémolytiques. Les principaux caractères positifs sont: indole (sauf exceptions), ONPG (sauf exceptions), mannitol. Les caractères suivants sont positifs de façon moins constante: mobilité, LDC, ODC, sorbitol, production de gaz lors de l'attaque du glucose. Sont toujours négatifs: inositol, urée, TDA, VP, gélatinase, citrate de Simmons (Carbonelle *et al.*, 1987; Gerar et Philippe, 2006).

#### ➤ Caractères antigéniques

Les différents sérotypes d' *E. coli* contiennent plusieurs catégories d'antigènes :

- **Antigènes somatiques O:** ils sont de nature lipopolysaccharidique; il existe environ 160 antigènes O différents;
- **Antigènes capsulaires K:** ils sont de nature polysaccharidique; environ 70 antigènes d'enveloppe différents ont été reconnus;
- **Antigènes flagellaires H:** ils sont de nature protéique; on en connaît 52 types, ils ne sont présents que chez les souches mobiles (Marc *et al.*, 1999; Avril *et al.*, 2000).

#### c) Pouvoir pathogène

*E. coli* cause principalement des infections du tractus digestif, la plus connue étant la diarrhée du voyageur, en raison de la contamination de l'eau ou des aliments par la flore fécale des malades ou des porteurs.

Il est également le germe préférentiel des infections urinaires. En milieu hospitalier, ces infections sont en rapport essentiellement avec l'utilisation fréquente des sondes urinaires.

*E. coli* est aussi à l'origine d'infections pulmonaires chez les personnes gravement malades, ces patients étant souvent colonisés au niveau des voies respiratoires supérieures. La présence de tubes endotrachéaux et la diminution du réflexe de toux facilitent la progression des germes et l'émergence de pneumonies surtout nosocomiales.

*E. coli* peut coloniser le vagin et générer des méningites néonatales suite au passage du nouveau-né à travers la voie génitale maternelle colonisée ou suite à l'infection du liquide amniotique consécutive à une rupture prolongée des membranes (**Isenberg, 1992; Eisenstein et Zaleznif, 2000**).

## 1.2. *Salmonella*

Les salmonelles sont des bactéries pathogènes, à transmission oro-fécale (**Bourgeois et al., 1996**).

### a) Habitat

Les *Salmonella* sont très largement répandues dans la nature et leur réservoir s'étend à tout le règne animal, en particulier les volailles. Elles sont présentes dans le tube digestif des malades et des porteurs sains, chez l'homme et chez les animaux, qui contaminent le milieu extérieur par leur excréta (**Flandrois, 1997**).

### b) Caractères bactériologiques

#### ➤ Caractères morphologiques et cultureux

Bacilles de taille comprise entre 2 et 3 µm de large et 0,4 à 0,6 µm de long, habituellement mobiles grâce à une ciliature péritriche (*S. gallinarium* est toujours immobile). Les colonies sont lisses, à bords réguliers mesurant 2 à 3 mm de diamètre; sur milieu *Salmonella-Shigella* (SS), les colonies apparaissent incolores à centre noir (**Corthier et al., 2001; Moulin et Coquerel, 2002**).

#### ➤ Caractères biochimiques

Les principaux caractères positifs sont: H<sub>2</sub>S, gaz (glucose), LDC, ODC, citrate de Simmons. Les caractères qui sont toujours négatifs sont: lactose, ONPG, uréase, TDA, gélatinase, VP, ADH, indole, saccharose. Il est important de noter quelques exceptions à ces caractères fondamentaux: *S. paratyphi* A ne produit pas H<sub>2</sub>S et elle est LDC (-); *S. typhi* ne produit pas de gaz (glucose) et produit peu ou pas d'H<sub>2</sub>S (**Eyquem et al., 2000; Avril et al., 2000**).

### ➤ Caractères antigéniques

Les bactéries du genre *Salmonella* peuvent être différenciées entre elles grâce à des épreuves sérologiques basées principalement sur trois antigènes qui sont l'antigène O, l'antigène H et l'antigène Vi qui est l'antigène de surface (Boissel et Proye, 1991).

### c) Pouvoir pathogène

Les infections à *Salmonella* peuvent revêtir trois aspects:

- **Formes septicémiques:** ce sont les fièvres typhoïdes et para typhoïdes qui sont des maladies à déclaration obligatoire. Elles sont dues aux salmonelles majeures: *S. typhi* et *S. paratyphi* A, B et rarement C, qui ne se rencontrent que chez l'homme, qui en est le seul réservoir.
- **Formes digestives:** il s'agit des toxi-infections alimentaires et des gastro-entérites dues aux salmonelles ubiquistes, dont les hôtes naturels sont les animaux, qui peuvent contaminer l'homme.
- **Formes extra-digestives:** elles sont plus rares: infections urinaires, méningites, infections pulmonaires... (Avril *et al.*, 1992; Flandrois, 1997).

### 1.3. *Klebsiella-Enterobacter-Serratia*

Le groupe *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* (K.E.S) rassemble plusieurs espèces bactériennes longtemps considérées comme commensales et actuellement responsables d'un grand nombre de complications infectieuses en milieu hospitalier. Les bactéries de ce groupe partagent en commun les caractères suivants:

- La réaction de Voges-Proskauer est généralement positive;
- Ce sont des bactéries pathogènes opportunistes peu virulentes, elles se rencontrent peu en pratique extrahospitalière. Ces bactéries sont responsables d'IN chez des malades débilisés: cirrhotiques, diabétiques, brûlés, cancéreux, malades de réanimation;
- Ces bactéries sont souvent multirésistantes aux antibiotiques. La fréquence avec laquelle on les rencontre est d'autant plus grande que la pression de sélection par des antibiotiques à large spectre est forte (Berche *et al.*, 1988; Flandrois, 1997; Avril *et al.*, 2000).

### 1.3.1. *Klebsiella*

Six espèces de *Klebsiella* sont usuellement reconnues: 4 espèces ont un pouvoir pathogène pour l'homme (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. ozaenae* et *K. rhinoscleromatis*); 2 espèces sont trouvées dans l'environnement et sont rarement pathogènes (*K. terrigena* et *K. planticola*) (Avril *et al.*, 2000).

#### a) Habitat et épidémiologie

*K. pneumoniae* et *K. oxytoca* sont les espèces les plus souvent rencontrées. Elles sont fréquemment isolées des eaux, du sol et des végétaux. Elles sont présentes dans la flore fécale de l'homme et sont souvent commensales de la peau, des muqueuses et des voies respiratoires. Les malades s'infectent soit avec leurs propres souches, soit avec des souches responsables de petites épidémies hospitalières. Elles sont alors manuportées de malade à malade (Avril *et al.*, 2000).

#### b) Caractères bactériologiques

##### ➤ Caractères morphologiques et culturels

Bacilles immobiles, encapsulés, de 1 à 2 µm de long sur 0,5 µm de large. Sur milieux classiques d'isolement pour entérobactéries, les *Klebsiella* donnent de grosses colonies généralement lactose (+), rondes, de 3 à 4 mm de diamètre, bombées, muqueuses, translucides. Cet aspect muqueux, en relation avec la présence habituelle d'une capsule plus ou moins volumineuse de nature polysaccharidique explique l'aspect gluant et bombé des colonies (Flandrois, 1997; Avril *et al.*, 2000).

##### ➤ Caractères biochimiques

Ces bactéries fermentent le glucose par la voie du butane-2,3-diol (VP +) avec production de gaz. Elles ne possèdent ni ODC ni ADH, ni TDA, ni lipases et ne produisent pas d'H<sub>2</sub>S (Flandrois, 1997; Maza *et al.*, 2004).

### 1.3.2. *Enterobacter*

Les espèces rencontrées en bactériologie médicale sont: *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. agglomerans*, *E. gergoviae*, *E. sakazakii*, *E. asburiae* et *E. intermedius* (Avril *et al.*, 2000).



**a) Habitat et épidémiologie**

Les *Enterobacter* sont des commensaux du tube digestif de l'homme et des animaux. On les trouve dans les eaux, sur le sol, sur la peau et les muqueuses. Ce sont des bactéries de l'hospitalisme (Avril *et al.*, 2000).

**b) Caractères bactériologiques****➤ Caractères morphologiques et cultureux**

Bacilles mobiles, de 0,6 à 1 µm de largeur et 1,2 à 3 µm de longueur. Les colonies des *E. sakazakii* sont pigmentées en jaune. Un pigment jaune peut aussi être produit par des souches d'*E. agglomerans* (Didier, 1998; Avril *et al.*, 2000).

**➤ Caractères biochimiques**

Les principaux caractères biochimiques sont: VP (+/-), ODC (+), ADH (+/-), uréase (-), la TDA, la production d'indole et d'H<sub>2</sub>S sont négatives (Berche *et al.*, 1988; Avril *et al.*, 2000).

**1.3.3. *Serratia***

Neuf espèces sont reconnues: *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *S. plymuthica*, *S. rubidaea*, *S. odorifera*, *S. ficaria*, *S. grimesii*, *S. proteomaculans* et *S. entomphila* (Carbonelle *et al.*, 1987).

**a) Habitat et épidémiologie**

Les *Serratia* sont des bactéries de l'environnement présentes sur le sol et sur les plantes. Les *Serratia* sont les entérobactéries les plus résistantes aux agents physiques et chimiques. Elles peuvent survivre des mois dans l'eau distillée et se multiplier dans des solutions antiseptiques. Elles se multiplient bien à + 4 °C. Les infections hospitalières peuvent être en relation avec des antiseptiques ou des flacons contaminés, mais la transmission manuportée semble être plus fréquente (Flandrois, 1997; Maza *et al.*, 2004).

## b) Caractères bactériologiques

### ➤ Caractères morphologiques et cultureux

Bacille mobile, de taille 0,9 à 2 µm de longueur et 0,5 à 0,8 µm de largeur. *Serratia* donne parfois des colonies pigmentées en rouge (prodigiosine) (Didier, 1998; Avril *et al.*, 2000).

### ➤ Caractères biochimiques

Les *Serratia* sont: VP (+), ONPG (+), elles sont très protéolytiques et liquéfient la gélatine, et elles produisent une lipase. Elles ne possèdent ni ADH, ni TDA, ni uréase et ne produisent pas d'H<sub>2</sub>S (Berche *et al.*, 1988; Avril *et al.*, 2000).

### 1.3.4. Pouvoir pathogène du groupe K. E. S

Les bactéries K.E.S seraient responsables de près de 10 à 30 % des IN. Leur pathogénicité s'exprime habituellement chez des malades affaiblis. Elles peuvent donner lieu à divers types d'infections: infections broncho-pulmonaires, infections urinaires, infections localisées, septicémies (Berche *et al.*, 1988).

### 1.4. *Proteus-Providencia*

Les *Proteus* constituent un groupe de bactéries génétiquement très hétérogènes. Sur la base d'études génétiques, on divise actuellement l'ancien genre *Proteus* en trois genres distincts: le genre *Proteus* proprement dit, le genre *Morganella* et le genre *Providencia*. Chacun de ces genres est subdivisé en espèces. Parmi celles d'intérêt médical, on peut citer: *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii* (ancien *Proteus morganii*), *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii* (Berche *et al.*, 1988).

## a) Habitat et épidémiologie

Les bactéries de ce groupe sont ubiquitaires et elles existent aussi sur la peau et les muqueuses. Bien qu'en petits nombres, elles sont des commensaux du tube digestif de l'homme et des animaux (Eyquem *et al.*, 2000).

## b) Caractères bactériologiques

### ➤ Caractères morphologiques et culturels

Bacilles mobiles, de taille 0,3 à 1,0 µm de large sur 0,6 à 6,0 µm de long. A l'isolement sur gélose ordinaire, les colonies sont: rondes, lisses, à bords réguliers, de 2 à 3 mm de diamètre. En bouillon, les cultures se développent en donnant souvent un voile en surface. En milieu gélosé, *P. mirabilis* et *P. vulgaris* peuvent envahir la surface du milieu en formant des ondes concentriques. Cet essaimage, est dû à la grande mobilité de la bactérie (Berche *et al.*, 1988; Avril *et al.*, 2000).

### ➤ Caractères biochimiques

Les différentes espèces sont identifiées selon des clés rappelées dans le tableau 04.

**Tableau 04 : Principaux caractères distinctifs des *Proteus-Providencia* (Berche *et al.*, 1988)**

Caractère	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Providencia stuartii</i>
Envahissement	+	+	-	-	-
Uréase	+	+	+	+	-
H <sub>2</sub> S	+	+	-	-	-
Indole	-	+	+	+	+
Mannose	-	-	+	+	+
ODC	+	-	+	-	-

## c) Pouvoir pathogène

Les *Proteus* sont responsables de nombreuses IN comme les infections urinaires et les infections respiratoires, en particulier chez l'hôte immunodéprimé. Des méningites à *Proteus* ont été décrites chez le nourrisson. Ces bactéries ont la capacité d'acquérir facilement de nombreux caractères de résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques, expliquant qu'elles soient souvent sélectionnées dans le tube digestif des malades soumis à une antibiothérapie (Berche *et al.*, 1988).

### 1.5. *Citrobacter*

On reconnaît actuellement sept espèces appartenant au genre *Citrobacter*: *C. freundii*, *C. koseri*, *C. farmeri*, *C. youngae*, *C. braakii*, *C. werkmanii*, *C. sedlkaki*. Seules les deux premières espèces sont retrouvées relativement fréquemment en pratique clinique (Emmerson *et al.*, 1997; Brenner *et al.*, 2005).

#### a) Habitat et épidémiologie

Les *Citrobacter* sont des bactéries commensales du tube digestif de l'homme et des animaux, mais aussi saprophytes de l'environnement (sol, eaux, eaux usées, aliments). Les nouveau-nés et les patients immunodéprimés, âgés ou présentant un terrain débilite sont davantage à risque de contracter l'infection. Chez l'ensemble des patients, les infections à *Citrobacter* comportent un risque de mortalité de 33 à 48 % (Holmes *et al.*, 1998).

#### b) Caractères bactériologiques

##### ➤ Caractères morphologiques et cultureux

Bacilles droits, isolés ou groupés en paire, mobiles par ciliature péritriche, non capsulés, sauf l'espèce *C. freundii*. *Citrobacter* donne sur gélose nutritive des colonies généralement lisses, légèrement convexes, translucides ou opaques, à contour régulier et leur diamètre est de 2 à 4 mm, les colonies peuvent avoir un aspect rugueux ou muqueux (Holmes *et al.*, 1998; Doran, 1999).

##### ➤ Caractères biochimiques

Les principaux caractères biochimiques des *Proteus* sont les suivants: ONPG (+), mannitol (+), H<sub>2</sub>S (+), citrate (+), LDC (-), TDA (-), ADH (-), VP (-) (Ryan et Ray, 2004).

##### ➤ Caractères antigéniques

Le genre peut être divisé en 43 sérogroupes O selon l'antigène O du lipopolysaccharide, il faut noter qu'il existe des communautés antigéniques O entre *C. freundii* et les Salmonelles (Eyquem *et al.*, 2000).

### c) Pouvoir pathogène

Les *Citrobacter* sont essentiellement responsables d'IN, surtout chez les patients présentant une immunodépression, pneumopathies, surinfections de plaies chirurgicales, bactériémies essentiellement associées à des infections sur cathéter. À côté de ce type de pathologies, les bactéries du genre *Citrobacter*, surtout *C. koseri*, sont associées de façon significative à des abcès et des méningites néonatales (**Brenner et al., 2005**).

## 2. Bacilles Gram négatifs non fermentaires

### 2.1. Caractères généraux

La position taxonomique des bacilles à Gram négatif non fermentants BGNnF a subi de nombreux changements ces dernières années, depuis la publication de la liste : « Approved list of bacterial names » (**Rockstroh, 1977**). Ces changements reposent sur des données phénotypiques comme les caractères conventionnels ou nutritionnels mais surtout génomiques (teneur en bases de l'ADN, pourcentage d'hybridation ADN-ADN, ...). On peut distinguer un certain nombre de genres : *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Brevundimonas*, *Acinetobacter*, *Ralstonia*, *Shewanella*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Chryseomonas*, *Flavobacterium*, *Flavimonas*, *Frateuria*, *Gluconobacter*, *Rhizobium*, *Bordetella*, *Kingella*, *Oligella*, *Protomonas*, *Xanthomonas*.

Les BGNnF sont des bactéries ubiquitaires, largement présentes dans l'environnement, se développant entre 4 et 41 °C. Ils ne survivent habituellement que quelques heures dans un environnement sec. En revanche, ils peuvent survivre et se multiplier dans l'environnement hydrique même en l'absence de nutriments, notamment en milieu hospitalier. Elles sont dites pathogènes opportunistes, qui peuvent être responsables d'infections cliniques sur des terrains débilisés. Elles peuvent coloniser les patients au niveau du nez, de la gorge, du tube digestif et de la peau. Cette colonisation augmente significativement lors de traitement antibiotique et/ou avec la durée d'hospitalisation (**Berthelot et al., 2005**).

Les BGNnF sont des bactéries aérobies strictes de culture « facile » formant un groupe de bactéries très souvent oxydase positive (Figure 02). Ces bactéries, cultivées sur milieux ordinaires, possèdent un métabolisme respiratoire strict (utilisation de l'oxygène comme

accepteur terminal d'électrons). A noter que certains genres peuvent utiliser les nitrates comme accepteur terminal d'électrons en anaérobiose (Touati, 2013).

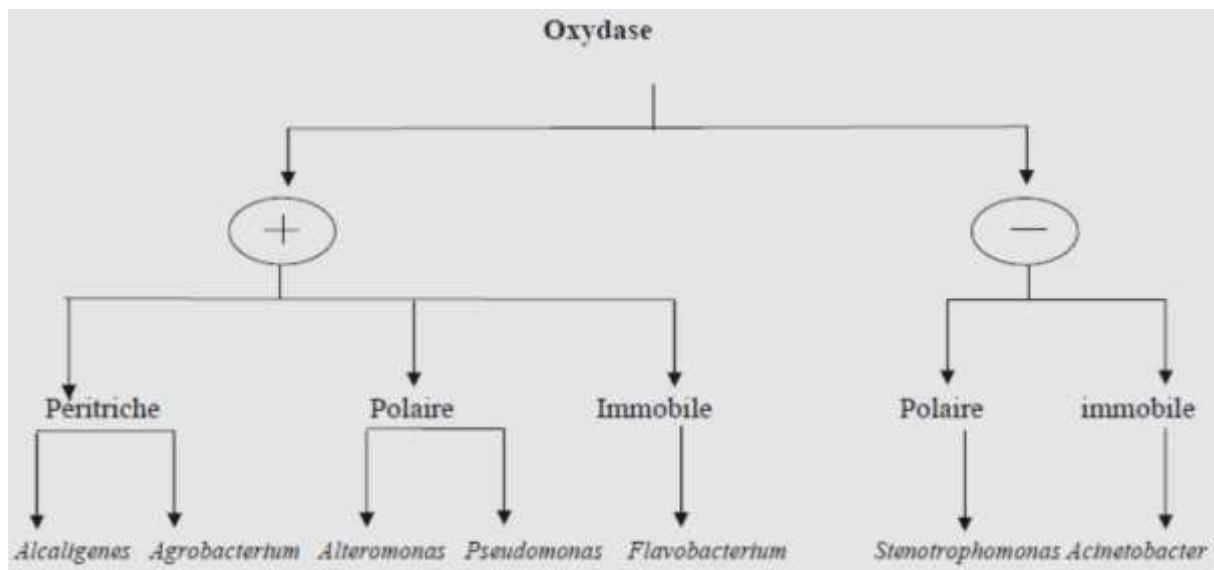


Figure 02 : Algorithme des principaux genres des BGNnF (Touati, 2013)

## 2.2. Sources et réservoirs des BGNnF en milieu hospitalier

À l'hôpital, les différents réservoirs et sources des BGNnF peuvent être classés en quatre grandes catégories :

- *Milieu hydrique*

La contamination directe du patient peut survenir par l'eau des douches, ou des bains avec un risque épidémique élevé, notamment dans des unités de soins utilisant l'hydrothérapie comme c'est le cas pour les patients brûlés. Les BGNnF sont fréquemment isolées dans les siphons, ou mousseurs de la robinetterie (Berthelot *et al.*, 2005).

- *Matériel insuffisamment nettoyé-désinfecté ou insuffisamment séché*

Les exemples de contamination de patients par l'intermédiaire de tels matériels sont très nombreux dans la littérature : endoscopes ou lave-endoscopes, matériels de nébulisation ou de ventilation, divers matériels réutilisables tels que les appareils d'urodynamie, appareils de mesure de pression et automates de chirurgie ophtalmologique.... Des jouets ont également été incriminés (Berthelot *et al.*, 2005).

- **Solutions contaminées**

Ont été impliquées des médications pour aérosols des solutions intraveineuses ou orales, ou encore des produits antiseptiques ou désinfectants (**Berthelot et al., 2005**).

- **Mains du personnel soignant**

La contamination peut intéresser les ongles (y compris les faux ongles) ou les mains. Elle survient à partir d'un patient colonisé/infecté, de savons ou de crèmes ou directement de l'eau, notamment suite à une contamination des siphons. La transmission croisée par manuportage, suspectée depuis longtemps, a été récemment démontrée à l'occasion de phénomènes épidémiques grâce à l'apport des techniques de biologie moléculaire (**Berthelot et al., 2005**).

### **2.3. *Pseudomonas***

Le genre *Pseudomonas* est le genre type de la famille *Pseudomonadaceae*. Dans ce genre, *Pseudomonas aeruginosa* représente 80 % des souches isolées; les autres espèces sont isolées à plus faible fréquence (**Flandrois, 1997**).

#### **a) Habitat**

Les bactéries du genre *Pseudomonas* occupent la plupart des environnements naturels. Elles sont isolées de l'eau, du sol, des poussières en suspension dans l'air et des végétaux. Leur capacité à résister à de nombreux antibiotiques et antiseptiques explique leur présence en milieu hospitalier (**Eyquem et al., 2000; Avril et al., 2000**).

#### **b) Caractères bactériologiques**

##### ➤ **Caractères morphologiques et cultureux**

Bacilles droits et fins, non capsulés, de taille variant entre 1 à 3µm de long et 0,5 à 1 µm de large, mobiles par une ciliature polaire. La culture est facile sur milieu de culture avec ou sans production de pigment (**Eyquem et al., 2000; Avril et al., 2000**).

##### ➤ **Caractères biochimiques**

Les principaux caractères distinctifs des *Pseudomonas* sont présentés dans le tableau 05.

Tableau 05: Caractères différentiels des *Pseudomonas* (Eyquem *et al.*, 2000)

Test	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. stutzeri</i>
LDC	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-
ADH	+	+	+	-
Culture à 41°	+	-	-	<b>d</b>
Gélatinase	+	+	-	-
Esculine	-	-	-	-
Citrate de Simmons	+	+	+	+
King A	<b>d</b>	-	-	-
King B	<b>d</b>	<b>d</b>	<b>d</b>	-
Caractères particuliers	TTR+	TTR d	TTR d	Colonies sèches plissées Amylase +

TTR : Tétrathionate-réductase, **d** : différent selon les souches.

### c) Pigments élaborés par les *Pseudomonas*

Les deux pigments caractéristiques les plus fréquents sont la pyocyanine et la pyoverdine. Ils sont solubles dans les milieux de culture, et peuvent ainsi les colorer (Eyquem *et al.*, 2000).

#### 2.3.1. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* (du latin *aeruginosus* = couvert de rouille) est désigné bacille pyocyanique (du grec *puon* = pus et *kuanos* = bleu foncé) (Berche *et al.*, 1988; Marc *et al.*, 1999).

#### a) Épidémiologie

La nature nosocomiale de la plupart des infections à *P. aeruginosa* rend nécessaire la connaissance parfaite des mécanismes de transmission. L'utilisation de marqueurs épidémiologiques fiables (sérotypie, lysotypie, pyocinotypie) permet de suivre les épidémies hospitalières et d'envisager la lutte contre les sources de contamination.

➤ **Le milieu extérieur** et l'eau sous toutes ses formes ou le malade lui-même par ses exsudats (urines, crachats, selles...)



- **L'environnement hospitalier:** fleurs coupées (eau des vases), plantes en pots, fruits, légumes crus ou en salade (tomates, carottes, radis, laitues), siphons d'éviers ou de sol, humidificateurs, respirateurs, eau distillée
- **Les antiseptiques:** les ammoniums quaternaires par exemple sont souvent inactifs et permettent la multiplication de la bactérie (**Berche et al., 1988; Marc et al., 1999; Eyquem et al., 2000**).

#### b) Pouvoir pathogène

*P. aeruginosa* est l'exemple type des bactéries pathogènes opportunistes, il est peu virulent pour l'individu normal, le bacille pyocyanique est par contre un agent infectieux redoutable lorsque les défenses immunitaires du sujet sont altérées.

*P.aeruginosa* peuvent donner lieu à divers types d'infections: infections pulmonaires, infections uro-génitales, infections ostéo-articulaires, infections oculaires, infections ORL, infections méningées, infections cutanées et septicémies (**Jarvis et Martone, 1992; Eyquem et al., 2000; Avril et al., 2000**).

### 2.4. *Acinetobacter*

On décrit 12 espèces appartenant au genre *Acinetobacter*. Une seule espèce, *Acinetobacter baumannii*, est régulièrement responsable d'infections humaines. Fréquemment résistant à de nombreux antibiotiques, *A. baumannii* est le seul *Acinetobacter* à l'origine de véritables épidémies hospitalières (**Flandrois, 1997; Avril et al., 2000**).

#### a) Habitat et épidémiologie

Ce sont des bactéries de l'environnement, capables d'utiliser une grande variété de substrats comme source de carbone, ce qui leur confère un habitat très large. Elles sont retrouvées dans le sol, les eaux et les boues. *A. baumannii* vit fréquemment au sein de la flore cutanée normale de l'homme et accessoirement de la flore pharyngée. Les facteurs prédisposant à l'éclosion d'une véritable infection sont surtout observés chez des patients hospitalisés (**Berche et al., 1988; Flandrois, 1997**).

**b) Caractères bactériologiques****➤ Caractères morphologiques et cultureux**

Les *Acinetobacter* sont des bacilles courts immobiles, présentant fréquemment des variations morphologiques (coccoïde ou bacillaire). Les *Acinetobacter* cultivent bien sur milieux usuels à une température optimale de 30-32 °C. En 24 heures, les colonies ont un diamètre de 2-3 mm sur gélose ordinaire; elles sont convexes, à bords réguliers, souvent translucides. *A. baumannii* est la seule espèce capable de croître à 44 ou 45 °C. Certaines souches d'*Acinetobacter* dégagent lors de la culture une odeur désagréable; quelques rares souches sont hémolytiques sur gélose au sang (Flandrois, 1997; Avril *et al.*, 2000).

**➤ Caractères biochimiques**

Le caractère biochimique principal est la négativité du test de l'oxydase. Les principaux caractères à rechercher sont: absence de réduction des nitrates, acidification du glucose, croissance en bouillon à différentes températures (44 °C, 41 °C et 37 °C), hydrolyse de la gélatine (Avril *et al.*, 2000).

**c) Pouvoir pathogène**

Les *Acinetobacter*, étant fréquemment isolées de la peau ou du rhinopharynx des malades hospitalisés mais aussi de sujets normaux. Elles sont, malgré leur faible virulence, responsables dans un certain nombre de cas de méningites graves, de septicémies, de pleurésies, de conjonctivites, de sinusites, de suppurations cutanées, d'infections urinaires, d'ulcérations intestinales, de péricardites. L'espèce *A.baumannii* est responsable de 90 à 95% des IN à *Acinetobacter*. Ces infections sont souvent dues à des souches multi-résistantes aux antibiotiques (Avril *et al.*, 2000).

**2.5. *Burkholderia cepacia***

En 1950, William Burkholder, un microbiologiste américain, a décrit ce microorganisme comme agent causal du rot bactérien des bulbes d'oignon. Jusqu'à 1992, la bactérie était classée comme *Pseudomonas cepacia*. Le genre *Burkholderia* a été créé lorsque le genre *Pseudomonas* fut divisé en sept nouveaux genres au moins, sur la base des données de l'ARNr 16S. Le genre *Burkholderia* contient plusieurs espèces parmi elles: *B. cepacia*, *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *B. gladioli*, *B. pickettii*, etc. *Burkholderia cepacia* (*cepacia* vient du

latin cepia: oignon) est l'espèce-type du genre *Burkholderia* individualisé en 1993 (Prescott *et al.*, 2003; Lepoivre, 2003; Gautam *et al.*, 2011).

#### a) Habitat et épidémiologie

Cette bactérie ubiquitaire peut survivre au niveau du sol, boues, sédiments, rhizosphère, phyllosphère, dans l'eau des ruisseaux. On la retrouve également dans des aliments dont elle peut devenir phytopathogène. Dans l'environnement hospitalier, on retrouve *B. cepacia* dans des prélèvements d'air, on le retrouve aussi sur des surfaces contaminées par des gouttelettes respiratoires. Les infections à *B. cepacia* sont de plus en plus souvent rencontrées à l'hôpital, les transmissions croisées de malade à malade sont souvent détectées et la responsabilité du matériel respiratoire a parfois été démontrée (Drabick *et al.*, 1996; Henry *et al.*, 1997).

#### b) Caractères bactériologiques

##### ➤ Caractères morphologiques

Bacilles droits, non sporulants, mobiles grâce à un seul flagelle polaire ou à une touffe de flagelles polaires (Segonds *et al.*, 1996; Flanagan et Paull, 1998).

##### ➤ Caractères biochimiques

Les principaux caractères d'identification de *B.cepacia* sont les suivants: oxydase (+), ADH (+), glucose (+), lactate (+), poly-β-hydroxybutyrate (PHB) (+), LDC (+), ONPG (+), réduction NO<sub>3</sub> (-), esculinase (-), gélatinase (-), maltose (-), mannitol (-) (Eyquem *et al.*, 2000).

#### c) Pouvoir pathogène

Chez l'homme, *B. cepacia* peut être responsable d'IN diverses, principalement chez les malades immunodéprimés, et d'états de colonisation/infection pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose. Dans ce contexte, les infections à *B. cepacia* sont parfois dramatiques, entraînant une aggravation de l'état général et aboutissant même rapidement à un décès. La cause principale est la contamination du matériel de ventilation (Segonds *et al.*, 1996; Flanagan et Paull, 1998; Prescott *et al.*, 2003).

## 2.6. *Stenotrophomonas maltophilia*

Le genre *Stenotrophomonas* (anciennement *Xanthomonas*) appartient à la famille des *Pseudomonadaceae*, *S. maltophilia* est l'espèce type du genre. Cette bactérie fut décrite par Hugh et Ryschenkow en 1961 sous le nom de *Pseudomonas maltophilia* en raison de sa ciliature multitrèche polaire et de l'acidification du maltose. L'existence de relations étroites unissant *P. maltophilia* et le genre *Xanthomonas* sur la base de caractères génotypiques et phénotypiques, a conduit en 1983 à les classer comme *Xanthomonas maltophilia* (Avril *et al.*, 2000).

### a) Habitat et épidémiologie

Bactérie très ubiquiste que l'on trouve dans l'environnement hydrique, et plus fréquemment encore dans le sol, et dans les végétaux. Dans l'environnement hospitalier, sa présence est liée à celle d'eaux contaminées: eau du robinet ou distillée, siphons d'évier, nébuliseurs, respirateurs, humidificateurs, bains de dialyse, surfaces humides, solutions antiseptiques et désinfectants dilués par de l'eau contaminée. Les facteurs de virulence de *S. maltophilia*, encore peu connus, contribueraient à son implantation et à sa diffusion dans les sites colonisés (plaies, cathéters, appareil respiratoire) (Avril *et al.*, 2000).

### b) Caractères bactériologiques

#### ➤ Caractères morphologiques et culturels

Il s'agit d'un bacille droit, légèrement incurvé, non sporulé, mobile grâce à une ciliature polaire multitrèche à trois flagelles ou plus, de taille 0,5 µm de largeur sur 1,5 µm de longueur. Les colonies ne sont pas pigmentées et ne sont pas muqueuses. *S. maltophillia* donne sur gélose ordinaire, des colonies lisses, brillantes avec des bords entiers de couleur blanche à jaune pâle. Cette bactérie se développe à des températures entre 5 et 40°C et à un optimale de 35°C (Avril *et al.*, 2000).

#### ➤ Caractères biochimiques

Les principaux caractères positifs de *S. maltophillia* sont : catalase, gélatinase, LDC. Les principaux caractères négatifs sont: oxydase, nitrate réductase, glucose, indole, VP, uréase (Avril *et al.*, 2000).

### c) Pouvoir pathogène

C'est en fait une bactérie commensale ubiquiste, qui va, lors de l'hospitalisation, coloniser les patients. Sous l'effet de la pression de sélection d'antibiotiques auxquels il est habituellement multirésistant et du nombre croissant de malades immunodéprimés, *S. maltophilia* a émergé comme un agent d'IN d'importance majeure. Par ordre d'importance d'isolement dans les IN, c'est le deuxième BGNnf après *P. aeruginosa*. Il devient plus fréquent dans la mucoviscidose.

*S. maltophilia* est l'agent d'infections opportunistes: bactériémies, endocardites, cellulites, méningites, chez des hospitalisés immunodéficients et atteints d'affections malignes (Avril *et al.*, 2000).

## 3. *Aeromonas*

Le genre *Aeromonas* comporte au moins sept espèces dont *Aeromonas hydrophila* est la plus fréquemment isolée en pathologie humaine (Flandrois, 1997; Emmerson *et al.*, 1997).

### a) Habitat

Les *Aeromonas*, bactéries des eaux douces de surface, dans les eaux stagnantes et souillées par des rejets d'égouts ou par des animaux, mais aussi dans les eaux de mer et de lagunes recevant de l'eau douce. Les eaux de puits, de citernes et de piscines sont souvent mises en cause mais aussi les eaux potables même après chloration.

Elles sont également parfois isolées de l'environnement hospitalier, l'eau des bains de dialyse est également une source de contamination potentielle pour les malades. Les *Aeromonas* peuvent persister plusieurs mois, voire plusieurs années dans l'eau et dans le sol (Flandrois, 1997; Emmerson *et al.*, 1997).

### b) Caractères bactériologiques

#### ➤ Caractères morphologiques et culturels

Ce sont des bacilles qui peuvent prendre un aspect coccobacillaire de taille comprise entre 1 à 4 µm de long sur 0,6 µm de large, mobiles par ciliature polaire habituellement monotriche

(espèces impliquées dans les infections humaines) ou immobiles (*A. salmonicida*). Ce sont des bactéries aéro-anaérobies qui donnent des colonies de 1 à 3 mm translucides, ressemblant aux entérobactéries (Eyquem *et al.*, 2000; Brenner *et al.*, 2005).

#### ➤ Caractères biochimiques

Les *Aeromonas* sont: oxydase (+), catalase (+), ONPG (+), ADH (+), fermentant le glucose avec ou sans gaz, réduisant les nitrates en nitrites (Emmerson *et al.*, 1997).

#### c) Pouvoir pathogène

Les *Aeromonas* sont des pathogènes habituels des poissons, des reptiles et des amphibiens. La contamination de l'homme se fait par ingestion ou contact d'une peau ou d'une muqueuse lésée avec de l'eau contaminée. Les *Aeromonas* sont le plus fréquemment responsables de diarrhée aigue souvent cholériforme, d'abcès cutanés, d'otite moyenne et de conjonctivites. Des cas de septicémie, d'endocardite, de méningite, d'arthrite, d'ostéomyélite et d'infection d'ascite ont été décrits, en particulier chez des patients présentant des affections hépatobiliaires (cirrhose surtout), mais aussi dans les états d'immunodépression ou chez le patient granulopénique. Des pneumopathies ont été rapportées après inhalation d'eau de baignade (Flandrois, 1997; Emmerson *et al.*, 1997).

## **Chapitre 03 :**

# **Résistance aux antibiotiques des Bacilles Gram négatifs**

## 1. Résistance aux antibiotiques

Des espèces bactériennes ou certaines souches d'une même espèce bactérienne peuvent être résistantes à l'action d'un ou de plusieurs antibiotiques. On parle alors, dans ce dernier cas, de résistance croisée ou de résistance multiple. La résistance bactérienne résulte toujours de l'incapacité de l'antibiotique à agir sur sa cible, du fait de la réaction des bactéries vis à vis de l'antibiotique, exprimée par divers mécanismes (**Bousseboua, 2005**).

### 1.1. Définition

Une souche bactérienne est considérée résistante à un antibiotique donné, lorsqu'elle est capable de croître en présence de cet antibiotique, à une concentration significativement plus élevée que celle normalement active sur les souches sensibles de cette espèce.

Dans le domaine médical, une souche bactérienne est considérée résistante si le traitement antibiotique appliqué ne peut permettre d'atteindre une concentration sanguine de l'antibiotique au moins égale à sa concentration minimale inhibitrice (CMI) (**Bousseboua, 2005**).

### 1.2. Types de résistance

Les résistances bactériennes aux antibiotiques peuvent être naturelles ou acquises.

#### 1.2.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle, appelée aussi résistance intrinsèque est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce. Elle est programmée sur le génome bactérien, donc fixe et constante à l'intérieur du taxon et transmise à la descendance. A ce titre, elle constitue un critère d'identification des bactéries et détermine le phénotype « sauvage » des bactéries. On peut citer, à titre d'exemple, les résistances naturelles des entérobactéries et de *Pseudomonas* aux macrolides (**Doublet, 2004**).

#### 1.2.2. Résistance acquise

Le terme de résistance acquise est utilisé pour désigner des processus permettant à des bactéries appartenant à une espèce originellement sensible de devenir résistantes à un ou plusieurs antibiotiques. Les résistances acquises sont dues à des modifications génétiques,



consistant en des mutations sur des gènes déjà présents chez la bactérie (résistance par mutation chromosomique), ou en l'acquisition de nouveaux gènes de résistance par transfert horizontal (résistance extra-chromosomique) (Leclerc *et al.*, 1995).

#### a) Résistances par mutation chromosomique

La résistance par mutation est peu répandue en clinique (moins de 20% des résistances acquises). Ce type de résistance est observé, entre autres, chez les mycobactéries. Les résistances mutationnelles sont:

- spontanées: elles préexistent à l'utilisation de l'antibiotique;
- stables: elles se transmettent verticalement dans le clone bactérien;
- spécifiques: elles n'intéressent qu'un antibiotique ou qu'une seule famille d'antibiotiques;
- rares: le taux de mutation se situe habituellement entre  $10^{-7}$  et  $10^{-8}$  (Leclerc *et al.*, 1995).

#### b) Résistances extra-chromosomiques

Les résistances extra-chromosomiques sont fréquentes (plus de 80% des résistances acquises), et contagieuses. Les supports de ces résistances peuvent être des plasmides qualifiés plasmides R (R: résistance) ou des transposons acquis par conjugaison ou plus rarement par transduction. Ces résistances se transmettent horizontalement entre bactéries cohabitant, même d'espèces différentes (Leclerc *et al.*, 1995; Bathily, 2002). Du fait que les plasmides R codent le plus souvent pour plusieurs résistances aux antibiotiques, appartenant à des familles différentes, leur acquisition confère une résistance multiple qui pose de grands problèmes dans l'utilisation thérapeutique des antibiotiques (Bousseboua, 2005).

### 1.3. Niveaux de résistance

Les bactéries résistantes peuvent exprimer leur résistance aux antibiotiques à des niveaux différents de concentration, selon les antibiotiques et les espèces bactériennes. On parle de résistance de bas niveau lorsque la croissance des bactéries est arrêtée par de faibles doses d'antibiotique et de résistance de haut niveau lorsque cette croissance bactérienne est stoppée par de fortes concentrations d'antibiotique (Bousseboua, 2005).

### 1.4. Mécanismes de Résistance

Huit mécanismes de résistance sont impliqués chez les bactéries à Gram négatif (Figure 03), certains étant médiés par un plasmide. Ces mécanismes comprennent :

- la perte de porines, qui réduit le mouvement de l'antibiotique (ATB) à travers la membrane cellulaire;
- la présence de  $\beta$ -lactamases dans l'espace périplasmique, ce qui dégrade les  $\beta$ -lactamines;
- une surexpression de la pompe d'efflux transmembranaire, ce qui expulse l'ATB à partir de la bactérie avant qu'il puisse avoir un effet;
- la présence des enzymes de modification des antibiotiques, ce qui rend l'ATB incapable d'interagir avec sa cible;
- des mutations de la cible, qui empêchent l'ATB de se lier à son site d'action;
- des mutations ou des modifications ribosomales qui empêchent l'ATB de se lier et d'inhiber la synthèse des protéines;
- des mécanismes de contournement métabolique, qui utilisent une enzyme alternative résistante pour contourner l'effet inhibiteur de l'antibiotique;
- une mutation dans le lipopolysaccharide (LPS), qui rend la classe des polymyxines incapable de se lier à cette cible (Peleg et Hooper, 2010).

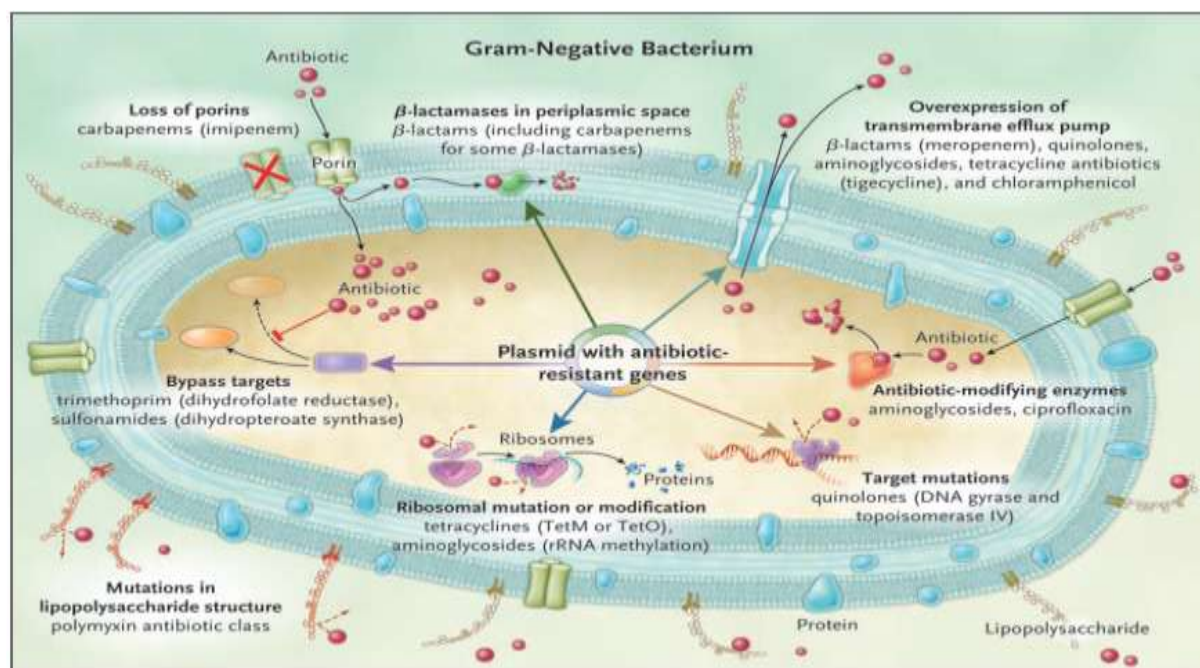


Figure 03 : Mécanismes de résistance des bactéries Gram-négatives, et les antibiotiques touchés (Peleg et Hooper, 2010)

### 1.5. Phénotype de résistance

C'est l'expression de la résistance d'une souche, vis-à-vis de plusieurs antibiotiques de même famille ou de familles différentes. Le choix judicieux des antibiotiques testés permet parfois de reconnaître le mécanisme de résistance et/ ou le génotype correspondant au phénotype observé. L'étude du phénotype de résistance est proposée pour identifier certaines souches bactériennes responsables d'infections nosocomiales (**Bathily, 2002**).

## 2. Résistance des entérobactéries aux antibiotiques

Les principaux mécanismes de résistance à détecter chez les entérobactéries sont:

- Résistance aux  $\beta$ -lactamines par inactivation enzymatique par les  $\beta$ -lactamases;
- Résistance aux fluoroquinolones par modification de la cible;
- Résistance aux aminosides par inactivation enzymatique (**Fauchère, 1997**).

### 2.1. Entérobactéries et $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines représentent la principale famille d'antibiotiques la plus développée et la plus utilisée dans le monde. Cette large utilisation est due à leur large spectre d'action, leur faible toxicité, leur efficacité et à leur faible coût pour certaines molécules (**Livemore, 1995**).

#### 2.1.1. Définition et classification des $\beta$ -lactamases

Les entérobactéries peuvent résister aux  $\beta$ -lactamines par production des  $\beta$ -lactamases, des enzymes qui catalysent de manière efficace et irréversible l'hydrolyse de la liaison amide du cycle  $\beta$ -lactame des  $\beta$ -lactamines, en donnant un produit qui perd totalement son activité antimicrobienne (**Matagne et al., 1998**). Les gènes qui codent pour ces enzymes sont d'origine chromosomique ou plasmidique. Ces gènes ont aussi été détectés sur des transposons et des intégrons facilitant ainsi le transfert horizontal de ces gènes entre espèces phylogénétiquement éloignées (**Livemore, 1995b**).

Plus de 290 types de  $\beta$ -lactamases sont décrits, dont la plus grande partie des  $\beta$ -lactamases a été mise en évidence chez les BGN qui sont de plus en plus multirésistants (**Bergogne-Bérézin et Dellamonica, 1999**).

Les  $\beta$ -lactamases sont classées suivant deux schémas :

- La classification moléculaire de Ambler (**Ambler, 1980**) : qui tient compte de la structure primaire des différentes  $\beta$ -lactamases et les divisent en quatre classes (A à D).
- La classification fonctionnelle de Bush-Jacoby- Medeiros (**Bush et al., 1995**) : où les auteurs tiennent compte de la fonctionnalité des  $\beta$ -lactamases (substrat, profil d'inhibition) et divisent aussi ces enzymes en quatre groupes (1 à 4) avec plusieurs sous-groupes (Tableau 37 en Annexe).

Les  $\beta$ -lactamases des classes A, C et D font partie des enzymes à sérine active, qui possèdent dans leur site actif une sérine qui intervient dans le mécanisme d'acylation au cours de l'hydrolyse des  $\beta$ -lactamines. Par contre la classe B inclut les métallo-  $\beta$ -lactamases dont l'activité nécessite la présence d'ions métalliques (un ou deux ions de zinc).

La classe A est la plus diversifiée, on y retrouve les pénicillinases des bactéries à Gram positif, les  $\beta$ -lactamases plasmidiques à large spectre qui hydrolysent les céphalosporines avec autant d'efficacité que les pénicillines, les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi qui hydrolysent les C3G et les monobactames. La majorité de ces enzymes est sensible aux inhibiteurs (acide clavulanique, sulbactame et tazobactame) utilisés en médecine. Les principaux représentants de ce groupe sont les  $\beta$ -lactamases du type TEM, SHV et récemment le type CTX-M.

Dans la classe C, on retrouve les céphalosporinases qui sont des enzymes résistantes à l'action de l'acide clavulanique et le sulbactame ; toutefois certaines sont faiblement inhibées par le tazobactame (**Doi et al., 2004**). Leur hyperproduction est associée au phénotype de multirésistance observé chez certains BGN. Au départ à médiation chromosomique, les  $\beta$ -lactamases de la classe C sont aussi aujourd'hui à médiation plasmidique (**Philippon et al., 2002**). Les représentants de ce groupe sont les enzymes du type AmpC, FOX, ACT, CMY.

La classe D regroupe les  $\beta$ -lactamases qui hydrolysent les isoxazolylpénicillines comme la cloxacilline et l'oxacilline. Ces dernières sont réfractaires à l'hydrolyse par les autres classes de  $\beta$ -lactamases et possèdent une certaine activité inhibitrice. On les appelle des oxacillinases et sont représentées par les  $\beta$ -lactamases du type OXA. Ces enzymes sont plus ou moins résistantes à l'action de l'acide clavulanique, mais sont bien inhibées par le tazobactame (**Livermore, 1995a**).

Les  $\beta$ -lactamases de la classe B hydrolysent les carbapénèmes, composés qui échappent à l'activité des  $\beta$ -lactamases à sérine active. La plupart des métallo- $\beta$ -lactamases hydrolysent une variété de pénicillines et de céphalosporines, et sont insensibles aux inhibiteurs classiques (acide clavulanique, sulbactame, tazobactame). A partir de la séquence des enzymes, cette classe est subdivisée en trois sous classes, B1, B2, et B3 (**Galleni et al., 2001**).

### 2.1.2. $\beta$ -lactamases à spectre élargi

Les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE) constituent un groupe d'enzymes qui ont la propriété commune de conférer la résistance aux pénicillines, aux C1G, C2G et C3G, à l'aztréonam (mais non aux céphamycines et carbapénèmes) par hydrolyse de ces antibiotiques, et qui sont inhibées par les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases tel l'acide clavulanique (**Bush et al., 1995**).

La présence des BLSE a été décrite pour la première fois chez *Klebsiella ozaenae*, en 1983 en Allemagne, puis en 1984 chez *K. pneumoniae* et *E. coli* en France et en Tunisie (**Kliebe et al., 1985 ; Knothe et al., 1983**). Ces enzymes avaient été désignées céfotaximase et ceftazidimase car elles conféraient aux bactéries qui les produisaient une résistance préférentielle à la céfotaxime ou à la ceftazidime. Elles inactivaient aussi d'autres  $\beta$ -lactamines telles que la ceftriaxone et l'aztréonam. La répartition de ces enzymes est aujourd'hui mondiale (**Bradford, 2001 ; Paterson et Bonomo, 2005**).

Les BLSE sont à médiation plasmidique et appartiennent à la classe moléculaire A de Ambler et au groupe 2be de la classification de Bush-Jacoby- Medeiros à l'exception des BLSE OXA (Classe D de Ambler et 2d de Bush-Jacoby-Meideros) (**Bush et al., 1995**).

De par leur propriété d'être inhibées par l'acide clavulanique elles se différencient des  $\beta$ -lactamases du groupe C produites par les bacilles à Gram-négatif tel *Enterobacter* qui peuvent posséder un spectre élargi par surproduction mais qui sont résistantes à l'acide clavulanique et sont sensibles aux C4G (céfépime, cefpirome) (**Cosgrove et al., 2002**). Elles diffèrent aussi des métallo- $\beta$ -lactamases qui quoique hydrolysant toutes les  $\beta$ -lactamines (pénicillines, céphalosporines et carbapénèmes) ne sont inhibées que par l'EDTA (**Walsh et al., 2005**).

### 2.1.3. Diversité des types de BLSE

#### ➤ TEM

Les BLSE de type TEM (TEMnoniera) dérivent de TEM-1 et TEM-2 par substitution d'un ou de plusieurs acides aminés. Bien que les BLSE de ce type soient le plus souvent produites par *E. coli* et *K. pneumoniae*, ces enzymes ont été aussi mises en évidence chez les autres espèces d'Entérobactéries (*Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri* et *Salmonella* spp.) et chez *Pseudomonas aeruginosa* (TEM-42) (**Bradford, 2001**).

#### ➤ SHV

La  $\beta$ -lactamase SHV-1 (Sulfi Hydroxyl Variable) qui est l'enzyme à partir de laquelle les BLSE de type SHV dérivent par substitution d'un ou de plusieurs acides aminés est très fréquentes chez *K. pneumoniae*. Cette enzyme hydrolyse les pénicillines, les céphalosporines mais pas les oxyimino-céphalosporines et l'aztréonam (**Hammond et al., 2005**). La majorité de ces enzymes ont été décrites chez les souches de *K. pneumoniae*. Toutefois ces enzymes ont été trouvées chez *Citrobacter freundii*, *C. diversus*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae* et *P. aeruginosa* (**Bradford, 2001 ; Gangoué Piéboji, 2000 ; Gangoué-Piéboji et al., 2005b**).

#### ➤ CTX-M

Les BLSE du type CTX-M (Cefotaximase-Muenchen) font partie des BLSE non-TEM et SHV et possèdent moins de 40% d'homologie avec les BLSE TEM et SHV. Elles sont plasmidiques et confèrent une forte résistance au céfotaxime et au ceftriaxone et ont juste un effet marginal sur la CMI de la ceftazidime (**Tzouveleki et al., 2000**). Rapportées pour la première fois au milieu des années 1980, elles montrent un niveau de dissémination dans les bactéries et partout dans le monde qui a augmenté dramatiquement depuis 1995. Les enzymes de la famille CTX-M sont isolées de nombreuses espèces d'entérobactéries et qui sur la base de leur séquences protéiques sont divisés en cinq groupes, CTXM-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-9 et CTX-M-25) (**Bonnet, 2004**).

#### ➤ OXA

Les BLSE OXA diffèrent des types TEM et SHV par le fait qu'elles appartiennent à la classe D et au groupe 2d (**Bush et al., 1995**). Contrairement à ce qui est observé dans les BLSE de la classe A qui sont produites le plus souvent par les entérobactéries, les BLSE OXA sont en grande majorité détectées chez *P. aeruginosa*. Plus d'une dizaine de ces enzymes ont été

mises en évidence et la majorité provient de OXA-10 par mutation d'un ou de plusieurs acides aminés (Bradford, 2001).

#### ➤ Autres types de BLSE

En plus des BLSE connues, de nouvelles familles classées parmi les BLSE non-TEM et non-SHV ont apparu. Ces BLSE appartiennent à la classe A de Ambler et ont été isolées non seulement de *P. aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* mais aussi des entérobactéries. Parmi ces nouvelles familles, le type GES (Guyana Extended Spectrum bêta-lactamase), le type PER (P. Normann, E. Ronco, R. Labia) et le type VEB (Vietnam Extended Spectrum Bêta-lactamase) (Poirel et Nordmann, 2005).

#### 2.1.4. Résistances naturelles

Toutes les entérobactéries sont naturellement résistantes aux pénicillines G et M. Elles peuvent être divisées en quatre groupes (Tableau 06) en fonction de leur comportement vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines (Tableau 07) (Fauchère, 1997).

**Tableau 06: Entérobactéries et  $\beta$ -lactamines: groupes de résistance naturelle (Fauchère, 1997)**

Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4
<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Serratia</i>	<i>Yersinia</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Citrobacter diversus</i>	<i>Enterobacter</i>	
<i>Salmonella</i>	<i>Levinea</i>	<i>Citrobacter</i> « non diversus »	
<i>Shigella</i>		<i>Morganella</i>	
		<i>Providencia</i>	

- **Les entérobactéries du groupe I** sont naturellement sensibles aux  $\beta$ -lactamines (sauf pénicillines G et M). Le phénotype sauvage est donc sensible aux aminopénicillines.
- **Les entérobactéries du groupe II** sont naturellement résistantes aux amino, uréido et carboxypénicillines par l'action d'une pénicillinase (Pase) naturelle produite à bas niveau.
- **Les entérobactéries du groupe III** sont naturellement résistantes aux aminopénicillines et aux céphalosporines de première génération (C1G) par l'action d'une céphalosporinase (Case) naturelle produite à bas niveau.

- **Les entérobactéries du groupe IV** sont naturellement résistantes aux amino, uréido et carboxypénicillines et aux C1G, par l'action combinée d'une Pase et d'une Case naturelles produites à bas niveau (Fauchère, 1997).

**Tableau 07: Résistances naturelles des entérobactéries aux  $\beta$ -lactamines (Fauchère, 1997)**

Groupe de $\beta$ -lactamines	Groupe I	Groupe II	Groupe III	Groupe IV
<b>Amino</b>	S	R	R	R
<b>Carbox</b>	S	R	S	R
<b>Uréido</b>	S	I	S	I
<b>C1G</b>	S	S	R	R
<b>C3G</b>	S	S	S	S
<b>Carbapénèmes</b>	S	S	S	S
<b>Mécanismes de résistance</b>	BL-	Pase	Case	Pase + Case

**Amino:** aminopénicillines, **Carbox:** carboxypénicillines, **Uréido:** uréidopénicillines, **C1G:** céphalosporines de première génération, **C3G:** céphalosporines de troisième génération, **Pase:** pénicillinase, **Case:** céphalosporinase, **S:** sensible, **R:** résistant, **I:** intermédiaire, **BL-:** absence de  $\beta$ -lactamases

### 2.1.5. Résistances acquises

Les mécanismes de résistance acquise des entérobactéries aux  $\beta$ -lactamines reposent sur l'expression de divers type de  $\beta$ -lactamases :

- Pénicillinase de bas niveau (Pase BN);
- Pénicillinase de haut niveau (Pase HN);
- Pénicillinase résistante aux inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases (TRI);
- Céphalosporinase de bas niveau: inductible (Case BN);
- Céphalosporinase de haut niveau: dérprimée (Case HN);
- $\beta$ -lactamase à spectre élargi (BLSE).

La détection de ces six mécanismes peut être réalisée au moyen de six antibiotiques marqueurs qui vont permettre d'individualiser six phénotypes de résistance (Tableau 08) (Fauchère, 1997).



**Tableau 08: Phénotypes de résistance des entérobactéries aux  $\beta$ -lactamines (Fauchère, 1997)**

Marqueurs	Pase BN	Pase HN	TRI	Case BN	Case HN	BLSE
AMX	R	R	R	R	R	R
AMC	S	I/R	R	R	R	R
TIC	R	R	R	S	R	R
MEC	S	R	R	S	S	R
CF	S	R	S	R	R	R
CAZ	S	S	S	S	R	R

**AMX:** amoxicilline, **AMC:** amoxicilline-acide clavulanique, **TIC:** ticarcilline, **CF:** céfalotine, **CAZ:** céftazidime, **Pase BN:** pénicillinase de bas niveau, **Pase HN:** pénicillinase de haut niveau, **TRI:** pénicillinase résistante aux inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases, **BLSE:**  $\beta$ -lactamase à spectre élargi, **MEC:** mécillinam, **I/R:** intermédiaire à résistant.

En testant six antibiotiques marqueurs, on peut donc définir des phénotypes de résistance caractéristiques des mécanismes de résistance. Nous allons passer en revue chacun des 4 groupes d'entérobactéries en leur appliquant la lecture interprétative de l'antibiogramme (Tableaux 09, 10 et 11) (Fauchère, 1997).

Tableau 09:  $\beta$ -lactamines et entérobactéries du groupe I (Fauchère, 1997)

ATB à étudier	Phénotypes								
	1	2	3	4	5	6	7	8	
AMX	S	R	R	R	R	R	R	R	
AMC	S	S	R	I/R	R	R	I/R	R	
TIC	S	R	R	R	S	R	R	R	
MEC	S	S	S	R	S	S	R	R	
CF	S	S	S	R	R	R	R	R	
CAZ	S	S	S	S	S	R	R	S	
Mécanisme de Résistance	BL -	Pase BN	Pase TRI	Pase HN	Case BN	Case HN	BLSE	Pase + Case BN	
Résistances	R	R	R	R	R	R	R	R	
		Amino Carbox Uréido	Amino AMC Carbox± I Uréido ± I	Amino AMC C1G CXM Carbox Uréido	Amino AMC C1G C2G	Amino AMC C1G C2G C3G Carbox Uréido	Amino AMC C1G C2G C3G Carbox Uréido	Amino AMC C1G C2G C3G Carbox Uréido	Amino AMC C1G C2G Carbox Uréido MEC
Sensibilités	S	S	S	S	S	S	S	S	
	à toutes les bla sauf Pénic G et M	AMC C1G C2G C3G IMP	CF C3G ATM	FOX C3G IMP ATM	Uréido Carbox C3G IMP	IMP	IMP FOX MOX	C3G IMP	

**bla:**  $\beta$ -lactamines, **C2G:** Céphalosporines 2<sup>e</sup> génération, **Péni:** Pénicilline, **IMP :** Imipénème, **ATM:** Aztréonam, **FOX:** Céfoxitine, **MOX:** Moxalactam, **CXM:** Céfuroxime.

Tableau 10:  $\beta$ -lactamines et entérobactéries du groupe II (Fauchère, 1997)

ATB à étudier	Phénotypes			
	1	2	3	4
AMX	R	R	R	S
AMC	S	R	R	S
TIC	R	R	R	S
MEC	S	R	R	S
CF	S	R	R	S
CAZ	S	S	R	S
Mécanisme de Résistance	Pase natur BN	Pase de très HN	BLSE	R natur
Résistances	R	R	R	R
	Amino Carbox Uréido	Amino, AMC C1G, C2G Uréido, Carbox, MEC	Amino, AMC C1G, C2G, C3G Carbox, Uréido, ATM	Amino Carbox Uréido
Sensibilités	S	S	S	S
	Autres bla	FOX, C3G, ATM, IMP	IMP, FOX, MOX	Autres $\beta$ -lactamines

natur: naturelle

Tableau 11:  $\beta$ -lactamines et entérobactéries du groupe III et groupe IV (Fauchère, 1997).

## Entérobactéries du groupe III

## Entérobactéries du groupe IV

ATB à étudier	Phénotypes						1
	1	2	3	4	5	6	
AMX	R	R	R	R	S	R	R
AMC	R	R	R	I/R	S	R	R
TIC	S	R	R	R	S	R	R
MEC	S	R	S	R	S	R	S
CF	R	R	R	R	S	R	R
CAZ	S	S	R	R	S	R	S
Mécanisme de Résistance	Case natur BN	Pase + Case natur	Case HN	BLSE	R natur	Case HN + BLSE	Case BN + Pase de BN
Résistances	R	R	R	R	R	R	R
	Amino Amc C1G	Amino Amc C1G Carbox Uréido MEC	Amino Amc C1G, C2G, C3G Carbox Uréido MEC* ATM	Amino Amc C1G, C2G C3G Carbox Uréido ATM	Amino Amc C1G		Amino Amc C1G
Sensibilités	S	S	S	S	S	S	S
	Autres bla sauf R natur	C2G C3G ATM IMP	MEC** IMP CPO FEP	IMP	Autres bla sauf R natur	Risque de R à IMP	Uréido C2G C3G

\**M. morgani*, *S. marcescens*, *P. vulgaris*, \*\**E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, **CPO**: Cefpirome, **FEP**: Cefépime

## 2.2. Entérobactéries et aminosides

Les principaux mécanismes de résistance acquise des entérobactéries aux aminosides font intervenir des enzymes qui peuvent exister simultanément: phosphotransférases (APH), acétyltransférases (AAC) et nucléotidyltransférases (ANT). L'utilisation de cinq antibiotiques marqueurs permet d'individualiser neuf phénotypes de résistance principaux (Tableau 12).

**Tableau 12: Phénotypes de résistance des entérobactéries aux aminosides (Fauchère, 1997)**

Phénotypes	K	TOB	AN	GM	NET
Sauvage	S	S	S	S	S
APH (3')	R	S	S	S	S
AAC (3)-I	S	S	S	S/I/R	S
AAC (3)-II	S/I/R	R	S	R	I/R
AAC (6')	S/I/R	I/R	S/I/R	S	I/R
ANT (2'')	S/I/R	I/R	S	I/R	S
AAC (2')	S	S/I/R	S	S/I/R	S/I/R
APH (3') + AAC (3)-I	R	S	S	S/I/R	S
AAC (6') + AAC (3)-I	I/R	I/R	S/I/R	S/I/R	I/R

**K**: kanamycine, **TOB**: tobramycine, **AN**: Amikacine, **GM**: gentamicine, **NET**: nétilmicine.

Les mécanismes AAC (6') et AAC (3)-II sont très fréquemment associés à une BLSE. Leur détection est une raison majeure de rechercher une BLSE (Fauchère, 1997).

## 2.3. Entérobactéries et quinolones

La résistance des entérobactéries aux quinolones de première génération (acide nalidixique, acide pipémidique) et aux fluoroquinolones (péfloxacin, norfloxacin, ofloxacin et ciprofloxacine) est due principalement à des modifications de leur cible: l'ADN gyrase. Cette résistance est croisée entre toutes les quinolones. Elle est progressive par accumulation des effets de mutations chromosomiques successives. L'acide nalidixique sera le premier touché puis la péfloxacin et la norfloxacin, ensuite l'ofloxacin et enfin la ciprofloxacine. L'acquisition progressive de ces niveaux de résistance est très fréquente. Elle peut émerger au cours d'un traitement prolongé par une quinolone en monothérapie.

L'antibiogramme doit évaluer le niveau de résistance de la souche testée. Il est nécessaire de tester l'acide nalidixique, la péfloxacinine ou la norfloxacinine, l'ofloxacinine et/ou la ciprofloxacine. Plusieurs niveaux de résistance aux quinolones sont décrits (Tableau 13) (Fauchère, 1997).

**Tableau 13: Phénotypes de résistance des entérobactéries aux quinolones (Fauchère, 1997)**

Marqueurs	NalS	NalR	PefR	CipR
Acide nalidixique	S	R	R	R
Pefloxacinine	S	S	R	R
Ciprofloxacine	S	S	S	R

NAL: acide nalidixique, PEF: péfloxacinine, CIP: ciprofloxacine.

### 3. Résistance des BGNnF aux antibiotiques

Les BGNnF sont naturellement résistants à de nombreux antibiotiques et peuvent acquérir de nombreux mécanismes de résistance comme pour les  $\beta$ -lactamines, les aminosides et les fluoroquinolones. C'est pourquoi la réalisation d'un antibiogramme est nécessaire pour choisir au mieux le traitement antibiotique et l'adapter en fonction du site de l'infection. Ces BGNnF sont capables de résister à de nombreux antibiotiques grâce à une membrane externe peu perméable et grâce au développement de nombreux mécanismes de résistances ( $\beta$ -lactamases, imperméabilité sélective ou non en relation avec les porines, modification des protéines liant la pénicilline, modification d'affinité de certaines enzymes...).

Ces bactéries peuvent être sélectionnées par une antibiothérapie à large spectre et devenir progressivement multirésistantes aux antibiotiques diffusant au sein des établissements de soins (Jehl *et al.*, 1995; Kohler *et al.*, 1999).

#### 3.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Les principaux mécanismes de résistance à rechercher chez *P. aeruginosa* sont:

- Résistance aux  $\beta$ -lactamines:
  - par inactivation enzymatique ( $\beta$ -lactamases);
  - par imperméabilité (mutation de porine);
- Résistance aux aminosides par inactivation enzymatique;

➤ Résistance aux fluoroquinolones par modification de la cible (ADN gyrase).

*P. aeruginosa* est naturellement résistante à amoxicilline, amoxicilline + clavulanate, cefotaxime, ceftriaxone, chloramphénicol, streptomycine, kanamycine, mécilinam, quinolones 1<sup>ère</sup> génération, nitrofuranes, C1G et C2G (Fauchère, 1997; Cavallo *et al.*, 2002).

### 3.1.1. Résistance aux $\beta$ -lactamines

#### 3.1.1.1. Phénotypes de résistance

Cinq marqueurs permettent de détecter les principaux mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines (Tableau 14). Ces mécanismes peuvent s'associer, combinant ainsi les résistances. Il est intéressant de tester en complément les associations pipéracilline-tazobactam et ticarcilline-acide clavulanique pour proposer des alternatives aux molécules testées (Fauchère, 1997; Poirel et Nordmann, 2006).

Tableau 14: *P. aeruginosa* et  $\beta$ -lactamines (Fauchère, 1997)

ATB à étudier	Phénotype						
	1	2	3	4	5	6	7
TIC	S	R	R	R	R	S	R
PIP	S	R	S	R	R	S	R
CAZ	S	S	S	S	R	S	R
ATM	S	S	R	R	R	S	R
IMP	S	S	S	S	S	R	R
Mécanisme de résistance	Case natur inducible	Pase HN	Imperméabilité	Imperméabilité Pase HN	Case HN	Imperméabilité sélective OprD2	Imipénèmase
Sensibilité	Carbox Uréido	CAZ ATM	Uréido	CAZ	IPM	Uréido	

#### 3.1.1.2. Mécanismes de la résistance acquise

La résistance acquise résulte d'une modification génétique par mutation ou d'une acquisition de matériel génétique étranger. Chez *P. aeruginosa*, cette résistance peut être enzymatique ou non enzymatique (Faure, 2009).

### a) Résistance enzymatique

*P. aeruginosa* est capable de résister à de nombreuses  $\beta$ -lactamines grâce aux diverses classes de  $\beta$ -lactamases.

#### ➤ Hyperproduction de céphalosporinase chromosomique de classe C

La  $\beta$ -lactamase chromosomique de type AmpC a été décrite chez une large variété de bacilles à Gram négatif tel que *P. aeruginosa*. Des mutations dans le système de régulation de la production entraînent une production stable à haut niveau d'AmpC affectant l'activité de l'ensemble des  $\beta$ -lactamines à l'exception de celle des carbapénèmes (**Poirel et Nordmann, 2006**).

#### ➤ Oxacillinase de classe D

Les oxacillinases en général hydrolysent l'oxacilline, la méticilline, cloxacilline et la benzylpénicilline, et leur activité est inhibée par NaCl. De plus, elles sont faiblement inhibées par l'acide clavulanique. La plupart des  $\beta$ -lactamases de type OXA n'hydrolysent pas de façon significative les C3G/C4G mais l'évolution par mutation(s) ponctuelle(s) vers un élargissement du spectre a dû avoir lieu comme pour les dérivés de TEM/SHV.

Chez *P. aeruginosa* des BLSE dérivées d'OXA-10 et OXA-2 ont été isolées ainsi que la  $\beta$ -lactamase OXA-18, ces enzymes sont localisées sur des plasmides (sauf OXA-18). Ils hydrolysent la plupart des  $\beta$ -lactamines y compris les céphalosporines, l'imipénème et le méropénème. L'aztréonam et la pipéracilline sont moins touchés, mais leurs activité n'est pas inhibée par l'acide clavulanique ou le tazobactam. L'OXA-18 est la seule  $\beta$ -lactamase de classe D inhibée par l'acide clavulanique identifiée chez *P. aeruginosa*, *blaOXA-18* est localisé au niveau de chromosome (**Pourriat et Martin, 2005**).

#### ➤ Carbapénémases de classe B

La résistance acquise aux carbapénèmes, initialement rapportée comme liée à un déficit de la porine OprD2, peut être maintenant en relation avec la synthèse de  $\beta$ -lactamases de type carbapénémase (classe B) (**Philippon et Arlet, 2006**).

➤  **$\beta$ -lactamases à spectre étendu ou élargi**

Cinq types de BLSE de classe A (TEM, SHV, PER, VEB et GES) ont été détectés chez *P.aeruginosa* (Vora et Auckenthaler, 2009).

**b) Résistance non enzymatique**

➤ **Surexpression de système d'efflux**

La résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques peut aussi résulter non pas d'une hydrolyse, mais d'une augmentation de l'efflux actif. L'efflux actif de type MexA– MexB–OprM induit une résistance ou une diminution de la sensibilité à la ticarcilline et à l'aztréonam, alors que la sensibilité à la piperacilline et à la ceftazidime est conservée. Avec MexC–MexD–OprJ, c'est la sensibilité au cefpirome et au céfépime qui est diminuée ou abolie. MexE, MexF, OprN induisent en outre une résistance à l'imipénème (Pechère *et al.*, 1998).

➤ **Perte de la porine OprD2**

Dans les bactéries à Gram négatif, les porines bactériennes sont une des voies principales d'entrée pour les antibiotiques usuels comme les  $\beta$ -lactamines et les fluoroquinolones. Cette protéine canalaire de la membrane externe possède un site spécifique de liaison aux carbapénèmes, et permet la pénétration sélective de l'imipénème. Des modifications de la quantité absolue ou de l'état fonctionnel de ces porines ont pour conséquence une diminution de la diffusion des antibiotiques empruntant cette voie de pénétration. Ce mécanisme par diminution de perméabilité peut entraîner une résistance croisée à plusieurs familles d'antibiotiques. Chez *P. aeruginosa*, la modification de la protéine de membrane externe OprD2 reste le mécanisme le plus fréquent de résistance à l'imipénème (Pagès, 2004; Barbier et Wolff, 2010).

**3.1.2. Résistance aux aminosides**

Le mécanisme de résistance le plus fréquent est à déterminisme enzymatique et de support plasmidique: aminosides acétyl transférase (AAC), aminosides nucléotidyl transférase (ANT). En fonction des enzymes en présence, de nombreux phénotypes de résistance sont individualisés (tableau 15). Considérant que, chez *P. aeruginosa* la pompe d'efflux MexXY est décrite comme la principale manifestation de la résistance aux aminosides, la modification



de la cible (ARNr 16S) a également représenté plusieurs cas de résistance aux aminosides (Fauchère, 1997).

**Tableau 15: Phénotypes de résistance de *P. aeruginosa* aux aminosides (Fauchère, 1997)**

Mécanismes de résistance	GM	TM	NET	AN
AAC(3)-I	R	S	S	S
AAC(3)-III	R	R	S	S
AAC(3)-IV.V	R	R	R	S
AAC(6')-I	S	R	R	R
AAC(6')-II	R	R	R	S
ANT(2'')	R	R	S	S
AAC(6')-I + ANT(2'') ou perméabilité	R	R	R	R

### 3.1.3. Résistance aux fluoroquinolones

Comme chez les entérobactéries, la résistance de *P. aeruginosa* aux quinolones est principalement due à des modifications de leur cible: l'ADN gyrase. Cette résistance est croisée entre toutes les quinolones. Elle est progressive par accumulation des effets de mutations chromosomiques successives. L'acide nalidixique est inactif sur *P. aeruginosa*. L'acquisition progressive de la résistance aux fluoroquinolones est très fréquente, en particulier pour la péfloxacin. Elle peut émerger au cours d'un traitement prolongé par une fluoroquinolone en monothérapie. La détection de cette résistance graduée doit évaluer le niveau de résistance atteint par la souche testée. Il est nécessaire de tester la péfloxacin ou la norfloxacin ou l'ofloxacin et la ciprofloxacin. Plusieurs niveaux de résistance aux quinolones peuvent être décrits (tableau 16) (Fauchère, 1997).

**Tableau 16: *P. aeruginosa* et fluoroquinolones (Fauchère, 1997)**

Marqueur	Phénotype Pef-S	Phénotype Pef-R	Phénotype Cip-R
Pefloxacin	S	R	R
Ciprofloxacin	S	S	R

### 3.2. *Acinetobacter baumannii*

#### 3.2.1. Résistance aux $\beta$ -lactamines

##### 3.2.1.1. Résistance naturelle

Les souches d'*A. baumannii* produisent une  $\beta$ -lactamase chromosomique de classe C, qui n'est pas inhibée par le clavulanate, qui hydrolyse préférentiellement les C1G mais n'a pas d'activité pour les pénicillines et la pipéracilline (Sougakoff et Trystram, 2003).

##### 3.2.1.2. Résistance acquise

###### a) Résistance enzymatique

###### ➤ Céphalosporinase de classe C

*A. baumannii* produit naturellement une céphalosporinase de type AmpC qui est normalement exprimée à bas niveau, et ne diminue pas l'efficacité des céphalosporines à large spectre (céfalocone) ou des carbapénèmes (Nordmann *et al.*, 2009).

###### ➤ Métallo- $\beta$ -lactamases de classe B

Les  $\beta$ -lactamases de classe B ont besoin d'un atome de zinc pour détruire les  $\beta$ -lactamines elles sont inhibées par l'EDTA. Plusieurs groupes ont été identifiés chez *A. baumannii*, cette classe d'enzyme hydrolyse toutes les  $\beta$ -lactamines à l'exception des monobactames (Clavilier *et al.*, 2001).

###### ➤ $\beta$ -lactamases à spectre élargi

Chez *A. baumannii*, les BLSE sont soit chromosomiques ou plasmidiques. Les enzymes du type GES et PER, VEB et IBC-2, ont été largement retrouvées chez *A. baumannii*, Les enzymes du type VEB hydrolysent de préférence la ceftazidime et l'aztréonam (Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006).

###### b) Résistance non enzymatique

###### ➤ Surexpression du système d'efflux

*A. baumannii* possède une pompe à efflux AdeABC elle est composée de protéines AdeA, AdeB et AdeC dont les substrats sont: les aminosides, les tétracyclines, l'érythromycine, le

chloramphénicol, le triméthoprim, les fluoroquinolones, les bêta-lactamines, et encore récemment, la tigécycline (Wieczorek *et al.*, 2008).

#### ➤ **Modification de l'expression des PLP**

Une modification des protéines liant les pénicillines (PLP) à l'origine de la résistance aux carbapénèmes chez *A. baumannii* n'a été que très rarement investiguée mais il semble que la régulation de l'expression des PLP puisse être associée à une diminution de sensibilité aux carbapénèmes (Fernandez-Cuenca *et al.*, 2003).

### **3.2.2. Résistance aux aminosides**

La résistance d'*A. baumannii* aux aminosides résulte principalement de l'inactivation de l'antibiotique par certaines enzymes de modification : APH (3')-I, APH (6), AAC (3)-I, ANT (2'')-I et APH (3')-IV. Comme décrit précédemment, *A.baumannii* possède une pompe à efflux qui confère la résistance à diverses classes d'antibiotiques y compris les aminosides (Bergogne-Bérézin et Dellamonica, 1999).

### **3.3. *Burkholderia cepacia***

*B. cepacia* est caractérisé par une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques dont les carboxypénicillines, les aminosides et la colistine. La pipéracilline, la ceftazidime, le méropénème, et la témocilline sont les molécules les plus actives (Segonds *et al.*, 2006). Plusieurs mécanismes de résistance sont décrits :

#### ➤ **Système d'efflux**

*B. cepacia* présente un haut niveau de résistance naturelle à de nombreux antibiotiques ( $\beta$ -lactamines, aminosides, fluoroquinolones). Ceci est partiellement dû à la présence de différentes pompes MDR (Multiple Drug Resistance) comme SmeABC, CeoAB-OpcM, AmrAB-OprA ou BpeAB-OprB (Cattoir, 2004).

#### ➤ **Imperméabilité**

Ce mécanisme assure une résistance naturelle aux antibiotiques polycationiques: aminoglycosides, polypeptides, dont le passage à travers la membrane externe nécessite la présence de récepteurs anioniques au niveau du LPS, récepteurs qui sont très peu nombreux chez *B. cepacia*, exemple l'imperméabilité à l'imipénème (Segonds et Chabanon, 2001).

➤  **$\beta$ -lactamases de classe A (PenA)**

La résistance de *B. cepacia* a été liée à une  $\beta$ -lactamase chromosomique inductible de classe A, qui possède un profil à spectre étroit (Nordmann *et al.*, 2009).

### 3.4. *Stenotrophomonas maltophilia*

#### 3.4.1. Résistance aux $\beta$ -lactamines

La résistance naturelle élevée vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines est liée à une faible perméabilité membranaire. *S. maltophilia* possède en outre des  $\beta$ -lactamases chromosomiques, voire plasmidiques (Eyquem *et al.*, 2000).

➤ **Production de  $\beta$ -lactamases**

*S. maltophilia* exprime une résistance naturelle à la plupart des  $\beta$ -lactamines, sauf le moxalactam, par production d'une métallo- $\beta$ -lactamase (L1) de classe B et d'une  $\beta$ -lactamase à sérine active (L2) de classe A hydrolysant les pénicillines et les céphalosporines, en particulier le céfotaxime. La  $\beta$ -lactamase L2 est inductible et inhibée par l'acide clavulanique, ce qui explique la sensibilité de *S. maltophilia* à l'association ticarcilline-acide clavulanique (Sougakoff et Trystram, 2003).

➤ **Système d'efflux**

Plusieurs systèmes d'efflux ont été identifiés chez *S. maltophilia*, y compris SmeABC et SmeDEF (Sougakoff et Trystram, 2003).

#### 3.4.2. Résistance aux aminosides

La résistance de *S. maltophilia* aux aminosides est traditionnellement attribuée soit à l'imperméabilité des bactéries, soit à l'export de l'antibiotique par les cellules, soit à la production d'une 6'-N-aminoside acétyltransférase. Le gène responsable, AAC (6')-Iz, a été localisé dans le chromosome (Courvalin, 1999).

#### 3.4.3. Résistance aux fluoroquinolones

Une résistance acquise aux fluoroquinolones liée à des modifications de la membrane externe est supportée par le chromosome. Un système d'efflux actif lié à une protéine de la membrane externe (OMP54) est responsable de la multirésistance (Prescott *et al.*, 2003).

## 4. *Aeromonas hydrophila*

### 4.1. Résistance naturelle

Les *Aeromonas* sont naturellement résistantes à l'ampicilline. *A. hydrophila* synthétise 3 types de  $\beta$ -lactamases: une céphalosporinase inductible, une oxacillinase et une carbapénémase. Cette espèce est naturellement résistante à l'amoxicilline, l'amoxicilline + acide clavulanique, la ticarcilline, la céfalotine (**Clave, 2010**).

### 4.2. Résistance acquise

La résistance acquise peut entraîner une résistance aux C3G (CTX, CAZ) par hyperproduction de céphalosporinase, voire de BLSE (**Clave, 2010**).

# **Partie II :**

# **Matériel et méthodes**

## **1. Cadre de l'étude**

Notre travail s'est étalé sur une période de quatre ans, allant d'Avril 2009 à mai 2012. Les prélèvements ont été réalisés à partir de divers sites de l'environnement hospitalier, dans différents services (laboratoire, salles de soins, unités des soins intensifs, réanimation, déchoquage, néonatalogie, bloc opératoire, dialyse, pneumo-phtisiologie, service des maladies infectieuses, médecine femme, médecine homme, médecine interne, chirurgie femme, neurologie, maternité, néonatalogie, pédiatrie, poste de transfusion sanguine) de six établissements publics hospitaliers (EPH), situés dans différentes communes de la Wilaya de Tébessa :

- **Khaldi Abdelaziz (Tébessa)** : EPH d'une capacité de 120 lits, qui a bénéficié d'un aménagement achevé en 2008, il est réservé exclusivement aux maladies maternelles et infantiles et à la pédiatrie.
- **Polyclinique Alia Saleh (Tébessa)**
- **Hôpital Bouguerra Boulaares (Bekkaria)** : spécialisé en phtisiologie et abritant, depuis 2004, presque tous les services, soit la pédiatrie, la médecine interne, la psychiatrie, etc., se dote d'un service de rééducation.
- **Polyclinique El-Hammamet**
- **EPH Ouenza**
- **EPH Bir El Ater**

Les dates et les lieux des prélèvements réalisés au cours de cette étude sont détaillés dans le tableau 38 (Annexes). Les différentes manipulations microbiologiques et moléculaires ont été respectivement réalisées dans le laboratoire de microbiologie et le laboratoire de biochimie à l'université de Tébessa.

## **2. Réalisation des prélèvements**

Les prélèvements ont été réalisés à partir d'environ 40 différents sites environnementaux : des surfaces sèches (tables de soins, tables d'accouchement, lits, oreillers, paillasses, murs, sols, corbeilles, draps, blouses,...), des surfaces humides (lavabos, siphons), des solutions antiseptiques ou désinfectants (alcool, eau oxygénée, alcaloïdine, bétadine, savon liquide), des

dispositifs médicaux (respirateurs artificiels, stéthoscopes, sondes urinaires, cathéters, tensiomètres, thermomètres), de l'eau et de l'air. Un total de 839 échantillons ont été prélevés, dont 65 sont des prélèvements d'air.

Les prélèvements ont été effectués le matin avant le nettoyage et/ ou la désinfection quotidienne. Nous avons utilisé la méthode d'écouvillonnage qui consiste à frotter sur la surface sèche à analyser, l'extrémité cotonnée de l'écouvillon préalablement humidifiée à l'aide d'eau physiologique ou d'eau distillée stérile, puis tromper et agiter dans un tube contenant 10 ml du bouillon nutritif. Si la surface à analyser est humide (solution, eau ou surface humide), il suffit de frotter directement sans l'utilisation de l'eau physiologique. Les échantillons ainsi prélevés ont été rapidement transportés au laboratoire de microbiologie, où ils sont incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures jusqu'à l'apparition de culture bactérienne qui se manifeste sous forme de trouble.

### **3. Isolement**

Après incubation, l'isolement a été fait à partir des tubes de bouillon nutritif présentant un trouble. Trois types de milieux de culture ont été utilisés : la gélose nutritive (GN), la gélose Mac Conkey (MC) et la gélose au cétrimide (GC).

L'ensemencement sur gélose a été fait comme suit :

- La première partie de la boîte a étéensemencée à l'aide de l'extrémité cotonnée de l'écouvillon imbibé dans le bouillon nutritif, en frottant à la surface de la gélose.
- La deuxième partie a étéensemencée par l'anse de platine ou une pipette Pasteur, à partir du premier ensemencement, en faisant des stries éloignées.

Les boîtes ont été ensuite incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures jusqu'à l'apparition des colonies.

### **4. Purification**

Cette étape est basée sur les caractères cultureux et la coloration de Gram. A partir des colonies isolées sur les différents milieux (GN, MC et GC), procéder directement à la coloration de Gram.



Ensuite, sélectionner les colonies présentant des bacilles à Gram négatif. La purification se fait en poursuivant le repiquage sur le même type de milieu jusqu'à l'obtention d'un isolat pure présentant les mêmes caractéristiques que celui obtenu en premier isolement. La dernière culture pure doit être faite sur gélose nutritive pour faire l'objet d'autres tests (tests préliminaires, identification biochimique, antibiogramme,...etc.).

## **5. Conservation des souches**

La conservation de courte durée des isolats purifiés a été réalisée par ensemencement sur gélose nutritive inclinée par l'anse de platine. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les tubes ont été conservés au réfrigérateur à 4°C.

La conservation de longue durée des souches a été réalisée par ensemencement dans le bouillon nutritif. Après incubation pendant 24 heures à 37°C, un volume de la suspension obtenue a été transféré dans des tubes Eppendorf, à l'aide d'une pipette Pasteur, avec 15 à 20 % du glycérol stérile. Chaque souche doit être conservée en plusieurs copies. Les tubes ont été stockés au congélateur à -20°C.

## **6. Identification biochimique**

### **6.1. Test d'oxydase**

#### **a) Principe**

L'oxydase est une enzyme qui catalyse une réaction d'oxydoréduction impliquant une molécule de dioxygène (O<sub>2</sub>) comme accepteur d'électrons (**Denis et al., 2007**). Sa présence ou son absence représente un des critères systématiques les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des BGN. Ce test permet de distinguer les *Aeromonas*, qui sont oxydase positive, des entérobactéries, qui sont oxydase négative. Les bactéries du genre *Acinetobacter* sont, en revanche, oxydase négative (**Corvaglia, 2006**).

### **b) Technique**

La mise en évidence de l'oxydase a été faite selon la méthode des disques d'oxydase qui consiste à :

- Déposer sur une lame un disque d'oxydase, et l'imbiber avec une goutte d'eau physiologique stérile.
- Prélever une colonie à l'aide d'une pipette Pasteur et l'étaler sur le disque (**Denis *et al.*, 2007**).

### **c) Lecture**

La présence d'une cytochrome-oxydase se traduit, en 20 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet très foncé (**Denis *et al.*, 2007**).

Les isolats oxydase négative ont été retenus en vue de l'identification biochimique par l'utilisation de la galerie API 20E. Alors que les isolats oxydase positive ont été identifiés par la galerie API 20NE.

## **6.2. Identification biochimique par la galerie API20E**

### **a) Principe et description de la galerie**

L'API 20 E est un système standardisé pour l'identification des entérobactéries et autres BGN non fastidieux, comportant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

La galerie est commercialisée dans des boîtes stériles, elle comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée, chaque microtube est partagé en deux parties : le tubule (en bas) et la cupule (en haut).

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 des réactifs.

La lecture de ces 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 (**BioMérieux SA**).

## **b) Technique**

### ➤ **Préparation de la galerie**

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillée stérile dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Sortir la galerie de son emballage.
- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation (**BioMérieux SA**).

### ➤ **Préparation de l'inoculum**

Préparer une suspension bactérienne dense dans 10 ml d'eau physiologique stérile à partir d'une culture pure et jeune de 18 à 24 h sur GN.

### ➤ **Ensemencement de la galerie API 20 E**

- Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles d'air :
- Pour les caractères soulignés ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE, ensemencer le tubule par la suspension et la cupule par l'huile de vaseline stérile.
- Pour les caractères encadrés VP, CIT, Gel, ensemencer le tubule et la cupule par la suspension.
- Pour les caractères non encadrés, non soulignés ensemencer uniquement le tubule par la suspension.
- Refermer la boîte d'incubation et la placer à 37°C pendant 18 à 24 heures (**BioMérieux SA**).

## **c) Lecture de la galerie**

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture (Tableau 39 en annexe).
- Si trois tests ou plus (test GLU + ou -) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

- **Test TDA** : ajouter une goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

- **Test IND** : ajouter une goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
- **Test VP** : ajouter une goutte de réactif VP1 et VP2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.

**Note** : le test de la recherche de production d'indole doit être réalisé en dernier, car cette réaction libère des gaz qui risquent d'altérer l'interprétation d'autres tests de la galerie. Ne pas remettre le couvercle d'incubation après l'ajout du réactif.

Si le nombre de tests positifs avant ajout des réactifs (y compris le test GLU) est inférieur à trois :

- Réincuber la galerie 24 heures (plus ou moins 2 heures) de plus sans rajouter les réactifs.
- Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs (**BioMérieux SA**).

#### **d) Interprétation**

L'identification a été réalisée à l'aide d'un logiciel d'identification (feuille Excel pour l'identification microbienne).

### **6.3. Identification biochimique par la galerie API20NE**

#### **a) Principe et description de la galerie**

L'API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (ex : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium...*), combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation et une base de données.

La galerie API 20 NE comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

La lecture de ces 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 (**BioMérieux SA**).

### **b) Mode opératoire**

La préparation de la galerie et de l'inoculum ont été effectués comme précédemment décrits pour l'API20E.

#### **➤ Inoculation de la galerie**

- Remplir les tubules (et non les cupules) des tests NO<sub>3</sub> à PNPG avec la suspension bactérienne en utilisant une pipette Pasteur. Pour éviter la formation des bulles des fonds des tubules, poser la pointe de la pipette sur la côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.
- Ouvrir une ampoule d'API AUX Medium et y transférer environ 200µl de la suspension précédente.
- Homogénéiser avec la pipette en évitant la formation de bulles.
- Remplir les tubules et les cupules des tests GLU à PAC en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave. Des cupules incomplètement remplies ou trop remplies peuvent entraîner des résultats incorrects.
- Remplir avec l'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) pour former un ménisque convexe.
- Refermer la boîte d'incubation et incubé à 37°C pendant 24 heures (**BioMérieux SA**).

### **c) Lecture**

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture (Tableau 40 en annexe).
- Noter sur la fiche des résultats toutes les réactions spontanées (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG).
- La révélation des deux tests NO<sub>3</sub> et TRP doit se faire en mettant les tests d'assimilation à l'abri d'une contamination par l'air ; pour cela placer le couvercle de la boîte d'incubation au-dessus de ces tests, pendant la période de révélation des tests NO<sub>3</sub> et TRP.

➤ **Test NO<sub>3</sub>**

- Ajouter une goutte de réactifs NIT 1 et NIT 2 dans la cupule NO<sub>3</sub>.
- Après 5 minutes, une couleur rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
- Une réaction négative peut être due à la production d'azote ; ajouter 2-3 mg de poudre de zinc dans la cupule NO<sub>3</sub>.
- Après 5 minutes, une cupule restée incolore indique une réaction positive à noter sur la fiche des résultats. Si la cupule devient rose-rouge, la réaction est négative, car les nitrates encore présentes dans le tube ont été réduits en nitrites par le zinc.

➤ **Test TRP**

Ajouter 1 goutte de réactif de James. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive.

➤ **Tests d'assimilation**

Observer la pousse bactérienne. Une cupule trouble indique une réaction positive. Des pousses d'intensité intermédiaire peuvent être observées et notées +/- (**BioMérieux SA**).

**d) Interprétation**

L'identification a été réalisée à l'aide du logiciel d'identification.

**6.4. Recherche des pigments spécifiques de *Pseudomonas***

Cette recherche a été réalisée sur les milieux King A et King B qui permettent de différencier les espèces du genre *Pseudomonas*, par la mise en évidence de la production de pigments spécifiques (**Guillaume, 2004**).

**a) 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 *P.aeruginosa*, est favorisée par la présence d'ions inorganiques et de certains acides aminés qui composent le milieu King A.
- La production de **pyoverdine**, caractéristique du groupe fluorescent, dépendant de la nature des peptones, est favorisée par la teneur élevée en phosphate présent dans le milieu King B (**Ould Brahim Elkory, 1998; Guillaume, 2004**).

#### **b) Technique**

- Ensemencer les deux milieux : King A et King B en faisant une strie médiane ou des stries serrées à la surface de la gélose.
- Fermer les tubes sans serer et incuber à 30°C pendant 1 à 4 jours (**Delarras, 1998**).

#### **c) Lecture**

La présence de pigments diffusibles se traduit par l'apparition d'une couleur qui peut diffuser sur toute la pente (**Guillaume, 2004**).

- **Sur le milieu King A**

Les colonies typiques sur ce milieu sont colorées en bleu vert (pyocyanine), parfois en brun rose (pyorubine). La pyocyanine est extraite par le chloroforme. Verser 0,5 ml de chloroforme à l'aide d'une pipette Pasteur sur la culture, laisser les 10-15 minutes, en position inclinée. La pyocyanine très soluble dans le chloroforme, le colore en bleu (**Ould Brahim Elkory, 1998**).

- **Sur le milieu King B**

La production de pyoverdine se manifeste par une coloration jaune-verte, avec une fluorescence observée à la table UV. Ce pigment est insoluble dans le chloroforme (**Guillaume, 2004**).

## **7. Etude de la sensibilité aux antibiotiques**

L'antibiogramme permet de déterminer la sensibilité d'une bactérie vis-à-vis des ATB. Il a été réalisé selon la méthode diffusion en milieu gélosé, méthode des disques (Antibiogramme

standard). La méthode utilisée est celle de *Kirby-Bauer* préconisée par le *NCCLS* (*National committee Clinical Laboratory Standard*).

### a) Principe

La méthode des disques consiste à déposer à la surface de la gélose Mueller-Hinton préalablement ensemencée avec une suspension bactérienne, des disques pré imprégnés d'une dose connue des différents antibiotiques. Chaque antibiotique diffuse au sein de la gélose à partir du disque et y détermine des concentrations inversement proportionnelles à la distance du disque. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, chaque disque est entouré d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne. La multiplication des bactéries s'arrête là où existe dans la gélose, une concentration d'antibiotique égale à la concentration minimale inhibitrice (CMI). Les caractères de sensibilité ou de résistance de la souche en seront déduits (**Delarras, 1998**).

### b) Choix des antibiotiques

Le choix des antibiotiques utilisés dans cette étude a été fait selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (**CA-SFM, 2008**). Les listes des antibiotiques testés sur les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa*, les BGNnF et *Aeromonas* (et autres BGN) sont respectivement présentées dans les tableaux 17, 18, 19 et 20.



**Tableau 17 : Liste des antibiotiques testés sur les entérobactéries**

Famille	Antibiotique	Sigle	Charge Du disque	Diamètres critiques	
				R (d)	I S (D)
<b>β-Lactamines</b>	Aminopénicilline	Amoxicilline	AMX	25 µg	< 14 ≥21
	Carboxypénicilline	Ticarcilline	TIC	75 µg	<18 ≥22
	Carbapénème	Imipénème	IPM	10 µg	<17 ≥24
	Clavams	Amoxicilline+Acide clavulanique	AMC	20+10 µg	<14 ≥21
	Monobactame	Aztréonam	ATM/AO	30 µg	<21 ≥27
	C1G	Céfalotine	KF	30 µg	<12 ≥18
	C2G	Céfoxitine	FOX	30 µg	<15 ≥22
	C3G	Céfotaxime	CTX/CE	30 µg	<23 ≥26
	C3G	Ceftazidime	CAZ	30 µg	<19 ≥26
<b>Aminosides</b>	Amikacine	AK	30 µg	<15 ≥17	
	Gentamicine	GN	15µg/10UI	<16 ≥18	
	Tobramycine	TOB	10 µg	<16 ≥18	
<b>Quinolones</b>	<b>Quinolones 1<sup>ère</sup>G</b>	Acide nalidixique	NA	30 µg	<15 ≥20
	<b>Quinolones 2<sup>ème</sup>G</b>	Ofloxacine	OFX	5 µg	<22 ≥25
		Ciprofloxacine	CIP	5 µg	<22 ≥25
<b>Fosfomycines</b>	Fosfomycine	FOS	50 µg	<14 ≥14	
<b>Furanes</b>	Nitrofuranes	F	300 µg	<14 ≥17	
<b>Phénicolés</b>	Chloramphénicol	C	30 µg	<19 ≥23	
<b>Triméthoprime-sulfamides</b>	Co-trimoxazole	COT	25 µg	<10 ≥16	
<b>Tétracyclines</b>	Tétracycline	TE	30 UI	<17 ≥19	

**C1G** : céphalosporines première génération.

**C2G** : céphalosporines deuxième génération.

**C3G** : céphalosporines troisième génération.

Tableau 18 : Liste des antibiotiques testés sur *Pseudomonas aeruginosa*

Famille	Antibiotique	Sigle	Charge	Diamètres critiques		
				R (d)	I	S (D)
<b>β-Lactamines</b>	<b>Carboxypénicilline</b>	Ticarcilline	TIC	75 µg	<18	≥22
	<b>Carbapénème</b>	Imipénème	IPM	10 µg	<17	≥22
	<b>C3G</b>	Ceftazidime	CAZ	30 µg	<19	≥19
		Céfpime	CPO	30 µg	<19	≥19
		Cefsulodine	CSD	30 µg	<14	≥22
		Céfépime	FEP	30 µg	<19	≥19
	<b>Monobactames</b>	Aztréonam	ATM	30 µg	<19	≥27
<b>Pénames</b>	Pipéracilline	PIP	30 µg	<12	≥18	
<b>Aminosides</b>	Amikacine	AK	30 µg	<15	≥17	
	Gentamicine	GN	15µg/ 10UI	<16	≥16	
	Tobramycine	TOB	10 µg	<16	≥16	
<b>Fluoroquinolones</b>	Ciprofloxacine	CIP	5 µg	<19	≥22	
<b>Fosfomycines</b>	Fosfomycine	FOS	50 µg (10 UI)	<14	≥14	

Tableau 19 : Liste des antibiotiques testés sur *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Burkholderia cepacia*

Famille	Antibiotique	Sigle	Charge	Diamètres critiques		
				R (d)	I	S (D)
<b>β-Lactamines</b>	<b>Carboxypénicilline</b>	Ticarcilline	TIC	75 µg	<18	≥22
	<b>Carbapénème</b>	Imipénème	IPM	10 µg	<17	≥24
	<b>C3G</b>	Ceftazidime	CAZ	30 µg	<19	≥21
	<b>Pénames</b>	Pipéracilline	PIP	30 µg	<18	≥22
<b>Aminosides</b>	Amikacine	AK	30 µg	<15	≥17	
	Gentamicine	GN	10UI/15µg	<16	≥16	
	Tobramycine	TOB	10 µg	<16	≥16	
<b>Fluoroquinolones</b>	Ofloxacine	OFX	5 µg	<16	≥22	
	Ciprofloxacine	CIP	5 µg	<19	≥22	
<b>Phénicolés</b>	Chloramphénicol	C	30 µg	<19	≥23	
<b>Triméthoprime-sulfamides</b>	Co-trimoxazole	COT	25 µg	<10	≥16	
<b>Tétracyclines</b>	Tétracyclines	TE	30 UI	<17	≥19	

Tableau 20 : Liste des antibiotiques testés sur *Aeromonas* et autres BGN

Famille	Antibiotique	Sigle	Charge Du disque	Diamètres critiques	
				R (d)	I S (D)
<b>β-Lactamines</b>	Aminopénicilline	Amoxicilline	AMX	25 µg	< 14 ≥21
	Carboxypénicilline	Ticarcilline	TIC	75 µg	<18 ≥22
	Carbapénème	Imipénème	IPM	10 µg	<17 ≥24
	Clavams	Amoxicilline+Acide clavulanique	AMC	20+10 µg	<14 ≥21
	Monobactame	Aztréonam	AO	30 µg	<21 ≥23
	C1G	Céfalotine	KF	30 µg	<12 ≥18
	C2G	Céfoxitine	FOX	30 µg	<15 ≥22
	C3G	Céfotaxime	CTX/CE	30 µg	<23 ≥26
	C3G	Ceftazidime	CAZ	30 µg	<19 ≥21
<b>Aminosides</b>	Amikacine	AK	30 µg	<15 ≥17	
	Gentamicine	GN	15µg/10UI	<16 ≥18	
	Tobramycine	TOB	10 µg	<16 ≥18	
<b>Quinolones</b>	<b>Quinolones 1<sup>ère</sup>G</b>	Acide nalidixique	NA	30 µg	<15 ≥20
	<b>Quinolones 2<sup>ème</sup>G</b>	Ofloxacin	OFX	5 µg	<22 ≥25
		Ciprofloxacine	CIP	5 µg	<22 ≥25
<b>Fosfomycines</b>	Fosfomycine	FOS	50 µg	<14 ≥14	
<b>Furanes</b>	Nitrofuranes	F	300 µg	<14 ≥17	
<b>Phénicolés</b>	Chloramphénicol	C	30 µg	<19 ≥23	
<b>Triméthoprime-sulfamides</b>	Co-trimoxazole	COT	25 µg	<10 ≥16	
<b>Tétracyclines</b>	Tétracyclines	TE	30 UI	<17 ≥19	

### c) Technique

#### ➤ Préparation de l'inoculum

- Préparer une suspension bactérienne (à partir d'une culture jeune de 18 heures), prélever au moins 03 colonies et émulsionner dans 05 ml d'eau physiologique stérile.

- Bien homogénéiser la suspension bactérienne. Son opacité doit être équivalente à une DO de 0,08 à 0,1 lue à 625 nm soit 0,5 la valeur de Mac Farland. Cela correspond à une culture pure à peine confluyente de  $10^6$  à  $10^8$  UFC/ml (**CA-SFM, 1998**).

➤ **Ensemencement**

L'ensemencement se fait par la méthode d'écouvillonnage de Kirby-Bauer :

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne et laisser s'imbiber.
- Le sortir du tube en l'essorant doucement sur la paroi.
- Ensemencer la boîte de Mueller-Hinton dont l'épaisseur de la gélose est de 4mm, en frottant l'écouvillon sur sa surface et en tournant la boîte 3 fois de 60°C afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum.
- Laisser sécher les boîtes pendant 15 à 20 minutes (**CA-SFM, 1998**).

➤ **Application des disques et incubation**

Appliquer les disques à l'aide d'une pince préalablement flambée, en appuyant légèrement. Les disques doivent être parfaitement appliqués à plat sans glissement. Une distance minimale de 15 mm doit séparer un disque périphérique du bord de la boîte, et chaque disque doit être éloigné au minimum de 30 mm des autres. Incuber les boîtes à 37°C pendant 24 heures, couvercle en bas (**CA-SFM, 1998**).

**d) Lecture et interprétation**

Pour chaque antibiotique: mesurer le diamètre de la zone d'inhibition au revers de la gélose. L'interprétation des souches (sensibles, intermédiaires ou résistantes) se fait selon les diamètres critiques recommandés par **CA-SFM (2008)**. Chaque disque a une concentration minimale inhibitrice, caractérisée par un diamètre d'inhibition, la comparaison des diamètres mesurés autour des disques déposés et ceux recommandés permettra de détecter le phénotype sensible, intermédiaire, et résistant :

- Si le diamètre de la zone d'inhibition est  $\geq D$  : la souche est dite sensible (S).
- Si le diamètre de la zone d'inhibition est  $< d$  : la souche est dite résistante (R).
- Si  $d \leq$  diamètre de la zone d'inhibition  $< D$  : la souche est dite intermédiaire (I) (**CA-SFM, 1998**).

## **8. Recherche phénotypique des BLSE**

Les tests de recherche de BLSE que nous avons utilisé sont : le test de synergie, le test du rapprochement des disques et le test du double disque.

### **8.1. Test de synergie**

#### **a) Principe**

Les BLSE dérivées des enzymes de classe A (Ambler) sont inhibées par les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (acide clavulanique, sulbactam et tazobactam). Le test consiste donc à rechercher une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de bêta-lactamase : amoxicilline + acide clavulanique (AMC) et un disque de C3G ou un monobactam (aztréonam) (**Rahal, 2005**).

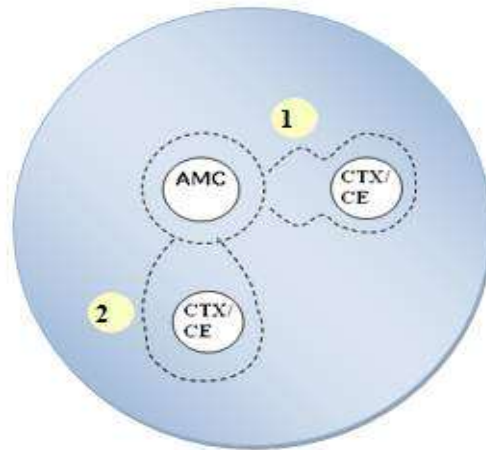
#### **b) Technique**

La recherche de BLSE se fait dans les conditions standard de l'antibiogramme en déposant un disque d'amoxicilline + acide clavulanique (AMC 20/10  $\mu$ g) à 30mm (centre à centre) d'un disque de C3G : céfotaxime (CTX 30  $\mu$ g), ceftazidime (CAZ 30  $\mu$ g), et aztréonam (ATM 30  $\mu$ g). Incuber 18 heures à 37°C (**Rahal, 2005**).

#### **c) Lecture et interprétation**

La production des BLSE peut se traduire par l'apparition d'une image de synergie dite en « Bouchon de champagne » entre le disque AMC et CTX/ CAZ/ ATM (Figure 04).

En l'absence d'une image de synergie, la production de BLSE sera suspectée devant toute diminution du diamètre autour des disques C3G ou de monobactam. On recherchera donc une BLSE devant un diamètre inférieur aux valeurs suivantes : CTX = 27 mm, CAZ = 22 mm et ATM = 27 mm. Dans ce cas, il faut pratiquer un test de confirmation de production de BLSE (**Rahal, 2005**).



1 : synergie en bouchon de champagne    2 : synergie en entonnoir

**Figure 04 : Description de l'image de synergie**

## 8.2. Test du rapprochement des disques

### a) Principe

Lorsqu'un second mécanisme de résistance est susceptible de masquer la présence de l'image de synergie, il est possible de retrouver cette image en rapprochant du disque contenant l'acide clavulanique et les disques de C3G ou l'aztréonam (15 ou 20 mm centre à centre) (**Rahal, 1999**).

### b) Technique

- Procéder de la même manière que le test de synergie dans la préparation de l'inoculum et l'ensemencement.
- Placer les disques de C3G (céfotaxime CE dans notre travail) à différentes distances (15, 20, 25 et 30 mm) du disque AMC sur les boîtes de Pétri selon la figure 05.
- Incuber pendant 24 heures à 37°C.

### c) Lecture

La restauration de l'activité de C3G utilisée est traduite par l'apparition de l'image de synergie entre C3G et AMC.

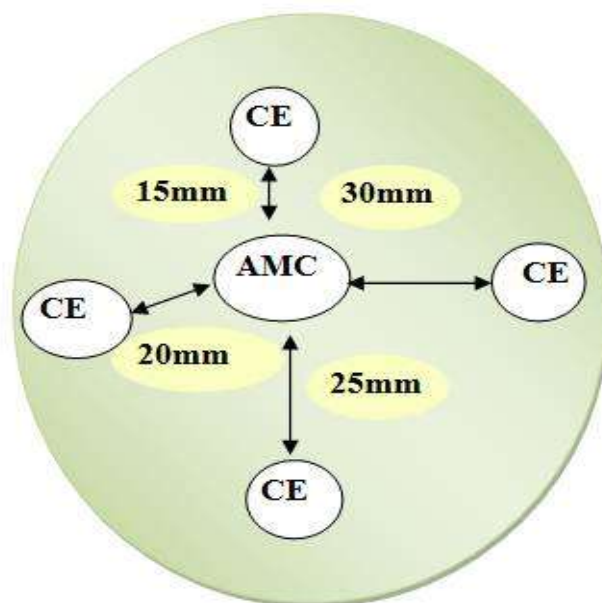


Figure 05 : Schéma explicatif du test de rapprochement des disques

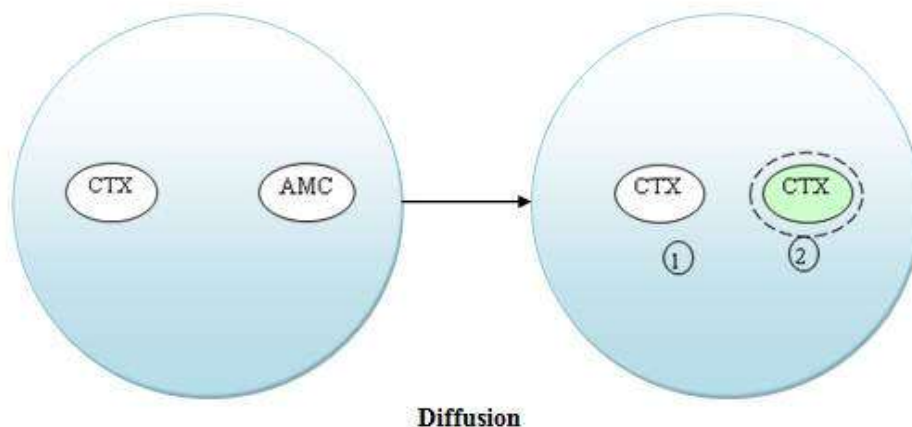
### 8.3. Test du double disque

#### a) Principe

Le test du double disque ou le test espagnol consiste à rechercher une augmentation de la zone d'inhibition d'un disque de C3G, précédé par l'application d'un disque contenant l'AMC, comparé à un autre disque portant la même céphalosporine et placé côte à côte sur la gélose Muller-Hinton (Matthew et Muller, 2004).

#### b) Technique

- Procéder de la même manière que le test de synergie dans la préparation de l'inoculum et l'ensemencement.
- Déposer un disque d'AMC et un disque de C3G (CTX 30 $\mu$ g dans notre travail) à une distance de 25mm (centre à centre).
- Laisser diffuser les antibiotiques à la température ambiante du laboratoire pendant une heure de temps.
- Après une heure d'incubation sur la paillasse, ôter le disque d'AMC et le remplacer par un disque de C3G (Figure 06).
- Incuber pendant 18 heures à 37°C (Rahal, 2005).



**Figure 06 : Schéma explicatif du test du double disque**

### c) Lecture

Le test du double disque est positif quand le diamètre d'inhibition du disque de C3G appliqué après pré diffusion du disque de l'AMC est supérieur ou égal à 5mm par rapport au diamètre du disque de C3G (Rahal, 2005).

## 9. Détermination des concentrations minimales inhibitrices

Dans notre travail, seulement les CMI des souches de phénotype BLSE ayant fait l'objet de l'expérience de conjugaison et de leurs transconjugants, ont été déterminées. Les antibiotiques à tester ont été : AMX, AMC, CTX, CAZ, IPM, GM et CIP.

### a) Définition

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures la multiplication des bactéries. Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories : sensible (S), résistante (R) ou intermédiaire (I).



## **b) Technique de dilution en milieu liquide**

La détermination des CMI a été réalisée par la technique de dilution en milieu liquide selon le protocole décrit par le Réseau Algérien de la Surveillance de la Résistance des Bactéries aux antibiotiques (Rahal, 2011).

### ➤ **Gamme des dilutions d'antibiotique**

- Dissoudre 10,24 mg de poudre titrée d'antibiotique dans le volume adéquat du solvant correspondant, pour obtenir une solution mère à 1024 µg/ml.
- Répartir dans des tubes stériles le bouillon Mueller-Hinton liquide ajusté en cations (MHLAC), à raison de 0,25 ml par tube.
- Réaliser à partir de la solution mère, les dilutions semi-logarithmiques de raison 2 ; on obtient des concentrations intermédiaires allant de 512 µg/ml à 0,063 µg/ml (Tableau 21).

### ➤ **Préparation de l'inoculum bactérien**

- Préparer à partir d'une culture pure de 48 heures, une suspension de la souche à étudier, dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile ou dans le bouillon MHLAC, d'une densité équivalente à 0,5 MF ( $10^8$  CFU/ml).
- Diluer la suspension d'opacité 0,5 MF au 1/10ème pour distribuer un inoculum de  $5.10^5$  UFC/ml de germe dans chaque tube.
- Vérifier par ailleurs, la pureté de chaque souche en effectuant l'isolement sur gélose non sélective.

### ➤ **Distribution de l'inoculum bactérien**

- Elle doit se faire dans les 15 min suivant la préparation de l'inoculum
- Inoculer les tubes d'antibiotiques avec 50 µl de suspension bactérienne par tube.
- Pour chaque série, réaliser un témoin sans antibiotique.

### ➤ **Distribution du milieu MHLAC et incubation**

- Répartir dans les tubes 0,70ml de MHLAC; la concentration d'antibiotique obtenue va ainsi de 128 µg/ml à 0,016 µg/ml.

- Incuber à 37°C pendant 16 à 20 heures.

**c) Lecture**

- La CMI de chaque antibiotique correspond au premier tube clair (pas de culture par rapport au témoin sans antibiotique).
- Comparer la CMI lue, aux CMI critiques correspondantes à chaque antibiotique testé (**Rahal, 2011**).
- Classer les bactéries dans la catégorie R, I ou S selon le résultat.

**Tableau 21: Schéma du mode opératoire pour la détermination des CMI par la technique de dilution en milieu liquide**

N°de tube	Volume de la solution d'antibiotique à rajouter	Concentration intermédiaire (µg /ml)	Volume MH	Inoculum	Concentration finale/ tube (µg /ml) *
1	0,25ml de la solution à 1024µg/ml	512	0,70 ml	50 µl/tube	128µg/ml
2	0,25ml de la solution à 512µg/ml	256	0,70 ml	50 µl/tube	64µg/ml
3	0,25ml de la solution à 256µg/ml	128	0,70 ml	50 µl/tube	32µg/ml
4	0,25ml de la solution à 128µg/ml	64	0,70 ml	50 µl/tube	16µg/ml
5	0,25ml de la solution à 64µg/ml	32	0,70 ml	50 µl/tube	8µg/ml
6	0,25ml de la solution à 32µg/ml	16	0,70 ml	50 µl/tube	4µg/ml
7	0,25ml de la solution à 16µg/ml	8	0,70 ml	50 µl/tube	2µg/ml
8	0,25ml de la solution à 8µg/ml	4	0,70 ml	50 µl/tube	1µg/ml
9	0,25ml de la solution à 4µg/ml	2	0,70 ml	50 µl/tube	0,5µg/ml
10	0,25ml de la solution à 2µg/ml	1	0,70 ml	50 µl/tube	0,25µg/ml
11	0,25ml de la solution à 1µg/ml	0,5	0,70 ml	50 µl/tube	0,125µg/ml
12	0,25ml de la solution à 0,5µg/ml	0,25	0,70 ml	50 µl/tube	0,063 µg/ml
13	0,25ml de la solution à 0,25µg/ml	0,125	0,70 ml	50 µl/tube	0,032 µg/ml
14	0,25ml de la solution à 0,125µg/ml	0,063	0,70 ml	50 µl/tube	0,016 µg/ml
<b>T</b>			0,70 ml	50 µl/tube	

\* volume final: 1ml/tube

**T** : témoin positif

## **10. Extraction de l'ADN plasmidique**

Des souches multi résistantes y compris des entérobactéries productrices de BLSE sont sélectionnées pour être soumises à une extraction de l'ADN plasmidique, de même pour les souches transconjugantes.

### **10.1. Extraction par la lyse alcaline**

#### **a) Principe**

L'ADN plasmidique des souches a été extrait par la méthode de la lyse alcaline suivant le protocole décrit par **Birnboim (1983)**. Cette technique d'extraction rapide d'ADN plasmidique comprend une étape de lyse alcaline en présence de détergent (SDS : Sodium Dodécyl Sulfate), au cours de laquelle les deux types d'acides nucléiques (ADN chromosomique et ADN plasmidique) sont dénaturés. Le pH est ensuite neutralisé rapidement, ce qui aboutit à une forme soluble pour les plasmides et à un agrégat insoluble pour l'ADN chromosomique, ce dernier incluant également les protéines dénaturées et le SDS précipité. Après centrifugation, l'ADN plasmidique contenu dans le surnageant est précipité par l'éthanol et le culot après centrifugation repris par du TE (Tris EDTA) ou de l'eau stérile (**Ameziane et al., 2006**).

#### **b) Technique**

Les solutions utilisées sont stérilisées par autoclavage à 120 °C pendant 20 min à l'exception de la solution S2. La composition des solutions utilisées est donnée dans le tableau 41 (Annexes).

L'extraction a été faite selon les étapes suivantes :

- A partir des cultures pures, ensemercer 10 ml de bouillon nutritif et incuber une nuit à 37°C;
- Transférer 1,5 ml de la culture bactérienne dans un tube Eppendorf et centrifuger à 12000 rpm pd 5min;
- Jeter le surnageant et ajouter 1,5 ml de la culture bactérienne dans le même tube Eppendorf et centrifuger à 12000 rpm pd 5 min;
- Jeter le surnageant et resuspendre le culot dans 100µl de la solution S1 par pipetage; cette étape a pour but de fragiliser la membrane de la bactérie;
- Ajouter 200 µl de la solution S2 en tournant le contenu 5 à 6 fois; c'est l'étape de la lyse cellulaire, laisser dans la glace pendant 10 minutes;

- Ajouter 150 µl de la solution S3 (solution neutralisant) en tournant le contenu 5 à 6 fois, pour précipiter l'ADN génomique et les protéines;
- Centrifuger 12000 rpm pd 5min;
- Récupérer le surnageant dans un nouveau tube Eppendorf et jeter le culot (faites attention à ne pas prélever du culot afin d'éviter les contaminations par l'ADN génomique ou les protéines);
- Ajouter 900 µl de l'éthanol absolu et centrifuger 12000 rpm pd 5 min pour précipiter l'ADN plasmidique;
- Jeter le surnageant;
- Faire un lavage du culot à l'éthanol 70%: 1 ml;
- Centrifuger 12000 rpm pd 5 min;
- Jeter le surnageant;
- Sécher le culot, en retournant les tubes à température ambiante (à l'air libre) pendant 5 à 10 minutes;
- Ajouter au culot (l'ADN plasmidique) 40 µl d'eau distillée stérile;
- Homogénéiser par pipetage puis répartir en aliquotes (10 µl/ tube);
- Conserver l'ADN: pour un stockage à court terme, l'ADN est gardé à +4°C; pour un stockage à long terme, l'ADN est dilué dans le Tris EDTA (TE) et placé à -20°C (**Boukerzaza, 2006**).

### **10.2. Qualité et quantification de l'extrait**

La quantité d'ADN simple et double brin a été calculée par spectrophotométrie en mesurant à 260nm (longueur d'onde d'absorption des acides nucléiques) et 280nm (longueur d'onde d'absorption des protéines) la densité optique (DO) d'une dilution au 1/50<sup>e</sup> et 1/100<sup>e</sup> de la solution à doser. Le calcul suivant a permis d'en déduire la concentration :

$$\text{Concentration } (\mu\text{g/ml}) = 50 \times (\text{facteur de dilution}) \times \text{DO}_{260\text{nm}}$$

La mesure de la DO à 280nm permet de s'assurer de l'absence de contamination significative par les protéines. Le rapport  $\text{DO}_{260\text{nm}} / \text{DO}_{280\text{nm}}$  doit être compris entre 1,7 et 2. S'il est inférieur à 1,7, il existe une contamination qui impose de pratiquer une seconde extraction. Un rapport supérieur à 2 témoigne de la présence d'une quantité importante d'ARN (**Ameziane et al., 2006**).

## 11. Electrophorèse en gel d'agarose

Pour déterminer la taille des plasmides de résistance et s'assurer de la qualité de l'amplification par PCR, des électrophorèses ont été réalisées sur gel d'agarose de 0,7 à 1% en fonction de la taille des fragments d'ADN.

### a) Principe

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une technique de base en biologie moléculaire qui permet de séparer des molécules selon leurs poids moléculaires et leurs conformations. La technique consiste à faire migrer des échantillons d'ADN dans un gel composé d'agarose et de tampon. L'agarose polymérisé agit alors comme filtre moléculaire stable qui confère une vitesse de migration différente aux molécules selon leur taille (figure 07), puisqu'elles ne peuvent pas toutes passer avec la même facilité entre les pores. Cela permet donc de séparer les molécules d'ADN de poids moléculaires différents. Plus la concentration en agarose sera élevée, plus la résolution sera accrue pour les fragments de petite taille (**Cholley, 2010**).

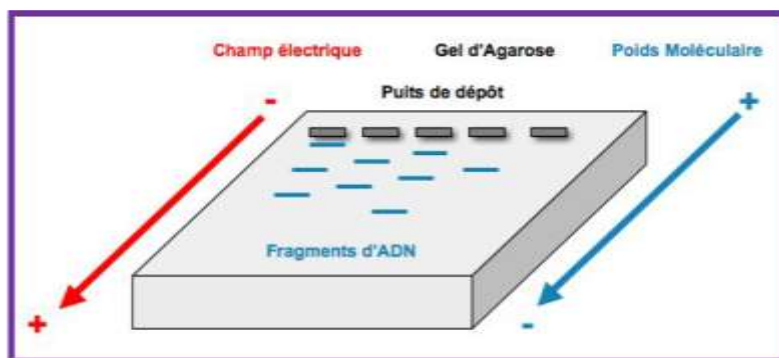


Figure 07 : Principe de l'électrophorèse sur gel d'agarose

### b) Technique

#### ➤ Préparation du gel d'agarose (0.7, 0.8, 1%)

- Peser l'agarose (1.4 g, 1.6 g, 2 g) dans un Erlenmeyer de 500 ml, ajouter 200 ml de tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE 1X : voir annexes) ;
- Faire fondre le mélange sur un agitateur-plaque chauffante. Le mélange doit être parfaitement transparent, sans particules d'agarose;
- Transférer l'agarose ainsi fondue dans un flacon de 250 ml;

- Laisser refroidir jusqu'à ce qu'il devienne possible de saisir le flacon à main nue;
- Ajouter 10  $\mu$ l de bromure d'éthidium (BET 10 mg / ml), homogénéiser;
- Couler lentement (sans faire de bulles) le gel dans le moule, sur 3 à 5 mm d'épaisseur en veillant à ce qu'il entoure bien les dents du peigne;
- Laisser refroidir, 10 minutes à température ambiante puis 15 minutes au réfrigérateur;
- Enlever le peigne et les joints. Le gel est prêt pour le dépôt des échantillons.

➤ **Préparation des échantillons à analyser**

- Placer le support avec le gel dans la cuve d'électrophorèse en positionnant les puits du côté de la cathode (-);
- Déposer 5  $\mu$ l du marqueur de taille : Biomatik 1Kb Ladder dans le premier puits;
- Densifier les échantillons d'ADN (10 $\mu$ l) en ajoutant 2  $\mu$ l de la solution de dépôt (Biomatik Loading dyes) qui contient trois marqueurs de migration différents;
- Remplir les puits, en changeant l'embout à chaque échantillon;
- Remplir la cuve de tampon TAE 1X de façon à ce que le gel soit immergé sous environ 1mm du tampon;
- Fermer le couvercle de la cuve à électrophorèse, brancher les fils et mettre sous tension;
- Laisser migrer pendant 2 h à 3h 30, à 150 V pour les plasmides et à 70 V pour les produits PCR.

➤ **Visualisation**

Lorsque la migration est suffisante, arrêter le générateur, ôter le gel de la cuve et le poser dans le système d'imagerie (imageur Gel Doc) pour visualiser les bandes. Une photo du gel peut alors être prise.

Les fragments d'ADN sont visualisés grâce au BET qui s'intercale entre les bases de la molécule d'ADN. Les tailles des plasmides et des produits PCR ont été déterminés par l'imageur.

## **12. Caractérisation des souches productrices de BLSE**

### **12.1. Transfert des gènes de résistance par conjugaison**

Le mode de transfert génétique par conjugaison consiste en un transfert du matériel génétique (plasmide) par l'intermédiaire d'un pont cytoplasmique entre une bactérie donatrice et une bactérie réceptrice. Ce transfert nécessite un contact physique préalable entre bactérie de signes différents (bactérie réceptrice et bactérie donatrice).

Les souches environnementales productrices de BLSE ont été utilisées comme souches donatrices et la souche *E. coli* HK225 (Rif<sup>R</sup> : résistante à la rifampicine) a été utilisée comme souche réceptrice.

Les expériences de conjugaison ont été réalisées dans le but de montrer la nature plasmidique des supports des BLSE.

Le transfert des gènes de résistance par conjugaison a été réalisé par la méthode en milieu liquide selon **Philippon *et al.*, (1983)**, utilisant comme milieu de culture le bouillon Luria - Bertani (LB). A partir de la gélose Mac Conkey (MC), des colonies pures de 18 à 24 heures des souches donatrices et de la souche réceptrice ont été prélevées etensemencées sur le bouillon cœur cerveau fraîchement préparé. 7 ml de LB ont étéensemencés pour la souche donatrice et 20 ml pour la souche réceptrice. Les bouillons ainsiensemencés ont été incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures. L'incubation de la souche réceptrice a été faite sous agitation.

Dans un erlenmeyer de 50 ml stérile, les cultures en phase exponentielle des souches donatrices (1 ml) et de la souche réceptrice (4,5 ml) ont été mélangées et le mélange a été homogénéisé au vortex. Après avoir ajouté 4,5 ml de LB stérile, les cultures ont été incubées à 37°C pendant 4 heures. Une série de dilutions ( $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ ) avec l'eau physiologique stérile, a été préparée puis un volume de 0,1 ml des dilutions  $10^{-1}$  à  $10^{-4}$  a étéensemencé sur gélose MC contenant l'ampicilline (50µg/ml) et la rifampicine (200µg/ml) pour sélectionner les transconjugants. Les souches donatrices et la souche réceptrice ont étéensemencées sur MC avec antibiotiques pour le contrôle. Tous les milieuxensemencés ont été incubés à 37° C pendant 18 à 24 heures. Après incubation, les souches tranconjugantes obtenues ont été identifiées et soumises à

l'antibiogramme et aux différents tests de détection des BLSE. Ainsi, les plasmides de ces souches ont été caractérisés par électrophorèse sur gel d'agarose (**Gangoué-Piéboji, 2007**).

## **12.2. Amplification des gènes de résistance par PCR**

### **a) Principe de la PCR**

La PCR (polymerase chain reaction) est une méthode qui permet l'amplification enzymatique ciblée d'un fragment d'ADN. Elle est basée sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser le brin complémentaire d'un ADN servant de matrice. Pour initier le processus, un segment d'acide nucléique doit s'y associer afin de servir d'amorce. Cette amorce (ou primer), de séquence complémentaire à celle du brin à amplifier, est un oligonucléotide synthétique d'une longueur de 17 à 30 bases. Son association à l'ADN cible est suivie de son élongation par la polymérase, aboutissant ainsi à la synthèse d'un ADN double brin. La PCR consiste en une succession cyclique de trois étapes : la dénaturation thermique de l'ADN double brin à une température de l'ordre de 95°C, l'hybridation amorce-ADN à une température de 50 à 65°C et l'élongation à 72°C. Chaque produit de la réaction d'élongation servant de matrice à la réaction suivante, une série de 25 à 40 cycles consécutifs conduit à l'accumulation exponentielle du fragment répliqué (**Ameziane et al., 2006**).

### **b) Technique**

Les gènes codant les BLSE : *bla TEM*, *bla SHV* et *bla CTX-M -1* et les gènes codant la résistance aux quinolones (*qnr A*, *qnr B* et *qnr S*) ont été amplifiés en utilisant des amorces spécifiques précédemment décrites par **Guessennd et al., (2008)** (Tableau 22) à partir de l'ADN plasmidique et suivant les protocoles décrits dans le tableau 23. Cette recherche a été réalisée seulement sur les souches transconjugantes BLSE positives.

Les réactions d'amplification sont réalisées dans un thermocycleur de type (ESCOHEALTHCARE– Swift.MaxPro) dans un volume réactionnel de 25µl (Tableau 24).

Pour valider la réaction de la PCR, diverses souches de référence ont été utilisées comme contrôles positifs (Tableau 25). Les produits PCR sont révélés sur gel d'agarose à 1%.



Tableau 22: Amorces utilisées dans l'étude

Gène	Amorce	Séquence d'oligonucléotide (5'-3')	Position des amorces	Taille du produit PCR (pb)	Référence
<i>bla<sub>CTX-M-1</sub></i>	ctxM1 (+)	GGTAAAAAATCACTGCGTC	65-84	863	Messai <i>et al.</i> , (2008)
	ctxM1 (-)	TTGGTGACGATTTTAGCCGC	928-909		
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	OS-5	CGCCGGGTATTCTTATTTGTCGC	23-42	1017	Ahojo <i>et al.</i> , 2007)
	OS-6	TCTTTCCGATGCCGCCAGTCA	818-799		
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	A-216	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	1-21	1100	Krishnamurthy <i>et al.</i> , (2013)
	A-217	GACAGTTACCAATGCTTAATCA	1080-1059		
<i>qnrA</i>	qnrA-1A	TTCTCACGCCAGGATTTGAG	339-358	571	Guesseind <i>et al.</i> , 2008
	Qnr A-1B	TGCCAGGCACAGATCTTGAC	910-891		
<i>qnrB</i>	qnrB-cs-1A	TGGCGAAAAAATT(GA)ACAGAA	54-73	594	
	qnrB-cs-1B	GAGCAACGA(TC)GCCTGGTAG	648-630		
<i>qnrS</i>	qnrS-1A	GACGTGCTAACTTGCGTGAT	101-120	388	
	qnrS-1B	AACACCTCGACTTAAGTCTGA	489-469		

Tableau 23 : Protocoles de PCR (Guesseind *et al.*, 2008)

Étapes d'amplification	Conditions de température/durée			
	<i>bla<sub>CTX-M1</sub></i>	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	<i>qnrA,B,S</i>
Dénaturation initiale	94°C/5 mn	94°C/5 mn	94°C/5 mn	94°C/5 mn
Dénaturation cyclique	94°C/1 mn	94°C/1 mn	94°C/1 mn	94°C/1 mn
Hybridation	60°C /1 mn	60°C/1 mn	50°C/1 mn	60°C/45s
Élongation cyclique	72°C/1 mn	72°C/1 mn	72°C/1 mn	72°C/1 mn
Elongation finale	72 °C/7 min	72°C/7min	72°C/7min	72°C/1min
Nombre de cycles	30	30	30	30

**Tableau 24 : Composition des mélanges réactionnels pour les PCR**

Mix PCR standard pour une réaction	Quantité PCR standard
Taq DNA polymérase (Biomatik)	0,5 µl
Tampon de PCR (Biomatik)	2,5 µl
Mg Cl <sub>2</sub> (Biomatik)	0,7 µl
dNTP (Biomatik)	0,8 µl
ADN à amplifier	1,5 µl
Amorce Forward	1 µl
Amorce Reverse	1 µl
Eau ultra pure	17 µl
Volume total	25 µl

**Tableau 25 : Souches bactériennes utilisées comme contrôle positif pour les réactions de PCR (Guessennd *et al.*, 2008)**

Bactérie	Numéro	Caractéristiques	Témoins positifs de PCR
<i>Salmonella sp</i>	U2A1446	TEM1+SHV12	<i>blaTEM</i> et <i>blaSHV</i>
<i>E. coli</i>	U2A1790	CTXM-1	<i>blaCTXM-1</i>
<i>E. coli</i>	UAA2118	qnrA1	<i>qnrA</i>
<i>E. coli</i>	UAA2119	qnrB1	<i>qnrB</i>
<i>E. coli</i>	UAA2120	qnrS1	<i>qnrS</i>

# **Partie III :**

# **Résultats et discussion**

## **1. Isolats bactériens**

Sur une période de quatre ans, allant d'Avril 2009 à mai 2012, 839 prélèvements ont été réalisés à partir de différents sites de l'environnement hospitalier (précédemment décrits dans le chapitre matériels et méthodes). Parmi ces prélèvements, seulement 261 (31,11%) ont donné une culture bactérienne contenant des bacilles à Gram négatif (BGN). Ce taux de détection relativement faible pourrait être dû aux conditions défavorables de croissance, certaines bactéries peuvent se miniaturiser (bactéries naines) et sont alors difficiles à mettre en évidence dans les prélèvements (bactéries viables et non cultivables) (**Hajjar et al., 2000**).

L'analyse des prélèvements a permis d'isoler 306 BGN. La purification a été basée sur les caractères cultureux et les caractères morphologiques. Tout isolat pur donnant des BGN a été retenu pour une éventuelle identification biochimique par la galerie API20E ou API NE.

### **1.1. Aspect macroscopique des isolats**

Les isolats bactériens ont montré divers aspects cultureux, en fonction du milieu de culture, permettant de suspecter leur appartenance à un groupe bactérien ou à un autre (entérobactéries, *Pseudomonas* ou autres BGN).

#### **a) Sur la gélose Mac Conkey**

- Colonies rouges ou roses (lactose +), rondes, lisses et bombées à contour régulier, de 0,5 à 4 mm de diamètre.
- Colonies jaunes rondes bombées de 0,1 à 0,5 mm de diamètre.
- Colonies roses rugueuses, sèches, à contour irrégulier, de grande taille, ayant une tendance à la confluence.
- Colonies naines, rouges, rondes et bombées.
- Colonies roses, muqueuses ayant tendance à la confluence, de 3 à 4 mm de diamètre.

#### **b) Sur la gélose nutritive**

- Colonies beiges ou blanchâtres, rondes, bombées, de 1 à 4 mm de diamètre, d'odeur putride ou fade, parfois muqueuses.
- Colonies jaunes, rondes, bombées de 0,1 à 0,5 mm de diamètre.
- Colonies beiges, à bord irrégulier, de 2 à 3 mm de diamètre d'odeur putride.

- Colonies bleu vertes, à bord irrégulier de 0,5 mm de diamètre, dégageant une odeur du jasmin caractéristique de *P. aeruginosa*.

**c) Sur la gélose au cétrimide**

- Colonies beiges ou blanchâtres, parfois muqueuses, de 0,5 à 4 mm de diamètre d'odeur fade ou putride.
- Colonies vertes, à bords réguliers, de 1 à 2 mm de diamètre dégageant une odeur du jasmin caractéristique de *P. aeruginosa*.
- Colonies vertes, muqueuses de 2 à 3mm de diamètre, à bords irréguliers.

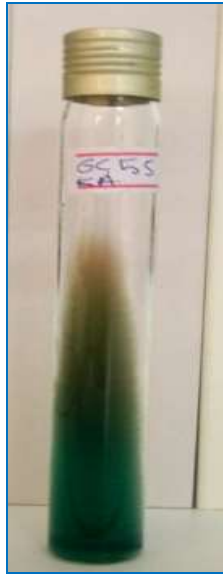
**1.2. Aspect microscopique**

Après coloration de Gram, l'observation microscopique a montré des BGN droits, courts, moyens ou longs, épais ou fins, isolés ou regroupés en paires ou en chainettes de longueur variable, ou bien des coccobacilles isolés ou regroupés en paires.

**2. Identification biochimique**

Parmi 306 isolats de BGN, 241 isolats ont été oxydase (-) et 65 ont donné une réaction oxydase (+). L'étude des caractères biochimiques a révélé que 228 (74,51%) isolats appartenaient au groupe des entérobactéries, 60 (19,61%) isolats ont été des BGNnf, et 18 (5,88%) isolats appartenaient à d'autres genres de BGN. La distribution par espèce des 306 souches de BGN identifiées est présentée dans le tableau 26. Un code a été attribué à chaque espèce, ce code a été utilisé à chaque fois que l'espèce correspondante est rapportée dans le texte.

L'identification de *P. aeruginosa* a été complétée par la recherche des pigments spécifiques : la pyocyanine sur le milieu King A et la pyoverdine sur le milieu King B. Les résultats ont montré la production de la pyocyanine (Figure 08), soluble dans le chloroforme (Figure 09) chez toutes les souches, alors que sur le milieu King B, la plupart des souches ont produit la pyoverdine (Figure 10) fluorescente sous UV (Figure 11), tandis que quelques souches ont produit la pyorubine de couleur brun-rosée (Figure 12).



**Figure 08 : Production de la pyocyanine sur le milieu King A**



**Figure 09 : Test de solubilité de la pyocyanine dans le chloroforme**



**Figure 10 : Production de la pyoverdine sur le milieu King B**



**Figure 11 : Test de fluorescence de la pyoverdine sous UV**



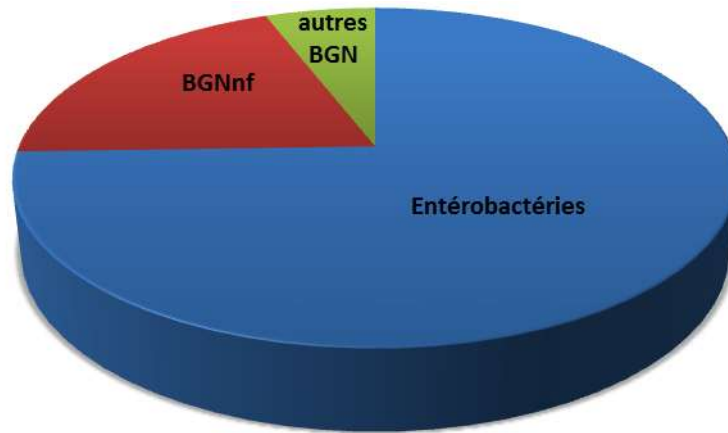
**Figure 12 : Production de la pyorubine sur le milieu King A**

Tableau 26 : Répartition détaillée des souches isolées

Groupe	Genre	Espèces	Code attribué	Effectif de l'espèce	% de l'espèce	Effectif du /des genre (s)	% du genre	Effectif du groupe	% du groupe
Entérobactéries	Klebsiella	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Ko	10	03,27	54	17,65	228	74,51 %
		<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	Kr	01	00,33				
		<i>Klebsiella terrigena</i>	Kt	04	01,31				
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kp	39	12,74				
	Enterobacter	<i>Enterobacter cloacae</i>	El	16	05,23	38	12,42		
		<i>Enterobacter sakazakii</i>	Es	10	03,27				
		<i>Enterobacter agglomerrans</i>	Ea	09	02,94				
		<i>Enterobacter amnigenus</i>	Em	02	00,65				
		<i>Enterobacter intermedius</i>	Ei	01	00,33				
	Serratia	<i>Serratia marcescens</i>	Sm	48	15,69	120	39,21		
		<i>Serratia liquefaciens</i>	Sl	09	02,94				
		<i>Serratia plymuthica</i>	Sp	45	14,70				
		<i>Serratia ficaria</i>	Sf	12	03,92				
		<i>Serratia odorifera 1</i>	So	03	00,98				
		<i>Serratia rubidaea</i>	Sr	03	00,98				
	Autres genres	<i>Escherichia coli</i>	Ec	05	01,63	16	05,23		
		<i>Citrobacter freundii</i>	Cf	04	01,31				
		<i>Proteus penneri</i>	Pp	05	01,63				
<i>Cedecea neteri</i>		Cn	01	00,33					
<i>Ewingella americana</i>		Ew	01	00,33					
BGN nF	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pa	35	11,44	60	19,61	60	19,61%	
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Ab	03	00,98					
	<i>Burkholderia cepacia</i>	Bc	12	03,92					
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	St	10	03,27					
Autres BGN	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Ah	15	04,90	18	05,88	18	05,88%	
	<i>Vibrio fluvialis</i>	Vf	01	00,33					
	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	Pn	02	00,65					
Total		27 espèces	/	306	100%	306	100%	306	100%

### 2.1. Répartition des souches en fonction du groupe de BGN

La répartition des souches selon le groupe de BGN (Figure 13) a montré une forte abondance des entérobactéries, dont la fréquence d'isolement 74,51% a dépassé celle rapportée par **Jalalpoor (2011)** qui a trouvé 58,33%.



**Figure 13 : Répartition des souches en fonction des groupes de BGN**

Par ailleurs, le taux de détection des entérobactéries a été de 25,03% (210 prélèvements ayant donné des entérobactéries / 839), il est comparable à celui rapporté par **Ahoyo et al., (2007)** qui était 23,5%. Cependant, il est inférieur à celui rapporté par **Touati et al., (2008a)** qui était 67,33% (101/150).

L'analyse de la variance par le test statistique ANOVA à un facteur contrôlé a montré qu'il n'existe pas des différences significatives dans la fréquence des souches entre les différents groupes de BGN : entérobactéries, BGNnF ou autres BGN ( $P = 0,711$ ).

### 2.2. Répartition des souches en fonction du genre

Les souches isolées dans notre travail appartiennent à 15 genres différents, dont le plus représenté est *Serratia* avec une fréquence de 39,21%, suivi de *Klebsiella* (17,65%) et *Enterobacter* (12,42%). En effet, les *Serratia* sont les entérobactéries les plus résistantes aux agents physiques et chimiques (**Flandrois, 1997**). Donc, les bactéries du groupe K.E.S sont les plus fréquemment isolées (69,28%). A l'opposé, d'autres genres comme *Proteus* sont moins abondants, ceci pourrait être expliqué par le fait qu'ils persisteraient des jours sur des surfaces sèches (**Kramer et al., 2006**).



### 2.3. Répartition des souches en fonction des espèces

La figure 14 présente la distribution des souches isolées en fonction de l'espèce. Les espèces prédominantes dans notre collection sont : *Serratia marcescens* (15,69%), *Serratia plymuthica* (14,70%), *Klebsiella pneumoniae* (12,74%), *Pseudomonas aeruginosa* (11,44%), *Enterobacter cloacae* (05,23%) et *Aeromonas hydrophila* (04,90%). Les autres espèces étant moins fréquentes (entre 0,33% et 3,92%).

La fréquence élevée d'isolement de ces espèces pourrait être liée à la capacité de survie de ces bactéries sur les surfaces dans l'environnement hospitalier. En effet, de nombreuses espèces Gram-négatives, comme *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* peuvent survivre sur des surfaces inertes, pendant des mois. *Klebsiella* spp. est capable de survivre pendant 2 heures jusqu'à plus de 30 mois, *Pseudomonas aeruginosa* peut survivre 6 heures à 16 mois, et 5 semaines sur des surfaces sèches, *Serratia marcescens* est capable de survivre de 3 jours à deux mois, et 5 semaines sur des surfaces sèches (**Kramer et al., 2006**). En plus, il a été montré que certains antiseptiques tels que la chlorhexidine ou d'hexamidine, ont moins d'efficacité sur *Klebsiella* spp que sur d'autres bactéries, telles que *E. coli* (**Grare et al., 2010**).

Pour *A. hydrophila*, peu de données sont disponibles sur la survie de cette espèce dans l'environnement hospitalier, néanmoins, il a été rapporté que cette bactérie résiste à la chloration (**Clave, 2010**), ce qui justifie son isolement dans notre cas, dans l'eau et dans certains sites hydriques comme les lavabos et les sanitaires, ou même sur certaines surfaces sèches désinfectées au chlore comme : les sols et les tables.

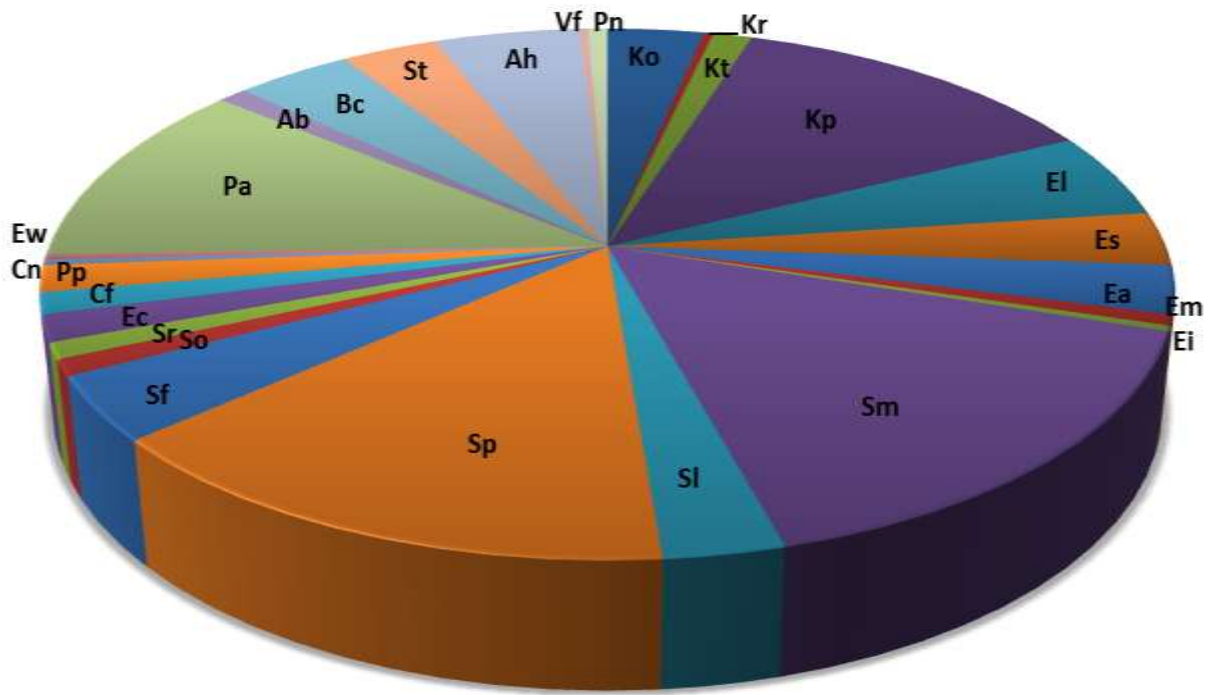


Figure 14 : Répartition des souches en fonction des espèces

### 2.3.1. Entérobactéries

Parmi les entérobactéries isolées, les bactéries du groupe K.E.S ont occupé la première place avec une fréquence très importante (92,98% des entérobactéries totales). Quant à *E. coli*, bactérie souvent rapportée comme responsable des infections nosocomiales, on a seulement isolé 05 souches (1,63%), tandis que des fréquences d'isolement élevées, ont été rapportées dans deux études nigériennes : 20,34% (Nwankwo, 2012) et 18,75% (Orji *et al.*, 2005). La faible fréquence d'*E. coli* dans notre étude pourrait être expliquée par le fait que cette entérobactérie est beaucoup moins résistante à la dessiccation (Jawad *et al.*, 1996; Wendt *et al.*, 1998). Ainsi, *E. coli* peut survivre de 1,5 heure à 16 mois (Kramer *et al.*, 2006). Concernant le taux de détection de cette espèce dans notre travail, il a été négligeable (5/ 839 soit 0,6%) par rapport à celui trouvé par Ahoyo *et al.*, (2007) qui était 11%.

En plus des espèces couramment isolées à l'hôpital, nous avons pu isoler d'autres espèces, qui sont rarement rencontrées en milieu hospitalier, il s'agit de *Cedecea neteri* et *Ewingella americana* qui peuvent être responsables d'infections chez des immunodéprimés.

➤ *Ewingella americana*

*Ewingella americana* est un BGN rare qui a été décrit pour la première, comme un nouveau genre dans la famille Enterobacteriaceae, en 1983 par **Grimont et al., (1983)**, à partir d'échantillons cliniques. *E. americana* a été isolé à partir de mollusques (**Muller et al., 1995**), de champignons (**Inglis et Peberdy, 1996**) et à partir de la viande emballée sous vide (**Helps et al., 1999**). Il a été identifié à partir de divers échantillons cliniques chez l'homme, y compris le sang (**Pien et al., 1983; Pien et Bruce, 1986; Devreese et al., 1992; Maertens et al., 2001**), les crachats (**Ryoo et al., 2005**), la conjonctive (**Heizmann et Michel, 1991; Da Costa et al., 2000**), les plaies (**Bear et al., 1986**), et le liquide péritonéal (**Kati et al., 1999**). Dans plusieurs de ces cas, cette bactérie semblait survenir plus fréquemment chez les patients immunodéprimés, de ce fait, les cliniciens pourraient l'envisager comme un possible agent pathogène opportuniste (**Pound et al., 2007**). Cependant, des cas cliniques survenus aux personnes en bonne santé ont également été signalés. Partant de ce constat, les cliniciens pourraient envisager *E. americana* comme un vrai pathogène émergent (**Syed et al., 2012**).

*E. americana* provoque rarement des infections humaines, et son pouvoir pathogène est inconnu (**Pien et al., 1983**). De nombreux cas cliniques et épidémiques dus à cette entérobactérie ont été décrits : des conjonctivites (**Heizmann et Michel, 1991; Da Costa et al., 2000**), des péritonites (**Kati et al., 1999**), des pneumonies (**Ryoo et al., 2005; Pound et al., 2007**). Des septicémies (**Devreese et al., 1992**) et même la mort (**Tsokos, 2003**) ont également été rapportées. **Pien et Bruce (1986)** ont décrit une bactériémie, suite à une chirurgie cardiaque, elle a été liée à un bain de glace dans lequel les seringues utilisées pour la détermination du débit cardiaque, ont été conservées. Ainsi, **Syed et al., (2012)** ont récemment décrit une ostéomyélite et une arthrite septique chez un toxicomane utilisant des aiguilles non stériles pour injecter de l'héroïne par voie intraveineuse.

Conformément à la littérature (**Devreese et al., 1992**) , la souche d'*E. americana* que nous avons isolé fermente le lactose, elle était également indole négative, citrate positive, ONPG positive, VP positive, glucose positive, mannitol positive.

*E. americana* est une bactérie peu exigeante et qui peut survivre dans l'eau et dans une solution de citrate et de préférence croît à 4°C (**Syed et al., 2012**). Notre souche est évidemment isolée d'un réfrigérateur dans un laboratoire. A partir de ce réservoir, *E. americana* peut contaminer les mains du personnel ou le matériel médical, et être par

conséquent transmise à d'autres malades. Une pseudobactériémie a été décrite en 1987, à la suite d'une contamination croisée à partir de tubes de coagulation citratés, contaminés par *E. americana*, constituant ainsi un réservoir environnemental (McNeil *et al.*, 1987). Donc, on peut considérer que le réfrigérateur est un réservoir environnemental pouvant être responsable d'une infection nosocomiale possible, en particulier en cas de non-respect des règles d'hygiène des mains (port de gants surtout) par les phlébotomistes au cours des prélèvements sanguins. Enfin, puisque peu d'informations existent sur la niche écologique de cette bactérie (Syed *et al.*, 2012), le respect des règles d'hygiène est donc indispensable pour prévenir les infections à *E. americana*.

➤ ***Cedecea neteri***

Dans notre travail, on a isolé une seule souche de *C. neteri* dont les caractères biochimiques sont identiques à ceux décrits par Farmer *et al.*, (1982), sauf que notre souche a été gélatinase (+).

Les bactéries du genre *Cedecea* ont rarement été isolées chez l'homme et leur pouvoir pathogène est mal connu. La plupart ont été isolées de sécrétions bronchiques (Delmas, 2003). Le premier cas de bactériémie humaine due à une souche de *C. neteri* a été rapporté par Farmer *et al.*, (1982) où les constatations ont appuyé une origine acquise dans la communauté plutôt à une infection nosocomiale.

Dans une autre étude, Aguilera *et al.*, (1995) ont décrit un cas de bactériémie due à *C. neteri* chez un patient atteint de lupus érythémateux disséminé (LED), qui a conduit à sa mort. C'était probablement une infection nosocomiale chez ce patient immunodéprimé, parce qu'il est bien connu que les patients atteints de LED, en particulier ceux soumis à un traitement immunosuppresseur à long terme, sont prédisposés à des infections graves. On sait très peu sur le rôle de *Cedecea* dans les maladies humaines, et cet agent peut avoir le statut comme un pathogène opportuniste (Aguilera *et al.*, 1995).

**2.3.2. Les bacilles Gram négatifs non fermentaires**

Les bacilles à Gram négatif non fermentant sont les bactéries les plus souvent isolées chez les patients atteints de mucoviscidose au stade chronique. La plupart des études épidémiologiques ont montré la nette prédominance de *P. aeruginosa*, suivi de *B. cepacia*, *S. maltophilia* et *Alcaligenes (Achromobacter) xylosoxidans*. Ces bactéries ont un pouvoir

pathogène et une capacité de transmission variable, rendant importante leur identification au niveau de l'espèce pour la prise en charge de ces patients. Les BGNnF sont généralement considérés comme des pathogènes opportunistes qui ont été sélectionnés par des traitements antibiotiques anti- *Pseudomonas* répétés et prolongés (Ferroni *et al.*, 2003).

Dans notre étude, *P. aeruginosa*, représente l'espèce la plus fréquemment isolée parmi les BGNnF, avec un taux de 58,33% (Figure 15), ce taux est inférieur à celui rapporté par Liazid (2012) qui a trouvé 71,42%. En revanche, nous avons également constaté une faible fréquence de l'espèce *A. baumannii*, qui était de 5%. Cette fréquence est inférieure à celle rapportée par Liazid (2012) qui était 28,57%. Quant aux autres BGNnF, *S. maltophilia* et *B. cepacia* ont été respectivement isolées à des fréquences de l'ordre de 16,67%, et de 20%.

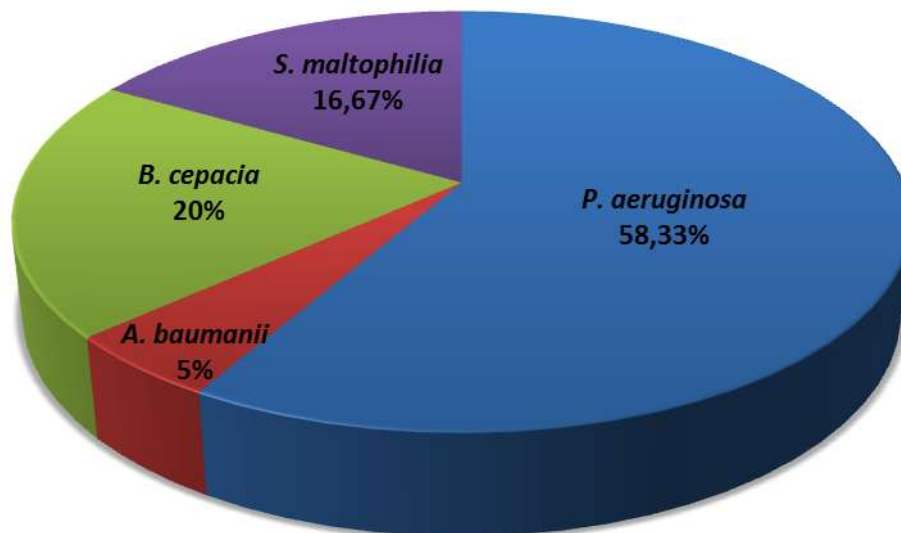


Figure 15 : Répartition des BGN nF en fonction des espèces

En ce qui concerne le taux de détection d'*A. baumannii*, il a été très faible (00,35%) par rapport à celui rapporté par Liazid (2012), qui était 6,06% (2/33 prélèvements). Pour *P. aeruginosa*, le taux de détection est relativement plus élevé (4,17%) que celui d'*A. baumannii*, cependant il reste inférieur au taux de détection rapporté par Liazid (15,15% soit 5/33 prélèvements), et à celui trouvé par Fazeli *et al.*, (2012), qui était 36,28% (41/113 prélèvements). L'isolement fréquent dans ce dernier cas, pourrait être en rapport avec des bouffées épidémiques au cours desquelles est impliquée la forte contamination de l'environnement des patients porteurs. Néanmoins, notre résultat est comparable à celui

rapporté dans une étude faite sur l'environnement des enfants atteints de mucoviscidose (Mouterde *et al.*, 1995), et qui était de 5,5%.

**a) *Pseudomonas aeruginosa***

Le bacille pyocyanique est une bactérie de l'environnement mais peut être commensal du tube digestif. Pour les sujets en bonne santé, *P. aeruginosa* est peu fréquent, avec seulement 2 à 10 % de porteurs tandis que chez les sujets hospitalisés ce taux peut atteindre 50 %, voire 60 % sur les plaies de brûlures ou d'escarres (Floret *et al.*, 2009). Les principaux sites de portage étant le tube digestif, les voies aériennes supérieures et la peau (Bertrand *et al.*, 2003).

Depuis l'émergence de cette espèce en tant que pathogène opportuniste majeur, de nombreuses épidémies hospitalières ont été décrites. Le plus souvent les investigations menées au décours de ces épidémies identifiaient l'environnement hydrique des services comme réservoir principal de contamination des patients. Saprophyte des environnements humides, *P. aeruginosa* peut en effet survivre et se multiplier sur des supports inertes humides (lavabos, robinets, savons, nébuliseurs et humidificateurs des appareils de ventilation), voire des solutions antiseptiques conservées trop longtemps (ammoniums quaternaires, chlorhexidine). De plus, les études disponibles montrent très majoritairement que les infections à *P. aeruginosa* acquises en réanimation sont des infections tardives (survenant plus de cinq jours après l'admission), présumant ainsi de l'acquisition de la souche dans le service considéré (Floret *et al.*, 2009).

Dans notre travail, *P. aeruginosa* est parmi les espèces les plus représentées, la fréquence d'isolement est de 11,44%, elle est inférieure à celle trouvée par Jalalpoor (2011) qui était 19,44%. La fréquence élevée de cette espèce pourrait être en partie expliquée par le fait qu'elle peut résister aux désinfectants couramment utilisés en milieu hospitalier (Orji *et al.*, 2005).

Nous avons isolé *P. aeruginosa* dans plusieurs sites humides particulièrement les lavabos. L'isolement de *P. aeruginosa* dans les lavabos est attribuée à la formation de biofilm, qui permet une fixation stable aux surfaces et une protection de la désinfection (Lowe *et al.*, 2012). En plus des lavabos, nous avons isolé *P. aeruginosa* dans d'autres réservoirs humides comme les toilettes, les siphons, les robinets, les solutions antiseptiques (Bétadine et alcool). En outre, nous avons même isolé cette bactérie à partir des surfaces sèches (sols et lits), de

l'équipement (pèse-bébé, respirateurs), de différents tissus (blouses, draps, oreillers) ainsi que de l'air.

Toutefois, la fréquence d'isolement de *P. aeruginosa*, est géographiquement variable dans notre étude. Parmi 35 souches de *P. aeruginosa*, 11 (31,43%) souches viennent des services de réanimation. Ceci revient d'une part aux pratiques thérapeutiques appliquées en milieu de réanimation, telles la pose de cathéters et de sondes, l'utilisation de respirateurs etc... (**Chabaa et al., 2000**). D'une autre part, cette espèce occupe une place prépondérante dans les infections nosocomiales en milieu de réanimation (**Bercault et al., 1994**), où elle joue un rôle majeur dans les infections broncho-pulmonaires et à un degré moindre dans les infections urinaires et les bactériémies (**Floret et al., 2009**). Dans les services de réanimation, *P. aeruginosa* a été rapporté comme le microorganisme le plus fréquent (18 %) qui semble survivre particulièrement bien dans les milieux humides, notamment les points d'eau (mousseurs et siphons) d'où l'intérêt de la désinfection régulière des points d'eau (**Lashéras et al., 2006**).

La nature, exogène ou endogène, des sources de contamination par *P. aeruginosa*, est encore très discutée. Pour certains auteurs, l'origine endogène semble prédominer comparativement à l'acquisition exogène par transmission croisée. En fait, de 2 à 10 % de patients sont fréquemment admis en étant porteurs asymptomatiques de *P. aeruginosa* qui vont développer ensuite une infection à l'occasion de leur hospitalisation dans un service de soins intensifs ou de réanimation. Pour d'autres auteurs, les sources exogènes semblent prédominantes (**Adjidé et al., 2010**).

Dans une étude récente, **Floret et al., (2009)** ont suggéré que l'épidémiologie de *P. aeruginosa* est diversifiée, et trois points importants sont mis en évidence par l'analyse de la littérature. Premièrement, il s'agit non seulement d'un pathogène opportuniste mais aussi d'un commensal opportuniste, certains groupes de patients étant fréquemment « porteurs sains » de cette bactérie, ces patients développant ensuite une infection à l'occasion de leur hospitalisation dans un service de soins intensifs. Deuxièmement, il y a une transmission directe, manuportée de patient à patient dans les services de réanimation, indépendante de l'exposition du patient à l'environnement inerte (points de distribution d'eau). Troisièmement, il y a néanmoins un rôle indiscutable de l'environnement hydrique dans le risque de colonisation hospitalière des patients. Ces observations nous montrent qu'une part non négligeable des cas d'acquisition de *P. aeruginosa* en réanimation est probablement évitable à

la fois par un respect strict de l'hygiène des mains et une maîtrise de la contamination des points d'eau.

Dans ce contexte, il a été rapporté que *P. aeruginosa* est extrêmement difficile à déloger d'un réseau d'eau, et donc de la robinetterie. Donc, la prévention des infections à *P. aeruginosa*, d'origine environnementale, repose sur une maîtrise du risque microbiologique associé à l'environnement hydrique hospitalier. Pour cela, il faut choisir une robinetterie facile à entretenir et réduire le niveau de biocontamination, avec une utilisation rigoureuse de solutés hydro-alcooliques, ce qui permet d'éviter le transfert de ces germes entre environnement et patient comme entre patients (**Adjidé et al., 2010**).

**b) *Acinetobacter baumannii***

*A. baumannii* est un BGNnF présent dans l'environnement et commensal des muqueuses de l'homme. Depuis quelques années, ce germe est considéré comme un pathogène opportuniste responsable d'un taux croissant d'infections nosocomiales sévères causant de réelles difficultés thérapeutiques du fait de sa capacité à développer plusieurs mécanismes de résistances aux antibiotiques. La diffusion épidémique est attribuée à la transmission manuportée et à la survie prolongée du germe dans l'environnement hospitalier (**Lahsoune et al., 2007**). *Acinetobacter* spp est l'un des agents pathogènes capables de survivre dans des réservoirs hospitaliers et pour lesquels la contamination de l'environnement peut jouer un rôle dans l'acquisition nosocomiale (**Weber et al., 2010**). *Acinetobacter* spp. peut persister de 3 jours à 5 mois (**Kramer et al., 2006**). Dans certaines conditions, des espèces d'*Acinetobacter* peuvent survivre pendant 4-5 mois ou plus sur des surfaces sèches (**Otter et al., 2011**).

De nombreuses études ont rapporté la prédominance des infections dues à *A. baumannii* dans des services de réanimation. Les principaux facteurs de risque dans ces services reconnus dans la littérature sont : la ventilation assistée, l'antibiothérapie à large spectre, la durée de séjour prolongée, le cathétérisme artériel et la sévérité de la pathologie sous-jacente. Par ailleurs, le développement de techniques de réanimation et d'explorations invasives a largement contribué à la recrudescence des infections à *A. baumannii* dans ces services (**Lahsoune et al., 2007**). Dans notre étude, seulement trois souches d'*A. baumannii* ont été isolées, exclusivement du service de réanimation. Ce résultat se concorde avec les données d'une étude marocaine décrivant l'importance de cette espèce surtout en unité de soins



intensifs (**Elouennass et al., 2003**). Une souche a été isolée à partir de l'air et deux souches à partir des oreillers. En effet, il a été démontré qu'une humidité relative plus élevée favorise la survie d'*A. baumannii* (**Weber et al., 2010**). La contamination environnementale étendue par *Acinetobacter* a été démontrée dans de nombreuses épidémies. Les sites colonisés incluent les barrières de lit, les tables de nuit, les surfaces des ventilateurs, les éviers, l'équipement d'aspiration, les matelas, l'équipement de réanimation les rideaux, les élingues de levage du patient, les vadrouilles, les seaux, les poignées de porte, les stéthoscopes, les incubateurs, et les claviers d'ordinateur. La colonisation des équipements et des dispositifs des voies respiratoires a été courante. La fréquence de la contamination de l'environnement dans des situations épidémiques a été rapportée de 3% à 50%. La colonisation des mains du personnel soignant avec *Acinetobacter* a également été démontrée, où elle peut survivre sur le bout des doigts pour les 60 minutes (**Weber et al., 2010**).

Dans notre travail, la fréquence d'isolement d'*A. baumannii* est trop faible (00,98%). Ainsi, le taux de contamination environnementale par cette bactérie est presque négligeable (3/839 prélèvements soit 0,36%). Ce taux est nettement inférieur à celui rapporté par **Thom et al., (2011)** qui était 9,8%. Cette différence pourrait être le fait que, dans cette dernière étude, les prélèvements ont été réalisés, à partir des surfaces environnantes de patients colonisés ou infectés par des *A. baumannii* multi résistants, c-à-d au cours d'une épidémie. Par ailleurs, une grande variation de la fréquence de contamination de l'environnement a été rapportée, entre différentes études, elle peut être expliquée par plusieurs facteurs, y compris la cultivabilité du microorganisme, le degré d'excrétion par le patient, la méthode d'échantillonnage et la facilité de contamination ou la difficulté de nettoyage de l'environnement. Les différences méthodologiques dans la collecte et la culture des échantillons rendent les comparaisons entre les études, difficile, et dans certains cas le niveau réel de la contamination environnementale peut être sous-estimé (**Otter et al., 2011**).

### c) *Stenotrophomonas maltophilia*

*S. maltophilia* est une bactérie ubiquitaire de l'environnement, mais également un saprophyte de l'homme, colonisant le nez, la gorge et le tube digestif. *S. maltophilia* est surtout devenue une des bactéries les plus fréquemment impliquées dans les infections nosocomiales, atteignant préférentiellement les immunodéprimés, les mucoviscidosiques ou les patients ayant une plaie chronique (pied diabétique, ulcères veineux...) (**Lavigne et al.,**

2008). Le degré de pathogénicité de *S. maltophilia* n'est pas précisément connu (Ferroni *et al.*, 2003).

*S. maltophilia* est responsable de pathologies nosocomiales sévères dont le taux de létalité peut atteindre 70 % dans les pneumopathies nosocomiales. L'environnement de soins est un réservoir pour cette bactérie et le taux de transmission exogène, très variable, peut atteindre 50% (Adjidé *et al.*, 2010). Dans l'environnement hospitalier, sa présence est liée à celle d'eaux contaminées: eau du robinet ou distillée, siphons d'évier, nébuliseurs, respirateurs, humidificateurs, bains de dialyse, surfaces humides, solutions antiseptiques et désinfectants dilués par de l'eau contaminée. Les facteurs de virulence de *S. maltophilia*, encore peu connus, contribueraient à son implantation et à sa diffusion dans les sites colonisés (plaies, cathéters, appareil respiratoire) (Avril *et al.*, 2000). Dans notre travail, on a isolé 10 souches de *S. maltophilia* dans des sites pareils : respirateurs, humidificateurs, lavabos, robinets, siphons d'évier, oreillers (site humide) et Bétadine. Les souches de *S. maltophilia* ont également été décrites comme adhérentes à plusieurs types de matériaux plastiques (Lavigne *et al.*, 2008) comme les respirateurs artificiels dans notre cas. La capacité de cette bactérie à s'adhérer sur tels dispositifs, peut contribuer à la pathogénicité de ces bactéries dans les infections pulmonaires.

Le rôle de l'environnement dans la transmission des épidémies à *S. maltophilia* a été démontré. De nombreuses études génomiques, basées sur des méthodes variées de biologie moléculaire, ont montré l'existence d'un réservoir environnemental de *S. maltophilia* ; réservoir à partir duquel certaines souches peuvent contaminer l'être humain, s'adapter à lui et devenir des pathogènes opportunistes. Par exemple, le transfert de contamination à partir d'un robinet contaminé vers un patient a été rapporté (Adjidé *et al.*, 2010).

#### **d) *Burkholderia cepacia***

Dans la présente étude, nous avons isolé 12 souches de *B. cepacia* dans différents services dont 3 du service de réanimation. Quant aux sites, 4 souches ont été isolées des surfaces, 6 souches à partir de divers dispositifs médicaux (deux souches à partir des respirateurs et deux souches à partir des cathéters, une souche isolée d'un thermomètre et une souche isolée d'un stéthoscope), une souche d'origine aérienne et une souche isolée du savon liquide. Il a été rapporté que dans l'environnement hospitalier, on retrouve *B. cepacia* dans des prélèvements d'air et aussi sur des surfaces contaminées par des gouttelettes respiratoires. Les infections à

*B. cepacia* sont de plus en plus souvent rencontrées à l'hôpital, les transmissions croisées de malade à malade sont souvent détectées et la responsabilité du matériel respiratoire a parfois été démontrée (**Drabick et al., 1996; Henry et al., 1997**).

Chez l'homme, *B. cepacia* peut être responsable d'IN diverses, principalement chez les malades immunodéprimés, et d'états de colonisation/infection pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose. Dans ce contexte, les infections à *B. cepacia* sont parfois dramatiques, entraînant une aggravation de l'état général et aboutissant même rapidement à un décès. La cause principale est la contamination du matériel de ventilation (**Segonds et al., 1996; Flanagan et Paull, 1998**). Certains génomovars de *B. cepacia* peuvent être à l'origine de pneumopathies nécrosantes rapidement mortelles (**Ferroni et al., 2003**).

### **2.3.3. Autres BGN**

#### **a) *Aeromonas hydrophila***

Nous avons isolé 15 souches d'*A. hydrophila* : 5 souches à partir des surfaces (corbeilles, tables, sols), deux souches à partir des lavabos, deux à partir des sanitaires, 4 souches dans l'eau de robinet, une souche à partir d'un respirateur et une souche isolée à partir d'un drap. Deux raisons pourraient justifier la détection d'*A. hydrophila* dans l'environnement hospitalier : la première est le fait que les *Aeromonas* résistent à la chloration, et la deuxième est que le portage intestinal transitoire chez l'homme à partir de l'eau ou autres aliments est possible (**Clave, 2010**).

En milieu hospitalier, *A. hydrophila* peut causer des toxi-infections alimentaires, des infections extra-digestives : infections de plaies, de brûlures, de fractures ouvertes (contact avec l'eau), cellulites et même myonécroses, des bactériémies après traumatisme cutané ou pénétration digestive (**Clave, 2010**). La pneumonie d'aspiration est suspectée dans certains cas de pneumonies à *Aeromonas* (**Janda et Abbott, 2010**). Le terrain est important : les états d'immunodépression sont fréquents, comme la prédisposition des patients atteints d'affections hépato-biliaires ou d'affections malignes (**Clave, 2010**). Bien que l'importance de aéromonades dans l'eau potable est inconnue par rapport à des cas de gastro-entérites réputés, l'exposition chronique des personnes immunodéprimées à *Aeromonas* via les eaux contaminées pourrait conduire à une maladie invasive, telles que la septicémie (**Janda et Abbott, 2010**).

**b) *Pasteurella pneumotropica***

*P. pneumotropica* est un coccobacille Gram négatif aéro- anaérobie facultatif qui a été isolé et caractérisé en 1950 par Jawetz. Cette bactérie fait partie des flores commensales oropharyngées de nombreux animaux, y compris les chiens et les chats. Elle est aussi fréquemment isolée des flores normales des voies respiratoires supérieures de rongeurs (**Frebourg et al., 2002**).

Dans notre travail, on a occasionnellement isolé deux souches de *P. pneumotropica* : Pn1 à partir d'un lit dans une salle de soins et Pn2 à partir d'un cathéter veineux dans une unité de soins intensifs. Concernant ce dernier cas, une survie plus longue de *P. pneumotropica* sur le plastique, a été démontrée dans une étude allemande (**Scharmann et Heller, 2001**).

Il a également été rapporté que la principale source d'une infection à *P. pneumotropica* est susceptible d'être un contact étroit avec des rongeurs infectés et aussi avec le personnel qui peut acquérir et transmettre les bactéries de leur système respiratoire supérieur, de la conjonctive et éventuellement aussi sur les cheveux (**Scharmann et Heller, 2001**). Ceci laisse supposer que la source de ces souches pourrait être le personnel ou même des souris ou des chats dont la présence est possible dans nos établissements.

Chez l'homme, les infections de *P. pneumotropica* surviennent très rarement. La présence de cette bactérie a été parfois signalée dans les flores respiratoires des personnes qui ont des animaux, surtout si ces personnes ont une maladie sous-jacente, comme la cirrhose. Des cas sporadiques d'infections humaines à *P. pneumotropica* ont été rapportés comme l'endocardite, la cellulite, des infections osseuses et articulaires, la méningite, les infections de la peau, la péritonite chez un patient de dialyse, et la pneumonie chez un patient atteint du SIDA. Un autre cas, impliquant un patient qui a contracté une méningite suite à une morsure de chien, a suggéré l'apparition de bactériémie dans la pathogenèse de l'infection. Vue la rareté des infections à *P. pneumotropica*, les données de la pathogenèse font défaut. *P. pneumotropica* est généralement considéré comme un agent pathogène humain exceptionnel et opportuniste (**Frebourg et al., 2002**).

**c) *Vibrio fluvialis***

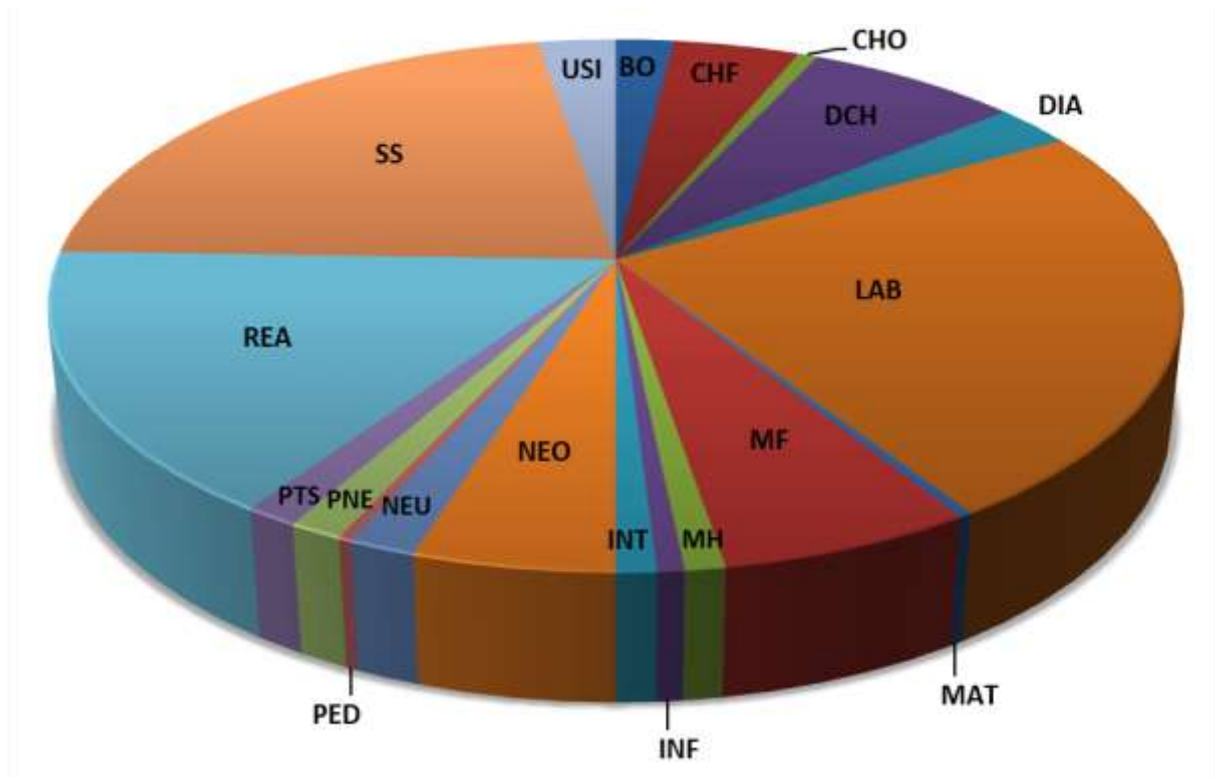
*V. fluvialis* est isolé de l'eau, des excréments d'animaux, des excréments humains, des égouts et des produits de la mer. Il est responsable des gastro-entérites surtout dans les pays en voie

de développement. Il provoque également une infection de la plaie avec septicémie primaire chez les personnes immunodéprimées (**Igbinsa et Okoh, 2010**). Le mécanisme exact de pathogénicité de *V. fluvialis* n'est pas encore connu. Cependant, plusieurs substances ont été mises en évidence, comme une entérotoxine, une cytolysine et une cytotoxine (**Dupray, 1986**).

Une seule souche de *V. fluvialis* a été isolée dans notre travail, à partir d'une toilette dans une salle de soins. Ce site est habituel pour tel pathogène. La transmission de *V. fluvialis* par voie alimentaire suggère donc un manque d'hygiène des mains.

#### **2.4. Répartition des souches en fonction des services**

La répartition des souches en fonction des services (Figure 16) a montré que les services présentant des fréquences d'isolement importantes étaient comme suit : laboratoire (24,18% des souches), salles des soins (21,89%), réanimation (16,01%), déchoquage (07,19%), médecine femme (06,21%), néonatalogie (04,90%) et chirurgie femme (04,25%). Cependant les autres services ont présenté des fréquences d'isolement négligeables (entre 0,33% et 2,61%). Ce résultat pourrait être expliqué par les différences des fréquences de prélèvements entre les différents services, par exemple, les nombres des prélèvements réalisés dans le laboratoire (140), les salles de soins (160), la réanimation (163) et le service de néonatalogie (95) ont été plus élevés que ceux réalisés dans d'autres services, ce qui augmente la possibilité d'isolement. En plus, l'abondance et la diversité des souches dans ces services (laboratoire et salles des soins) pourraient être expliquées par le fait qu'il s'agit des lieux ouverts et très fréquentés où une grande diversité de personnes passe à travers et, par conséquent, que la diversité microbienne devrait être plus liée à celle associée à la communauté humaine locale (**Poza et al., 2012**).



**Figure 16 : Répartition des souches en fonction des services**

<b>BO</b> : Bloc opératoire	<b>MF</b> : Médecine femme	<b>PNE</b> : Pneumo-phtisiologie
<b>CHF</b> : Chirurgie femme	<b>MH</b> : Médecine homme	<b>PTS</b> : Poste de transfusion sanguine
<b>CHO</b> : Chirurgie osseuse	<b>INF</b> : Maladies infectieuses	<b>REA</b> : Réanimation
<b>DCH</b> : Déchoquage	<b>INT</b> : Médecine interne	<b>SS</b> : Salles des soins
<b>DIA</b> : Dialyse	<b>NEO</b> : Néonatalogie	<b>USI</b> : Unités des soins intensifs
<b>LAB</b> : Laboratoire	<b>NEU</b> : Neurologie	
<b>MAT</b> : Maternité	<b>PED</b> : Pédiatrie	

Dans notre étude, outre les entérobactéries et les BGNnF, d'autres BGN ont été isolés. La distribution des différentes catégories de BGN dans les 19 services est présentée dans le tableau 27.

L'analyse de la variance à un critère AVI entre les catégories de BGN a montré qu'il existe des différences hautement significatives entre les différents groupes de BGN ( $P= 0,006$ ;  $P < 0,01$ ). Tandis que l'AVI a montré qu'il n'existe pas de différences significatives entre les différents services ( $P = 0,197$ ).

Tableau 27 : Répartition des différentes catégories de BGN selon les services

Type de BGN	BO	CHF	CHO	DCH	DIA	LAB	MAT	MF	MH	INF	INT	NEO	NEU	PED	PNE	PTS	REA	SS	USI
Entérobactéries	06	09	02	17	06	60	00	16	03	01	00	10	03	00	02	04	32	56	01
BGN nF	00	03	00	04	01	09	01	01	00	00	03	05	01	01	02	00	17	07	05
Autres BGN	00	01	00	01	01	05	00	02	00	01	00	00	01	00	00	00	00	04	02
Total	06	13	02	22	08	74	01	19	03	02	03	15	05	01	04	04	49	67	08

Toutefois, on s'est intéressé à comparer la fréquence des entérobactéries avec celle des BGNnF, étant des groupes bien définis. La figure 17 présente la répartition de ces deux groupes dans les différents services.

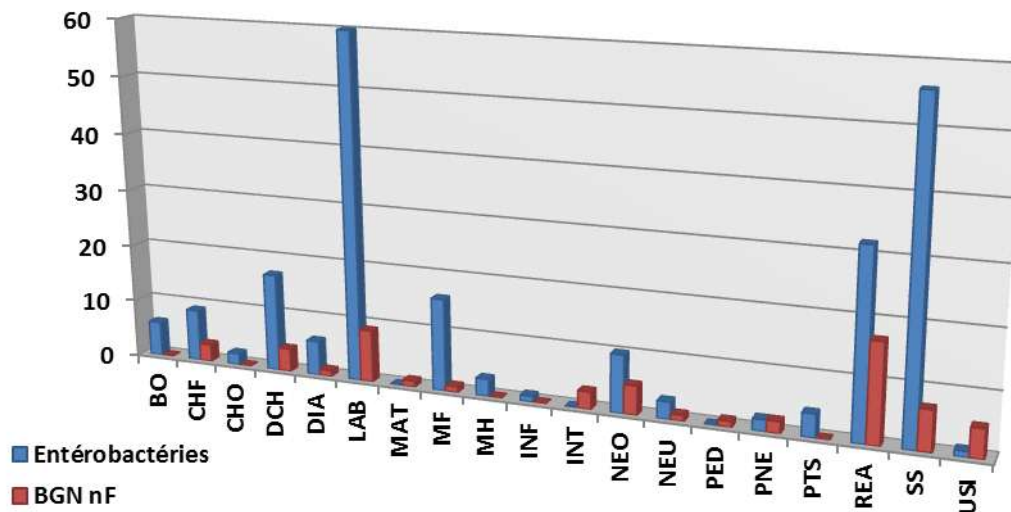


Figure 17 : Répartition des entérobactéries et des BGNnF dans les différents services

A la lumière des résultats obtenus, nous avons pu constater que le groupe des entérobactéries prédomine dans tous les services, sauf dans les services : unités des soins intensifs et médecine interne. Ceci pourrait être le fait que les BGNnF sont des bactéries ubiquitaires pouvant être responsables d'infections cliniques sur des terrains débilisés (Berthelot *et al.*, 2005) comme c'est le cas dans les unités des soins intensifs.

Parmi les services étudiés dans notre travail, certains présentent des particularités dépendant des patients ou de leur environnement, qui les rendent des services à haut risque infectieux.

**a) Service du bloc opératoire**

Il n'existe pas d'études systématiques de l'importance relative des différents facteurs environnementaux à assurer un environnement sain en salle d'opération; mais il est connu qu'un fluide contaminé ou un équipement dans la salle d'opération peuvent entraîner la contamination des surfaces et conduire à des infections des plaies (Nwankwo, 2012).

Dans le présent travail, on a seulement isolé 6 souches dans le bloc opératoire, vu le nombre de prélèvements réalisés dans ce service (24 échantillons). Ces souches ont été isolées de trois sites différents : deux souches d'*Enterobacter cloacae* et une souche d'*Enterobacter sakazakii* isolées de l'air, une souche de *Klebsiella pneumoniae* ssp *ozaenae* isolée d'un respirateur artificiel, une souche de *Serratia ficaria* et une souche de *Citrobacter freundii* isolées du sol. Ces espèces ont été rapportées parmi les principaux microorganismes rencontrés dans les infections post-opératoires (Dembele, 2005). Ainsi, on a remarqué qu'il s'agit en grande partie des bactéries du groupe KES dont la pathogénicité s'exprime habituellement chez des malades affaiblis, traités par les antibiotiques, chez qui elles sont parfois inoculées par un geste à visée diagnostique ou thérapeutique. En ce qui concerne *Klebsiella pneumoniae*, elle représente l'espèce du groupe KES la plus rencontrée lors des infections broncho-pulmonaires (Berche et al., 1991). La souche de *K. pneumoniae* isolée du respirateur pourrait être d'origine environnementale, ou être issue d'un malade colonisé ou infecté, et elle pourrait être ultérieurement transmise à un autre patient affaibli, en réutilisant ce respirateur contaminé (Otter et al., 2011). Il faut noter que cette souche était multi résistante.

Il est admis que le matériel contaminé représente un risque pour le malade. Selon le risque infectieux pour le malade, le respirateur artificiel (matériel contaminé dans notre cas) est considéré comme un matériel semi critique, soit en contact avec une muqueuse saine. Une désinfection ou une stérilisation doit donc être effectuée pour ce type de matériel (Bimar et al., 1998).

Les souches de *Citrobacter* et *Serratia* isolées du sol ont également été multi résistantes. La découverte d'agents pathogènes sur les surfaces présage un danger pour les patients opérés, car ils peuvent être responsables d'infections du site opératoire (surinfections sur plaies ou des septicémies) chez ces malades (Berche et al., 1991) en cas de leur persistance si le nettoyage



et la désinfection du sol ne seront pas efficaces. En plus, ces bactéries peuvent facilement acquérir de nouvelles résistances aux antibiotiques et constituer une menace pour la vie des patients. Il sera donc nécessaire d'effectuer un bionettoyage régulier des surfaces dans le cadre d'une politique efficace de lutte contre les infections (**Nwankwo, 2012**).

Il n'existe pas de relations connues entre le taux d'infections nosocomiales et le niveau de contamination des surfaces (comme le sol). Cependant, celles-ci jouent un rôle indirect par le biais de l'aéro-biocontamination et des mains du personnel. Quant à l'aéro-biocontamination, un double risque est envisagé, celui de colonisation des voies aériennes supérieures et d'infection de la plaie opératoire. L'aéro-biocontamination a deux origines : externe ou interne à la salle d'opération. L'aéro-biocontamination externe (air extérieur, couloirs) est limitée par la filtration et la surpression. La contamination interne est plus importante. Elle est liée à la présence humaine (gouttelettes, squames cutanées, fibres textiles) et proportionnelle au nombre de personnes et aux mouvements d'air produits (déplacements, ouvertures de portes, etc.) (**Bimar et al., 1998**).

Nos résultats montrent que différents sites inanimés dans le bloc opératoire associés directement ou indirectement à des procédures chirurgicales ont été contaminés par des BGN connus. Bien que le nombre de souches isolées a été faible, et que la participation directe de ces bactéries dans la transmission des infections n'a pas été étudiée dans notre travail, l'isolement de ces bactéries présente un problème sérieux pour une possible transmission nosocomiale.

Enfin, le bloc opératoire, étant une zone à très haut risque infectieux (zone biologique de classe 4), doit rester le plus aseptique possible en toute circonstance. Il faut donc éviter d'y introduire des microorganismes, que ce soit par le personnel et/ou les patients, en reprecisant les règles d'hygiène et d'asepsie, ou que ce soit par l'environnement inanimé (climatisation, réseau d'eau, gaz médicaux, matériel, agents médicamenteux, etc.), en effectuant une surveillance et un entretien approprié, ainsi que des manipulations correctes, et en luttant contre l'aéro-biocontamination. Il faut ensuite détruire les micro-organismes introduits en tours de journée : en faisant un bionettoyage suivi d'une désinfection des locaux dès que nécessaire; en éliminant de la salle d'opération le matériel sale et les déchets produits au fur et à mesure, tout en protégeant l'environnement; en décontaminant et nettoyant le matériel dans un local de décontamination. Enfin les soins dispensés aux patients doivent obéir aux règles élémentaires d'asepsie. Les mesures d'hygiène ont donc pour objet de protéger les patients et

le personnel du risque d'infection nosocomiale et de limiter la contamination de l'environnement (**Bimar et al., 1998**).

### **b) Unités des soins intensifs**

Les résultats obtenus montrent que les unités de soins intensifs (USI) montrent une diversité bactérienne réduite par rapport à d'autres services présentant une diversité remarquable comme le laboratoire, la réanimation et les salles des soins. Ce résultat corrobore une étude présentant une exploration de la diversité bactérienne sur des surfaces inertes dans des USI d'un hôpital universitaire espagnol (**Poza et al., 2012**), dont la diversité bactérienne détectée était réduite, par rapport au hall d'entrée. Ceci peut s'expliquer par le caractère confiné et par l'existence d'une pression sélective antimicrobienne, ainsi du fait des mesures strictes du nettoyage et du faible transit des personnes dans ce service. Dans la même étude, il a été démontré que les bactéries qui survivent dans les USI sont des microorganismes capables de s'adapter aux conditions nutritionnelles faibles, de développer des mécanismes de résistance, de survivre en présence de composés toxiques ou de persister dans les surfaces sèches pendant une longue période (**Poza et al., 2012**).

Dans notre travail, 8 souches ont été isolées dans les USI : deux souches ont été isolées du même cathéter, *P. pneumotropica* Pn2 et *B. cepacia* Bc6; une souche de *P. aeruginosa* Pa21 isolée d'un respirateur; une souche de *S. maltophilia* St9 à partir d'un stéthoscope; une souche d'*A. hydrophila* Ah11 isolée de l'eau et enfin 3 souches isolées des robinets (une souche de *K. pneumoniae* Kpr3, une souche de *P. aeruginosa* Pa24 et une souche de *S. maltophilia* St8).

Ces résultats montrent que les BGNnF prédominent dans les USI, c'est le fait qu'il s'agit des bactéries pathogènes opportunistes qui peuvent coloniser et / ou infecter des patients immunodéprimés. En plus, on a remarqué que la plupart des souches isolées (5/8) sont multi résistantes.

### **c) Service de réanimation**

Dans la présente étude, nous avons constaté que le service de réanimation occupe la troisième place quant à la fréquence des souches de BGN isolées. La contamination élevée est cohérente avec la structure physique, le nombre élevé d'équipements et les conditions de patients en réanimation, qui semblent être des facteurs déterminants dans les taux d'infection élevés (**Oliveira et Damasceno, 2010**).

Dans les services de réanimation, on a isolé 49 souches dont 32 appartiennent aux entérobactéries, représentées majoritairement par des bactéries du groupe KES (32 souches), et 17 appartiennent aux BGNnF. Quant aux sites contaminés, on a remarqué que les sites de l'environnement proche du patient (oreiller, lit, table de chevet) ont fréquemment été contaminés. On a également noté une aéro-biocontamination et une contamination des sols dans ces services. Les blouses du personnel ont ainsi montré une contamination par les BGN.

Il a été rapporté que l'environnement proche du malade (équipement médical et mobilier) doit être nettoyé et désinfecté au moins une fois par jour. En cas de souillure par des liquides biologiques, les surfaces inertes doivent être immédiatement désinfectées (SRLF, 2002).

### **d) Service de dialyse**

Plusieurs études ont suggéré que les infections chez les patients traités par dialyse sont 100 fois plus fréquentes que dans la population générale. Les insuffisants rénaux ont de nombreux facteurs de risque prédisposant aux infections, notamment un déficit immunitaire et des portes d'entrée cutanées multiples. Il a été rapporté que les agents pathogènes les plus fréquemment retrouvés sont les cocci à Gram positif, en majorité des staphylocoques et les bacilles à Gram négatif. L'utilisation fréquente de matériels « inertes » (cathéter d'hémodialyse ou de dialyse péritonéale) favorise la constitution de biofilm sur ce matériel. Le biofilm est également un facteur majeur prédisposant aux infections. Les bactéries se trouvent dans un environnement propice, riche en nutriments (solution de dialysat riche en glucose pour la dialyse péritonéale et sang pour l'hémodialyse chronique), se développent et deviennent moins sensibles aux antibiotiques. À partir du biofilm, les bactéries peuvent se disperser dans l'organisme et entraîner des états septiques graves : péritonite en cas de dialyse péritonéale, septicémie avec risque d'endocardite ou embolies septiques en cas d'hémodialyse. Parmi les germes incriminés dans les péritonites, les bacilles à Gram négatif (*Enterobacter*, *Klebsiella*, *E. coli*, *P. aeruginosa* et autres BGN). La contamination a lieu via le cathéter de dialyse péritonéale le plus souvent lors d'une erreur de manipulation. Les péritonites à *P. aeruginosa* sont souvent sévères, elles peuvent endommager définitivement le péritoine. Pour les infections de la voie vasculaire, la colonisation des cathéters peut se faire par voie extra- ou endoluminale. Les cathéters en place sont rapidement tapissés de constituants tels que fibrinogène, fibronectine et laminine favorisant l'adhésion des bactéries au matériel étranger avec élaboration d'un biofilm. Les bactéries peuvent disséminer dans l'organisme et être à l'origine d'embolies septiques. Parmi les microorganismes en cause les bacilles à Gram négatif

comme : *P. aeruginosa*, *E. coli*, *A. baumannii*, *S. marcescens*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*. La mortalité due aux infections des cathéters de dialyse reste élevée (12-25,9%) (**Beaudreuil et al., 2008**).

Dans notre travail, on a seulement isolé 8 souches à partir du service de dialyse, dont quatre proviennent des sites critiques : *B. cepacia* (Bc2) et *E. coli* (Ec1) à partir des cathéters d'hémodialyse, *K. pneumoniae* (Kpp2) et *S. marcescens* (Sm2) à partir du générateur de dialyse. La plupart des souches (6/8) isolées dans ce service, sont multi résistantes. Les bactéries trouvées sur les cathéters peuvent ainsi coloniser ces derniers par voie extraluminaire dont l'adhésion et la formation des biofilms seront favorisées par les facteurs décrits précédemment. Par conséquent, ces bactéries peuvent disséminer dans l'organisme et être à l'origine de diverses infections principalement les septicémies.

Enfin, les mesures de prévention sont capitales. La pose du cathéter doit se faire en milieu stérile strict (casaques. . .). Les antiseptiques bétadine, chlorexidine ou alcool auraient une efficacité équivalente. Des recommandations récentes privilégient un pansement fait avec des compresses sèches et non des films protecteurs transparents qui favoriseraient la colonisation de l'orifice de sortie. Le branchement en dialyse doit respecter les mesures d'asepsie stricte (**Beaudreuil et al., 2008**).

#### **e) Service de néonatalogie**

Les multiples et nécessaires intrusions du personnel et des parents dans le service de néonatalogie, ainsi que le recours accru à des techniques invasives, favorisent l'émergence des infections nosocomiales néonatales. La distribution des IN observées chez les nouveau-nés diffère de celle de l'adulte ou de l'enfant plus âgé. Les bactériémies et les infections respiratoires sont les plus fréquentes, surtout chez le nouveau-né en soins intensifs, mais également les infections cutanées, digestives, oculaires et ORL. A l'inverse, les infections urinaires et les plaies chirurgicales sont rares (**Sarlangue, 1997**).

La microflore endogène de la peau et des muqueuses joue un rôle essentiel dans la défense contre les bactéries pathogènes de l'environnement hospitalier, la fréquence de colonisation par celles-ci augmentant avec la durée du séjour. La présence de bactéries inhabituelles dans l'oropharynx peut être due à une contamination directe par les mains du personnel ou par voie

aéroportée à partir du système de ventilation. Ainsi, l'environnement chaud et humide des couveuses favorise la multiplication microbienne (**Sarlangue, 1997**).

Dans la présente étude, nous avons isolé 15 souches de BGN dans le service de néonatalogie, 10 souches appartenant aux entérobactéries (4 souches de *S. plymuthica* isolées des toilettes, une souche de *S. odorifera* isolée d'une paille, une souche de *K. oxytoca* isolée d'un interrupteur, deux souches de *K. pneumoniae* une isolée à partir d'une table et l'autre d'un siphon, une souche de *C. freundii* et une autre de *P. penneri* isolées des couveuses) et 5 souches de BGNnF (une souche de *B. cepacia* d'origine aérienne, et quatre souches de *P. aeruginosa* provenant du sol, d'un interrupteur et d'un lavabo). Il faut noter que parmi 15 souches, 11 ont été multi résistantes, dont huit souches sont des entérobactéries productrices de BLSE.

Une étude tunisienne a rapporté que les bacilles à Gram négatif étaient les bactéries les plus fréquemment isolées (68 %) dans les infections nosocomiales néonatales et que le germe de colonisation des nouveaux nés le plus fréquent était *K. pneumoniae* (28 %), retrouvé à l'admission chez 15 % des patients et détecté au cours du séjour en réanimation chez 13 % d'entre eux (**Ben Jaballah et al., 2006**). En plus de *K. pneumoniae*, d'autres espèces ont également été rapportées dans la même étude, il s'agit de *P. aeruginosa* et *K. oxytoca*. Ces trois espèces ont été rencontrées dans notre travail comme contaminants de l'environnement du service de néonatalogie.

Par ailleurs, **Ben Jaballah et al., (2006)** ont rapporté que *K. pneumoniae* était le germe le plus fréquemment isolé dans les bactériémies (26,7 %), *P. aeruginosa* était le germe prédominant des pneumopathies (28,6 %), alors que *K. oxytoca* était responsable de 4,5% des bactériémies.

Dans une étude française, il a été rapporté que les bacilles à Gram négatif sont à l'origine de 10 à 20% des septicémies dont la moitié dues à des colibacilles. Ils sont également responsables dans 53% des pneumopathies nosocomiales bactériennes en unité de réanimation néonatale (**Sarlangue, 1997**).

La fréquence des souches multirésistantes résulte, vraisemblablement, de l'usage abusif des antibiotiques à large spectre et notamment des céphalosporines de troisième génération (**Ben Jaballah et al., 2006**).

Dans notre travail, la contamination de l'environnement dans le service de néonatalogie pourrait être due à une mauvaise compliance au lavage des mains du personnel et des parents, qui pourrait même contribuer à la contamination directe des nouveau-nés. La situation est plus dangereuse lorsqu'il s'agit d'une contamination de l'environnement par des bactéries multi-résistantes, qui pourraient coloniser les patients, et provoquer une infection nosocomiale dont le traitement sera très difficile. Ainsi, des épidémies à BGN multi-résistants ont été contrôlées par la suppression des réservoirs inanimés et les mesures d'isolement (**Sarlangue, 1997**).

Enfin, le but de la prévention des IN dans les unités néonatales est de permettre le développement d'une microflore inoffensive tout en minimisant la transmission des bactéries potentiellement dangereuses. Cette prévention repose en grande partie sur le respect des règles d'hygiène et d'asepsie (**Sarlangue, 1997**).

### **2.5. Répartition des souches en fonction de l'origine du prélèvement**

Il a été suggéré que les mains du personnel soignant, transitoirement contaminées, constituent la principale voie de transmission des agents pathogènes aux patients, surtout aux malades susceptibles (**Kramer et al., 2006**), mais des objets contaminés, des surfaces et de l'air peuvent être directement ou indirectement impliqués dans la voie de transmission (**Otter et al., 2011**). Les objets inanimés qui sont contaminés par des bactéries pathogènes qui propagent l'infection aux autres sont souvent appelés vecteurs passifs ou fomites. La plupart des épidémies associées à des fomites sont causées par des objets qui devraient être stériles mais qui ont été contaminés (**Nwankwo, 2012**). Dans notre travail, on s'est intéressé à évaluer la contamination par les BGN, de 37 sites environnementaux y compris l'air et l'eau. 26 de ces sites ont présenté différentes surfaces environnementales.

Les études menées dans les années 1970 et 1980 ont indiqué que la contamination des surfaces de l'environnement a joué un rôle négligeable dans la transmission endémique des infections nosocomiales (**Weber et al., 1976, Maki et al., 1982**). Cependant, des études récentes ont démontré que plusieurs agents pathogènes majeurs nosocomiaux sont éliminés par les patients et contaminent les surfaces de l'hôpital à des concentrations suffisantes pour la transmission, survivent pendant de longues périodes, persistent malgré les efforts de désinfection, et peuvent être transférés aux mains des personnel de santé. Des preuves se sont accumulées que les surfaces contaminées contribuent de façon importante à la transmission épidémique et endémique du *Clostridium difficile*, des entérocoques résistants à la

vancomycine, de *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline, d'*Acinetobacter baumannii*, de *Pseudomonas aeruginosa*, et des norovirus et qu'une amélioration de décontamination de l'environnement contribue à la lutte contre les épidémies (**Otter et al., 2011**).

Certaines études ont apporté des preuves constatant que la contamination des surfaces contribue à la transmission nosocomiale croisée. Elles ont identifié la présence antérieure d'un patient colonisé ou infecté dans une chambre comme un facteur de risque pour l'acquisition du même agent pathogène par un nouvel occupant, probablement en raison de la contamination résiduelle de la chambre qui n'est pas enlevée par le nettoyage et la désinfection. Cet effet a été montré pour ERV, le SARM, *C. difficile*, *P. aeruginosa* multirésistante et *A. baumannii*. Une étude récente a également suggéré que la contamination des surfaces contribue à la transmission des agents pathogènes nosocomiaux, cette constatation est faite suite à l'effet de l'amélioration de nettoyage et de désinfection sur les taux d'infection (**Dancer, 2009**). De nombreuses épidémies à *A. baumannii* associées à des fomites, ont été résolues, une fois la source commune est identifiée et retirée, remplacée, ou suffisamment désinfectée (**Nwankwo, 2012**).

Relativement peu d'études prospectives ont été menées sur la contamination des surfaces par les Gram négatifs. La fréquence de contamination des surfaces par des bactéries à Gram négatif est d'environ 5% à 10% (**Otter et al., 2011**) mais dans notre travail, cette fréquence est de 31,59%. Ce taux relativement élevé par rapport à celui rapporté dans la littérature nous laisse à supposer l'excrétion importante des BGN dans l'environnement, mais plutôt à de grand défaut de désinfection des surfaces. Dans ce dernier cas, il peut s'agir d'une désinfection irrégulière ou des produits peu efficaces.

Dans notre étude, les sites ayant montré des taux de contamination élevés par les BGN sont par ordre décroissant : les lavabos, les barrières du lit, l'air, le sol, les tables, les oreillers, les paillasse, les sièges de toilette, les murs, les blouses du personnel, les sondes et les respirateurs, les corbeilles de poubelle. Nos résultats corroborent ceux rapportés dans la littérature dont les surfaces les plus contaminées en milieu hospitalier sont : le sol, les barrières de lit, les tables, les vêtements portés par les patients, les oreillers et les matelas (**Boyce et al., 1997**). Les sites les plus contaminés dans notre travail sont en fait les surfaces les plus fréquemment touchées par les patients ou par le personnel.

En effet, les malades hospitalisés (infectés et / ou colonisés) représentent la principale source de contamination de l'environnement hospitalier, le personnel ou les visiteurs peuvent parfois contribuer à cette contamination environnementale. Les patients excrètent leurs germes pathogènes dans les milieux environnants, donc les surfaces à proximité d'eux qui sont touchées fréquemment par le personnel de santé et les patients - dites "les surfaces hautement touchées" - ont une fréquence plus élevée de contamination que les autres sites (**Otter et al., 2011**). Une récente étude a défini les surfaces hautement touchées comme les bords du lit, la surface du lit, et le chariot d'approvisionnement, sur la base de leur fréquence de contact observée (**Huslage et al., 2010**). Développer une compréhension des sites qui sont plus susceptibles d'être contaminés par des agents pathogènes peut guider la pratique de contrôle de l'infection et diriger de nouvelles innovations (**Otter et al., 2011**).

En milieu hospitalier, les surfaces en contact avec les mains sont souvent contaminées avec des agents pathogènes nosocomiaux dont plusieurs ayant la capacité d'y survivre, peuvent servir comme vecteurs de transmission croisée. Un seul contact des mains avec une surface contaminée peut entraîner à un degré variable, le transfert de pathogènes. La transmission aux mains était plus réussie avec certains microorganismes comme *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* (à 100%) (**Kramer et al., 2006**).

La circulation du personnel de santé et des visiteurs, dans l'hôpital et leur contact consécutif avec différents patients, des objets et des surfaces impliquent des possibilités de diffusion de l'agent pathogène si les précautions nécessaires ne sont pas respectées, notamment le lavage des mains. Toutefois, d'autres moyens peuvent être impliqués dans le transfert des agents pathogènes. La contamination des surfaces pourrait être donc réduite par lavage des mains avant et après avoir été en contact avec les patients et les différentes surfaces. Cependant, le respect par le personnel de santé à cette pratique a été signalé à être inférieur à 50% dans les établissements de santé généraux (**Oliveira et Damasceno, 2010**).

Il a été rapporté que les infections nosocomiales sont, entre 50 à 60%, dues au manque d'hygiène, particulièrement des mains. Quant au respect de cette observance de l'hygiène des mains en milieu hospitalier, on estime qu'elle ne dépasse pas les 20% en Algérie, alors qu'elle est de 50% en France (**Kourta, 2013**). En raison de cette très faible observance à l'hygiène des mains dans notre pays, le risque à partir de surfaces contaminées ne peut être négligé.



Toutes les espèces bactériennes isolées à partir des différents sites ne sont pas obligatoirement pathogènes mais la flore issue de l'activité humaine comme les bactéries de la flore cutanée ou des flores muqueuses et certaines espèces bactériennes des flores hydriques naturelles comme *P. aeruginosa* peuvent être responsables d'infections nosocomiales (**Rouillon et al., 2006**).

### a) Lavabos

Nous avons isolé 35 souches à partir des lavabos, dont 23 appartiennent au groupe K.E.S. L'espèce la plus fréquemment isolée était *P. aeruginosa* (8 souches), ce résultat est comparable à celui trouvé par **Nwankwo (2012)**. La fréquence d'isolement élevée pourrait être expliquée par le fait des conditions humides favorables à cette bactérie (**Oliveira et Damasceno, 2010**).

### b) Linge

Le rôle du linge dans la transmission des infections nosocomiales est discuté. Les données publiées dans la littérature scientifique sont peu nombreuses, mais il existe quelques preuves directes ou indirectes du rôle du linge dans la transmission des infections nosocomiales tant au niveau des patients que du personnel. Une importante épidémie d'infections graves à *Acinetobacter sp.* dans plusieurs services différents d'un hôpital (137 cas en deux années) a été rapportée. Des oreillers en duvet, entretenus par lavage en blanchisserie, mais insuffisamment séchés constituaient le réservoir, l'identité des souches du linge et des patients a été confirmée. Ainsi, le linge propre a été rendu responsable d'infections nosocomiales parfois graves lorsqu'il n'était pas correctement traité et géré tout au long de la chaîne depuis le traitement jusqu'à l'utilisation (**Weernink et al., 1995**).

Dès l'occupation du lit, le linge est très rapidement contaminé : après 8 heures, voire même après deux heures d'occupation du lit, une prolifération bactérienne peut être observée, sous l'effet de la chaleur et de l'humidité. La contamination du linge varie suivant plusieurs facteurs comme le type de pièces de linge (drap supérieur, drap inférieur, alèse ou oreiller) (**Gaillon et al., 1996**) et l'état clinique des patients (colonisés ou infectés). Les bactéries rencontrées sont, soit des bactéries d'origine cutanée, soit des bactéries d'origine digestive comme *E. coli*, *E. cloacae*, *Klebsiella sp.* Des BGNnF (*A. baumannii* et *P. aeruginosa*) sont également fréquemment cités (**Boyce et al., 1997**).

Dans notre travail, le taux de contamination des différents types de linge est variable : il est de 45,83% (11/24) pour les blouses du personnel, 27,02% (10/37) pour les oreillers et 13,51% (5/35) pour les draps. Ces résultats se concordent avec ceux de **Gaillon et al., (1996)** qui ont rapporté que les oreillers sont parmi les pièces de literie les plus contaminées. Quant à la microflore trouvée dans notre étude, une diversité a été observée surtout pour les oreillers et les blouses, les espèces rencontrées sont : *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. sakazakii*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *S. plymuthica*, *P. penneri*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. maltophilia*, *B. cepacia* et *A. hydrophila*. La plupart de ces espèces ont été décrites dans la littérature (**Boyce et al., 1997**).

Nous avons isolé six souches de *P. aeruginosa* à partir de différents tissus hospitaliers : une souche à partir des draps, trois souches à partir des oreillers et deux souches à partir des blouses du personnel. Dans une étude marocaine (**Auajjar et al., 2006**), il a été démontré que la moyenne de durée de survie des souches de *Pseudomonas aeruginosa* est de  $53 \pm 23$  jours sur les blouses, et de  $141 \pm 19$  jours sur les draps. Cette survie prolongée sur les différents tissus hospitaliers et notamment les draps constitue un vrai péril infectieux intra-hospitalier. Ces différents tissus hospitaliers constituent un des vecteurs importants de transport des *Pseudomonas* aux patients hospitalisés, d'où la nécessité d'une application rigoureuse et efficace des procédures de désinfection de l'environnement hospitalier (**Auajjar et al., 2006**).

### c) Blouses du personnel soignant

Différents types de tenus de protection comme les blouses sont portés pour fournir une barrière de protection pour le personnel et réduire la transmission des pathogènes. Cependant, il est possible que tels vêtements pourraient être des sources des infections nosocomiales (**Orji et al., 2005**).

Dans le présent travail, le taux de contamination des blouses du personnel soignant était de 45,83% (11/24), ce résultat est proche de celui rapporté dans une étude faite sur les tenus de protection du personnel y compris les blouses, et qui était 42,22% (19/45) (**Orji et al., 2005**). Cependant les espèces des BGN isolés dans notre étude diffèrent de celles trouvées dans la même étude, sauf pour *P. aeruginosa*, présentant une fréquence d'isolement de 18,18% (2/11) supérieure à celle rapportée par **Orji et al., (2005)**, et qui était 15,79% (3/19). Nos résultats montrent que les blouses du personnel sont contaminées par différentes espèces de BGN dont certaines sont considérées comme des pathogènes opportunistes, c'est

le cas de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* et *P. penneri*. Bien que l'implication de ces blouses dans des cas de transmission d'infections n'a pas été étudiée dans notre travail, l'isolement de tels pathogènes est préoccupant pour une transmission nosocomiale possible.

En effet, les blouses sont un exemple des fomites (Nwankwo, 2012) dont Prescott *et al.*, (1999) ont noté qu'ils sont impliqués dans la transmission des pathogènes en milieu hospitalier.

Nos résultats montrent qu'il y a des mauvaises pratiques d'hygiène dans l'hôpital et que les blouses ne sont pas bien prises en charge en matière de propreté (Orji *et al.*, 2005). Souvent le personnel passe sans lavage de leurs mains après avoir touché un patient et retourne à leurs activités sans être conscient de la possibilité de diffuser des micro-organismes (Oliveira et Damasceno, 2010).

L'isolement des BGN pathogènes à partir des blouses suggère que ces dernières doivent être manipulées avec davantage d'attention sur une base régulière (Orji *et al.*, 2005). Enfin, les nouvelles recommandations préconisent l'usage d'un tablier plastique ou d'une surblouse imperméable à usage unique par les soignants lors de soins souillants ou mouillants, ou exposant aux projections de liquides biologiques (Merrer et Carbonne, 2010).

#### **d) Dispositifs médicaux**

L'introduction de dispositifs médicaux pour la gestion et le traitement des maladies a contribué au développement des infections nosocomiales dans le monde entier. L'introduction de ces dispositifs n'est pas mauvais en soi, mais le déficit de l'engagement du personnel de santé aux protocoles de prévention des infections a été important (Shiferaw *et al.*, 2013).

##### **➤ Stéthoscopes**

Les matériels médicaux utilisés dans le cadre de soins non critiques sont moins susceptibles d'avoir de protocoles standards de désinfection et de nettoyage que les équipements utilisés dans le cadre de soins intensifs. Ainsi, les équipements de soins médicaux sont plus susceptibles de porter un nombre considérable de micro-organismes pathogènes. La contamination des stéthoscopes en particulier le diaphragme, est rapportée principalement due au manque de désinfection régulière (avant et après l'examen de chaque patient). Une désinfection régulière des stéthoscopes n'est guère effectuée dans la plupart des

établissements de santé dans le monde. Au cours de l'auscultation, la contamination de stéthoscope est fréquente; si le même stéthoscope est utilisé pour le patient suivant sans désinfection, il peut amener un risque d'infection au patient et peut imposer continuellement le risque en série à tous les patients. Le temps de survie minimum de la plupart des micro-organismes pathogènes est d'environ 2-18 heures sur la surface du diaphragme des stéthoscopes et les cliniciens passent en moyenne moins de 15 minutes avec chaque patient, il est donc probable que le stéthoscope peut servir de véhicule pour la propagation de l'infection en série au patient en visite dans le milieu hospitalier (**Shiferaw et al., 2013**).

Dans notre travail, le taux de contamination des stéthoscopes a été relativement élevé (3/6 des prélèvements soit 50%). Ce taux pourrait être sous-estimé vu le nombre très réduit des prélèvements réalisés à partir des stéthoscopes (seulement 6 échantillons). Ce résultat est inférieur à celui rapporté dans une étude menée par **Shiferaw et al., (2013)** et qui était 85,8%. Les souches isolées dans notre travail appartiennent aux espèces : *Serratia odorifera* (So3), *Stenotrophomonas maltophilia* (St9) et *Bulkholderia cepacia* (Bc11). Toutes les souches ont été multi résistantes, et la souche So3 était productrice de BLSE. Ces espèces ne figurent pas dans la collection des souches isolées par **Shiferaw et al., (2013)** qui ont trouvé d'autres espèces de BGN : *Klebsiella spp.*, *Citrobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *P. aeruginosa* et *E. coli*. Ils ont rapporté un taux de contamination élevé (90,9%) pour les stéthoscopes qui ne sont jamais désinfectés, et un taux moindre pour ceux désinfectés une semaine ou moins avant l'enquête réalisée. Ils ont également rapporté que la plupart du personnel soignant n'a aucune impression sur la désinfection des stéthoscopes.

L'étude réalisée par **Shiferaw et al., (2013)** a suggéré que les stéthoscopes constituent un véhicule potentiel dans la transmission des infections entre les patients et le personnel de santé. De ce fait, le diaphragme des stéthoscopes doit être désinfecté avant et après chaque contact avec les patients. L'utilisation de d'alcool propylique à 70% a été trouvée pour être efficace dans la réduction de la contamination des stéthoscopes et autres équipements médicaux que les autres agents comme les détergents (**Shiferaw et al., 2013**).

### ➤ Cathéters

Sur le plan physiopathologique, il existe deux voies préférentielles d'infection du cathéter : la voie endoluminale et la voie extraluminaire. La contamination extraluminaire est rapportée comme la principale voie d'infection du cathéter. Cette contamination à partir du point

d'entrée cutané du cathéter survient lors de la pose, plus rarement par migration secondaire des germes le long du trajet sous-cutané du cathéter (**Kallel et al., 2005**).

Dans une étude française, il a été rapporté que les bactéries à Gram négatif et notamment les *Pseudomonas* représentent la troisième cause des infections liées aux cathéters (**Timsit, 2005**). De même, une étude tunisienne a rapporté que les germes responsables d'infection et de colonisation des cathéters étaient majoritairement des bacilles à Gram négatif (**Kallel et al., 2005**).

Quant aux résultats de notre travail, les cathéters ont été contaminés par différentes espèces de BGN : deux souches de *Burkholderia cepacia* (Bc2 et Bc6) et une souche d'*E.coli* (Ec1) et une souche de *Pasteurella pneumotropicana* (Pn2). Pn2 et Bc6 ont été isolées du même cathéter dans une unité de soins intensifs. Il faut signaler que les souches Bc2, Bc6 et Pn2 ont été multi résistantes.

#### ➤ **Sondes urinaires**

L'infection urinaire nosocomiale (IUN) reste la plus fréquente des infections nosocomiales. Elle est dans la grande majorité des cas, liée à l'introduction d'un cathéter dans la vessie. En effet, il est estimé que 80 % des IUN sont liées à la présence d'une sonde vésicale à demeure.

Comme pour le cathétérisme vasculaire, deux voies de colonisation sont décrites : extraluminaire et intraluminaire. La voie intraluminaire était autrefois, la voie prédominante. De nos jours, la voie extraluminaire est prédominante estimée à 75 % des cas. Cette voie semble plus importante chez la femme que chez l'homme (**Berthelot et al., 2003**).

Le sondage à demeure est un facteur de risque majeur d'IUN. La mise en place d'une sonde urinaire perturbe les défenses de l'hôte contre les micro-organismes et rend l'infection ainsi possible. L'espace entre la face externe de la sonde et la muqueuse urétrale est un lieu d'interactions, constituant une porte d'entrée pour les micro-organismes. Du biofilm recouvre et fixe la bactérie entre la muqueuse et le cathéter, dès les six premières heures de sondage. Ce biofilm est produit par les bactéries sur une matrice protéique de l'hôte. Composé majoritairement de glycocalyx, il leur permet de faire face aux défenses mécaniques et biochimiques de l'hôte et de résister à l'antibiothérapie. Il peut se développer à la surface de la plupart des matériaux disponibles aujourd'hui et il forme un réservoir de bactéries qui entretient l'infection (**Léone et al., 2000; Pavese, 2003**). Ainsi, en présence d'un matériel

étranger, l'épithélium vésical favorise l'adhésion et la remontée des bacilles à Gram négatif dans la vessie (**Berthelot et al., 2003**).

Dans la présente étude, 9 souches appartenant aux entérobactéries, ont été isolées des sondes urinaires : 4 *S. marcescens*, 2 *K. pneumoniae*, 1 *E.coli*, 1 *S. odorifera* et 1 *C. freundii*. Ces espèces ont été rapportées parmi les bactéries responsables des IUN (**Léone et al., 2000**). On distingue parmi ces espèces, des bactéries endogènes dont : *E. coli* et *Klebsiella*, et des bactéries d'origine exogène, par manuportage à partir d'un autre patient ou d'un foyer de l'environnement où certains germes spécifiques de l'environnement peuvent être incriminés comme *Serratia marcescens* (**Boulard et al., 1992**).

Toutes ces souches ont été multi résistantes aux antibiotiques, à savoir à 6, 10, 12, 13, 15 ou 16 antibiotiques parmi les 20 antibiotiques testés. Il a été rapporté que les germes responsables des INU sont très souvent multirésistants (**Pavese, 2003**). En plus, les 2/3 de nos souches ont été identifiées comme productrices de BLSE. Toutes les souches ont été résistantes à COT sauf Sm46, cependant la totalité des souches restent sensibles à l'imipénème, alors que les autres  $\beta$ -lactamines se sont montrées inactives. En ce qui concerne les aminosides, l'amikacine s'est montré le plus efficace (active sur 8 souches). Quant aux souches productrices de BLSE, des phénotypes de résistance aux aminosides ont été notés : GM<sup>I</sup> AK<sup>S</sup> TOB<sup>R</sup>, GM<sup>R</sup> AK<sup>S</sup> TOB<sup>R</sup>, GM<sup>R</sup> AK<sup>R</sup> TOB<sup>I</sup>. Les mécanismes pouvant être responsables de ces phénotypes sont enzymatiques via les acétyltransférases AAC(3)-II ou AAC (6'). Conformément à la littérature (**Fauchère, 1997**), ces mécanismes sont très fréquemment associés à une BLSE.

Dans cette petite collection des souches, la souche So2 (résistante à 16 antibiotiques) mérite une attention particulière, il s'agit d'une souche résistante extensive (XDR) car elle est non sensible à un agent parmi toutes, sauf deux catégories à tester (IPM et fluoroquinolones) (**Boutoille, 2012**). Cette souche a été isolée à partir de la sonde urinaire d'une patiente souffrant de fistule digestive, qui a été soumise à une antibiothérapie par la gentamicine et la cefacidal (cefazoline), la durée de sondage était de 8 jours (jusqu' au jour de prélèvement). La souche Ec3 (résistante à 6 ATB) a été isolée chez un patient non soumis à une antibiothérapie et dont la durée de sondage a été courte (48heures). Un cas très particulier doit être signalé, c'est le cas d'une patiente brûlée âgée de 60 ans, sondée pendant 1 mois, dont la culture à partir de sa sonde a été polymicrobienne (Sm21, Sm22 et Kpp18 résistantes à 12 ATB et Sm23 résistante à 13 ATB). Ces dernières souches ont été toutes résistantes à : COT, TOB et

GM; trois souches ont été résistantes à CIP et une souche a été résistante à FOS. La culture à partir d'une sonde d'un autre patient brûlé, sondé pendant une semaine et soumis à une antibiothérapie par la gentamicine, a également donné deux souches différentes : Cf3 résistante à 15 ATB et Kpp17 résistante à 12 ATB.

En analysant ces données relatives aux patients sondés, on a pu constater que la colonisation des sondes urinaires par ces souches multi résistantes, surtout celles productrices de BLSE confirmerait la survenue d'une INU possible, surtout que ces patients présentent certains facteurs de risque de ce type d'infections nosocomiales, comme : la durée de sondage plus de 6 jours, le sexe féminin, la mise en place de cathéter en dehors du bloc opératoire, l'utilisation d'antibiotiques (**Berthelot et al., 2003**), l'âge et la sévérité de la pathologie sous-jacente. Cependant, la durée de sondage reste le facteur de risque principal : chaque jour de sondage multiplie le risque de développer une infection urinaire sur sonde. Par ailleurs, la gravité des infections urinaires nosocomiales est liée au développement de résistance des bactéries à de nombreux antibiotiques (**Léone et al., 2000**).

Parmi les mesures de prévention prouvant leur efficacité : les manœuvres aseptiques lors de la pose de la sonde urinaire. Ce sont le lavage des mains, l'utilisation d'antiseptiques, de gants stériles, de matériel stérile, de la pose de la sonde au bloc (asepsie, champs, habillage chirurgical). En plus de ces recommandations, minimiser le risque de traumatisme lors de la pose de la sonde vésicale joue un rôle important afin de diminuer le risque de prolifération bactérienne notamment en présence de sang, ceci est possible grâce au développement de cathéters fins, lubrifiés, déformables pour épouser au mieux l'anatomie de l'urètre (**Berthelot et al., 2003**). Donc, la maîtrise de la technique du sondage urinaire est indispensable pour prévenir les IUN.

### ➤ Respirateurs

Nous avons isolé 09 souches à partir des respirateurs : une souche de *K. pneumoniae*, une souche de *S. ficaria*, et deux souches de chacune des espèces *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* et *B. cepacia*, et enfin une souche d'*A. hydrophila*. Les quatre premières espèces ont été rapportées comme responsables des pneumonies nosocomiales acquises sous la ventilation mécanique, dont près de 60 % de ces infections sont dues à des bactéries aérobies à Gram négatif (**Boyadjiev et al., 2006**). Parmi les neuf souches isolées, 5 ont été multirésistantes : Kpo2 isolée du bloc opératoire, résistante à 11 ATB et productrice de BLSE, Bc1 isolée du

service de déchoquage et Bc9 isolée du service de Médecine femme, résistantes à 8 ATB parmi 12 ATB, St10 isolée du service de pneumo-phtisiologie résistante à 6 ATB. La souche qui nous a attiré l'attention est la souche Sf6 isolée du service de Médecine femme, elle est résistante à 16 ATB et exprimant un phénotype BLSE associée à une céphalosporinase à haut niveau. Elle n'était sensible qu'à AK, F et CIP.

La présence des bactéries multi résistantes présente un grand risque d'acquisition par un patient immunodéprimé, donc les respirateurs doivent régulièrement être désinfecté avant et après chaque utilisation pour prévenir la transmission d'un patient à un autre ou de l'environnement au patient.

### e) Antiseptiques et désinfectants

Dans notre travail, quatre souches de *Serratia* ont été isolées des solutions antiseptiques et désinfectants : une souche de *S. marcescens* dans un flacon de savon liquide, une souche de *S. liquefacines* et deux souches de *S. plymuthica* dans de l'alcool. Il a été rapporté que les *Serratia* peuvent survivre des mois dans l'eau distillée et se multiplier dans des solutions antiseptiques (Flandrois, 1997). En plus du genre *Serratia*, des BGNnF ont également été isolés : trois souches de *P. aeruginosa* (une souche dans l'alcool et deux souches dans la Bétadine), une souche de *S. maltophilia* dans la Bétadine et une souche de *B. cepacia* dans du savon liquide. La contamination des produits antiseptiques ou désinfectants, par des BGNnF a été rapportée dans la littérature (Berthelot *et al.*, 2005).

### f) Eau

L'eau peut jouer le rôle de transmetteur par aérosolisation à partir des siphons et des robinets (Hajjar *et al.*, 2000). En effet, un robinet ouvert projette des particules d'eau jusqu'à une distance de 1 mètre. Ces particules peuvent contenir des BGN et peuvent contaminer le matériel d'hygiène individuelle (Figarella *et al.*, 2007). Dans notre travail, le taux de contamination d'eau a été 30% (6/20 prélèvements). On a isolé 7 souches : 4 souches d'*A. hydrophila*, une souche de *K. oxytoca*, une souche de *K. rhinoscleromatis* et une souche d'*E. sakazakii*. En ce qui concerne *A. hydrophila*, il s'agit d'une bactérie d'origine hydrique, mais sa présence dans l'eau de robinet constitue un risque sanitaire, car cette bactérie peut être responsable de divers types d'infections intestinales et extra-intestinales, décrites précédemment, surtout lorsque les personnes sont immunodéprimées. Quant aux autres espèces, il s'agit des bactéries d'origine fécale dont la présence dans l'eau indique une contamination fécale. Bien que le nombre des



prélèvements réalisés à partir de différents points d'eau est faible (20), on pourrait dire que l'eau de robinet dans ces établissements est de qualité microbiologique insatisfaisante, posant un risque sanitaire aux malades et même au personnel, lié à sa consommation ou au simple contact, comme c'est le cas pour *A. hydrophila*.

**g) Air**

Les résultats de notre travail ont permis de constater une aéro-biocontamination dans des services où l'air doit être contrôlé, il s'agit du bloc opératoire, de la réanimation, et la néonatalogie. Les microorganismes aéroportés peuvent être transmis aux patients par inhalation ou par sédimentation sur les plaies (Chefson-Girault et Gotty, 2008). La contamination de l'air a été rapportée, mais l'échange entre l'air contaminé et des surfaces n'est pas bien défini (Otter *et al.*, 2011).

**2.6. Répartition des souches par catégories de sites**

D'après la définition de l'environnement hospitalier précédemment décrite dans la partie bibliographique, les surfaces incluent les sols, les murs, le mobilier et l'équipement. Donc la répartition des souches de BGN isolées selon les sites de prélèvements a été réorganisée dans le tableau 28.

**Tableau 28 : Distribution des différents groupes de BGN selon les sites de prélèvements**

<b>Catégories de sites</b>	<b>Entérobactéries</b>	<b>BGNnF</b>	<b>Autres BGN</b>	<b>Total</b>
<b>Surfaces</b>	<b>162</b>	<b>31</b>	<b>11</b>	<b>204</b>
<b>Dispositifs médicaux</b>	<b>18</b>	<b>11</b>	<b>02</b>	<b>31</b>
<b>Linge</b>	<b>20</b>	<b>09</b>	<b>01</b>	<b>30</b>
<b>Solutions antiseptiques</b>	<b>04</b>	<b>05</b>	<b>00</b>	<b>09</b>
<b>Air</b>	<b>21</b>	<b>04</b>	<b>00</b>	<b>25</b>
<b>Eau</b>	<b>03</b>	<b>00</b>	<b>04</b>	<b>07</b>
<b>Total</b>	<b>228</b>	<b>60</b>	<b>18</b>	<b>306</b>

L'analyse de la variance à un critère (AVI) a montré qu'il n'existe pas de différences significatives entre les différentes catégories de sites ( $P = 0,226$ ).

Par ailleurs, les taux de contamination des différentes catégories de sites, par les BGN ont été très proches (Tableau 29), ils étaient compris entre 24,32% et 38,46%.

Tableau 29 : Taux de contamination des différentes catégories de sites

Catégories de site	Nbre p (+)	Nbre p (-)	Nbre p totaux	Taux de contamination (%)
Surfaces	169	366	535	31,59
Dispositifs médicaux	26	58	84	30,59
Linge	26	72	98	26,53
Solutions	09	28	37	24,32
Air	25	40	65	38,46
Eau	06	14	20	30

Nbre : nombre ; p : prélèvements

La distribution des différents groupes de BGN dans les différentes catégories de sites (Figure 18) montre que les entérobactéries constituent le groupe le plus représenté parmi les trois groupes de BGN. En ce qui concerne les BGNnF, nos résultats se concordent avec la littérature (Berthelot *et al.*, 2005), ils ont été attribués à différents réservoirs en milieu hospitalier comme les solutions contaminées : des produits antiseptiques (Bétadine et alcool) et des désinfectants (savon liquide), du matériel insuffisamment désinfecté ou insuffisamment séché (respirateurs, cathéters, stéthoscopes, thermomètres), et des surfaces humides (lavabos, radiateurs, toilettes, siphons, robinets), fournissant des conditions humides favorables à ces BGN.

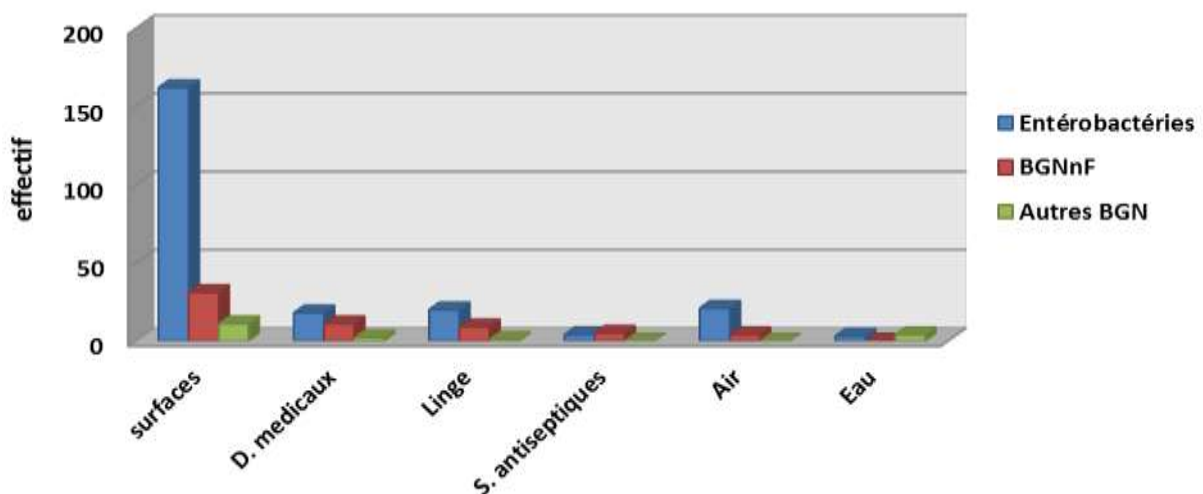


Figure 18 : Répartition des différents groupes de BGN selon les différentes catégories de sites environnementaux

## **2.7. Relation entre la qualité du nettoyage ou de désinfection des services, la contamination bactérienne environnementale et les infections nosocomiales**

Le rôle de la désinfection des surfaces pour le contrôle des pathogènes nosocomiaux a été une question controversée depuis un certain temps. Le traitement systématique des sols propres avec divers types de désinfectants de surfaces a été décrit n'ayant aucun impact significatif sur l'incidence des infections nosocomiales (**Kramer *et al.*, 2006**).

Le nettoyage et la désinfection n'éradiquent pas toujours les agents pathogènes des surfaces. Une contamination a été identifiée sur des surfaces apparemment propres pendant des épidémies dues à *A. baumannii*. La constatation fréquente de contamination dans les chambres vides et dans les chambres occupées par des patients non affectés suggère une contamination résiduelle par des occupants précédents. Cependant, la rigueur de nettoyage et de désinfection n'a pas été évaluée dans ces études, ce qui signifie qu'il est difficile de déterminer si les produits, les procédures, ou une combinaison des deux qui est responsable de l'échec de l'éradication de pathogènes des surfaces (**Otter *et al.*, 2011**).

Les services des établissements hospitaliers dans notre étude sont soumis à un régime régulier de nettoyage-désinfection au moins deux fois par jour : le matin et après la visite. Plusieurs solutions désinfectantes sont utilisées. Les chambres et les surfaces sont nettoyées avec un désinfectant (SURFA'SAFE) contenant le chlorure de didécyldiméthylammonium et le chlorhydrate de polyhexaméthylène biguanide. Ce désinfectant est bactéricide et actif sur une large gamme de microorganismes : MRSA, *Mycobacterium tuberculosis*, les levures, les champignons et les virus (Rotavirus, HIV, ...) nécessitant un temps de contact de 1 à 20 minutes à 20°C. Pour la désinfection des équipements et du matériel médical, un désinfectant à base d'ammonium quaternaire est utilisé. Ce désinfectant est très actif après un temps de contact entre 5 et 15 minutes.

Compte tenu d'une part de la relation qui existe entre les infections nosocomiales et la sécurité des patients au sein du système de soins de santé et d'autre part du rôle important que joue le nettoyage méticuleux de l'environnement dans la réduction du risque de transmission de ces infections, les normes d'Accréditation Canada accordent une place importante au respect de bonnes pratiques de nettoyage. En effet, le recours à des pratiques, à des listes de contrôle et à des méthodes de vérification élaborées avec soin visant l'amélioration continue de la

qualité contribue grandement à diminuer le risque de transmission des infections nosocomiales dans les établissements hospitaliers (Zoutman, 2013).

### 3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

#### 3.1. Entérobactéries

Les résultats du test de sensibilité des entérobactéries isolées aux 20 antibiotiques choisis sont résumés dans le tableau 30, et présentés dans la figure 19.

**Tableau 30: Pourcentage de sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries isolées**

Antibiotique	R		I		S	
	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%
AMX	227	99,56	0	0	1	0,44
KF	219	96,05	0	0	9	3,95
FOX	112	49,12	48	21,05	68	29,83
CTX	164	71,93	43	18,86	21	9,21
CAZ	208	91,23	5	2,19	15	6,58
AMC	186	81,58	29	12,72	13	5,7
TIC	205	89,91	4	1,76	19	8,33
ATM	211	92,54	7	3,07	10	4,39
IPM	14	6,14	7	3,07	207	90,79
GN	44	19,3	8	3,51	176	77,19
AK	26	11,4	7	3,07	195	85,53
TOB	57	25	24	10,53	147	64,47
F	18	7,89	0	0	210	92,11
FOS	94	41,23	0	0	134	58,77
C	77	33,77	45	19,74	106	46,49
NA	87	38,16	62	27,19	79	34,65
OFX	37	16,23	9	3,95	182	79,82
CIP	17	7,46	21	9,21	190	83,33
COT	69	30,26	7	3,07	152	66,67
TE	99	43,42	12	5,26	117	51,32

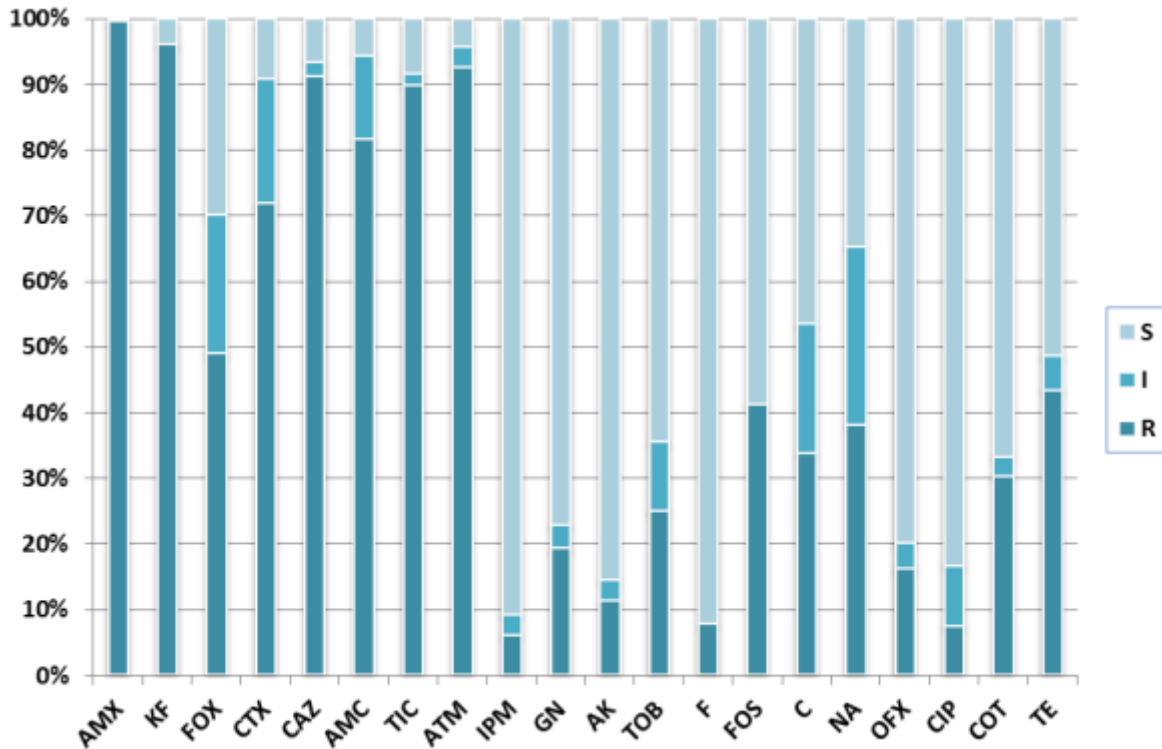


Figure 19 : Sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries isolées

Au vu des résultats obtenus, nous avons constaté que les antibiotypes ont montré une grande hétérogénéité des souches. Généralement, les entérobactéries isolées ont exprimé une résistance à tous les antibiotiques des différentes familles, mais à des degrés variables. Les taux de résistance les plus élevés ont été marqués à l'égard des différentes  $\beta$ -lactamines (AMX, C1G, monobactames, C3G, carbénicilines, l'association AMX- acide clavulanique). Quant aux C2G, nous avons remarqué que FOX reste relativement efficace avec tout de même un taux de résistance de 49,12%. Toutes les souches sont résistantes à l'AMX sauf la souche d'*Ewingella americana*. En revanche, le taux de résistance le plus faible a été observé pour l'imipénème (6,14%). Pour les aminosides, l'amikacine s'est montré le plus efficace avec un taux de sensibilité de 85,53%, suivie de la gentamicine (77,19%). Concernant les fluoroquinolones, une activité a été maintenue sur 83,33% des souches pour CIP et 79,82% pour OFX.

Nos résultats diffèrent de ceux rapportés dans une étude iranienne (**Jalalpoor, 2011**) où les taux de sensibilité ont été très élevés surtout au CTX qui était actif à 74,5% contre 9,22% dans notre étude. De même, les taux de sensibilité à TE (64,25%), au COT (77,75%) et à GM

(94%) rapportés par **Jalalpoor**, sont supérieurs à ceux trouvés dans notre étude (51,32%, 66,67% et 77,19%).

### **3.1.1. *Klebsiella pneumoniae***

*K. pneumoniae* est une entérobactérie dotée d'une grande importance dans l'hospitalisme infectieux (**Abid et al., 2007**). Toutes nos souches de Kp sont résistantes à AMX, ce résultat est similaire à celui rapporté par **Abid et al., (2007)**. Cependant, nos souches ont montré des taux de résistance supérieurs à ceux rapportés par **Abid et al., (2007)**, en ce qui concerne les antibiotiques : AMC (87,18% contre 52,4%), CTX (79,49% contre 37%), IPM (7,69% contre 4%), C (35,90% contre 26,9%) et COT (38,46% contre 30%). Toutefois, **Abid et al., (2007)** ont rapporté des taux de résistance plus importants pour d'autres antibiotiques : GM (50,7% contre 28,21% dans notre cas), AK (35,7% contre 10,26%), FOX (19,4% contre 12,82%) et F (31,1% contre seulement 2,56%).

Concernant la même espèce, **Jalalpoor (2011)** a rapporté des taux de sensibilité qui dépassent largement ceux trouvés dans notre travail : CTX (71% contre seulement 5,13% dans notre cas), GM et COT (100% contre 69,23% et 51,28%), TE (66% contre 41,03%).

### **3.1.2. *Escherichia coli***

Dans son étude, **Jalalpoor (2011)** a rapporté des taux de sensibilité à certains antibiotiques supérieurs à ceux trouvés dans notre étude : GM (88% contre 80% dans notre cas), CTX (78% contre 60%), COT (55,5% contre 40%). Cependant, le taux de sensibilité à TE dans notre travail (80%) dépasse celui rapporté par **Jalalpoor (2011)** (62,5%).

Nos souches d'*E. coli* se sont également montrées plus sensibles en comparaison avec les souches isolées dans une étude nigérienne (**Nwankwo, 2012**) qui a rapporté des taux de sensibilité moindres aux antibiotiques : OFX (75% contre 100% dans notre étude), TE et COT (aucune souche sensible contre 80% et 40%), GM (33,33% contre 80%), CIP (41,6% contre 80%). Concernant l'AMC et CAZ, ils étaient plus efficaces sur la collection de **Nwankwo (2012)** que sur la nôtre avec respectivement 41,6% contre 20% dans notre étude et 50% contre 40%.

### **3.1.3. *Ewingella americana***

La sensibilité in vitro d'*E. americana* démontre une multitude de sensibilité naturelle à la plupart des antibiotiques y compris les carbapénèmes, les aminosides, les fluoroquinolones, les tétracyclines, la triméthoprime/ sulfaméthoxazole, l'aztréonam, le chloramphénicol et certaines céphalosporines (y compris céfépime, céfotaxime et céfoxitine) (**Stock et al., 2003**). En effet, notre souche d'*E. americana* a été sensible à la plupart des antibiotiques utilisés, néanmoins, elle a été résistante à cinq antibiotiques de différentes familles : ATM, CAZ, FOX, F, C et intermédiaire à NA et CTX. De ce fait, on l'a considéré comme multi résistante.

L'antibiotype de notre souche est comparable à celui décrit par **Pound et al., (2007)** où la souche a également été résistante à l'ATM et FOX, et intermédiaire à CTX. A notre connaissance, notre souche est la première à montrer une résistance aux antibiotiques : CAZ, C et F.

Un cas clinique dû à une souche d'*E. americana* multirésistante a été rapporté, il s'agit d'une aggravation de la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) (**Pound et al., 2007**). Dans une autre étude (**Stock et al., 2003**), il a été démontré que le mécanisme de résistance pour *E. americana* semble être lié à l'expression de  $\beta$ -lactamase, en particulier la production d'une  $\beta$ -lactamase de type AmpC.

### **3.1.4. *Cedecea neteri***

La rareté de l'isolement des souches de *Cedecea neteri* ne permet pas d'établir un profil caractéristique de sensibilité aux antibiotiques. La plupart des souches sont résistantes à l'ampicilline et à la céfalotine. La sensibilité aux C2G, C3G, aminosides, cyclines, triméthoprime-sulfaméthoxazole est variable (**Delmas, 2003**).

Notre souche est résistante à AMX et KF, mais sensible aux aminosides et au chloramphénicol. Ce résultat est similaire à celui trouvé par **Farmer et al., (1982)** sauf que notre souche est, en plus, résistante à TE. Ainsi, la souche isolée dans notre travail s'est montrée résistante à AMC et CAZ, ce résultat est comparable à celui rapporté par **Aguilera et al., (1995)**, seulement que la souche trouvée dans cette dernière étude a en plus exprimé une résistance aux aminosides.

### 3.2. Bacilles Gram négatifs non fermentaires

#### 3.2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste pour l'Homme conduisant à un large éventail de maladies comme les infections urinaires, les infections des brûlés, les infections respiratoires, et les septicémies. C'est la première cause des pneumonies associées à la ventilation, dans les unités de soins intensifs. Au cours des dernières années, les infections nosocomiales causées par *P. aeruginosa* ont été reconnues comme un problème sérieux dans les hôpitaux en raison de sa résistance intrinsèque à de nombreuses classes d'antibiotiques et sa capacité à acquérir une résistance pratique à tous les antibiotiques efficaces. D'autre part, la propagation de ces bactéries dans le personnel hospitalier et les endroits humides, pourrait être un réservoir de gènes de résistance. C'est pourquoi il est nécessaire d'évaluer la contribution de l'équipement et du personnel hospitalier dans la voie de diffusion de gènes de résistance. Actuellement, les techniques génétiques soutenues par des tests phénotypiques nous permettent d'être informés sur les caractéristiques détaillées des souches cliniques et environnementales (**Fazeli et al., 2012**).

*P. aeruginosa* occupe une place prépondérante dans les infections nosocomiales en milieu de réanimation. Cette bactérie acquiert des résistances le plus souvent par synthèse enzymatique. Les difficultés thérapeutiques qu'elle engendre conduisent à augmenter la prescription d'antibiotiques stables à l'hydrolyse. La conséquence en est une modification de l'écologie bactérienne des services au profit de souches multi résistantes. L'imipénème pourrait constituer une alternative thérapeutique en raison de sa stabilité aux bêta-lactamases à spectre élargi ou aux céphalosporinases chromosomiques. Cependant de nombreux auteurs rapportent des échecs thérapeutiques par sélection de mutants résistants (**Bercault et al., 1994**).

Les résultats du test de sensibilité aux antibiotiques (Figure 20) ont montré que toutes les souches de *P. aeruginosa* sont résistantes à trois antibiotiques : ATM, CPO et TIC. Dans une étude algérienne, portant sur des BGNnF (**Liaïd, 2012**), la ticarcilline était inactive sur 60% des souches de *P. aeruginosa*. Par ailleurs, nos souches ont également montré des taux de résistance élevés à d'autres antibiotiques. Un taux de résistance de 88,57% à PIP, qui dépasse largement celui rapporté par **Fazeli et al., (2012)** qui était 26,80%. Un taux de 80% à CAZ, qui est inférieur à celui trouvé par **Fazeli et al., (2012)** (90,2%), alors qu'il est largement



supérieur à celui rapporté par **Liaزيد (2012)** qui était (7,14%). Des taux de résistance moindres ont cependant été marqués à l'égard d'autres antibiotiques : 57,14% à FOS, 25,71% à GM, proche de celui rapporté par **Fazeli et al., (2012)** (26,8%) mais supérieur à celui rapporté par **Liaزيد (2012)** (7,14%), 17,14% à IPM supérieur à celui trouvé par **Liaزيد (2012)** (3,57%), 17,14% à CSD inférieur à celui rapporté par **Liaزيد (2012)** (25%), 14,29% à TOB, 8,57% à FEP inférieur au taux rapporté par **Liaزيد (2012)** (32,14%). La ciprofloxacine s'est montrée très active, dont seulement 2,86% des souches ont été résistantes à cet antibiotique, ce résultat est inférieur à celui rapporté par **Fazeli et al., (2012)** (9,7%), ainsi qu'à celui rapporté par **Liaزيد (2012)** (10%). Il faut noter que la totalité des souches était sensible à l'amikacine, tandis que les souches de **Fazeli et al., (2012)** ont été résistantes à 9,7%.

Nous avons également constaté que les souches de *P. aeruginosa* ont montré des taux de sensibilité élevés à savoir: 74,29% pour GM et 97,14% pour CIP en comparaison à des taux de 35,7% et 21,4% rapportés dans une étude nigérienne (**Nwankwo, 2012**). Néanmoins, CAZ apparaît moins efficace sur nos souches, avec un taux de sensibilité de 20% contre 57,1% dans l'autre étude.

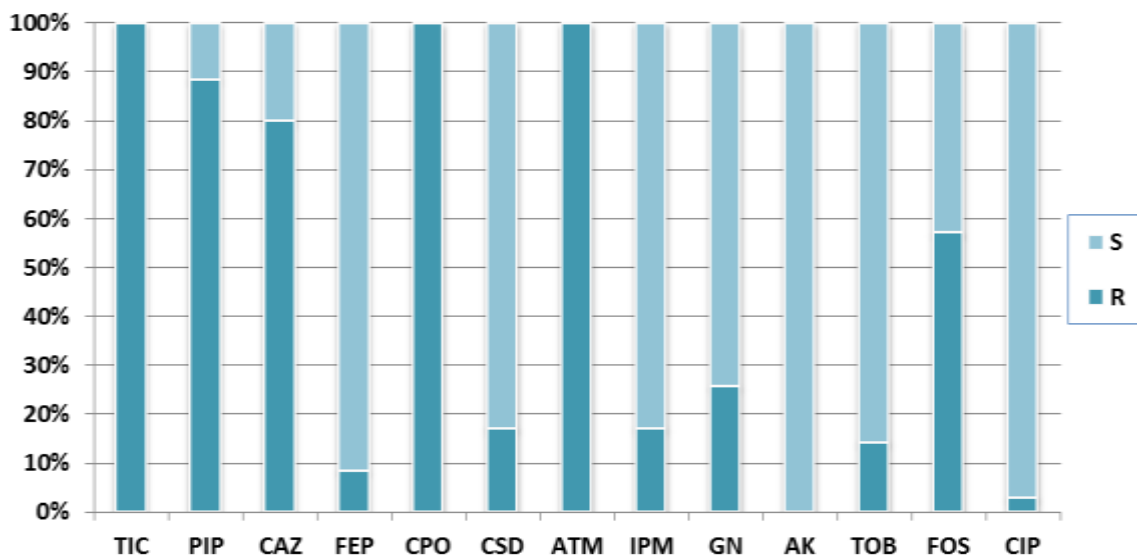


Figure 20 : Sensibilité aux antibiotiques des souches de *P. aeruginosa*

L'analyse des résultats obtenus nous a permis de constater que parmi les céphalosporines de troisième génération utilisées, FEP et CSD se sont montrés les plus actifs. Concernant les aminosides, l'amikacine est le plus efficace, tandis que **Liaزيد (2012)** a trouvé qu'en plus de l'AK, la TOB a également été efficace. En revanche, les souches de *P. aeruginosa* ont montré

une sensibilité élevée à la plupart des antibiotiques, cependant, elles ont présenté une résistance importante à certains antibiotiques comme TIC, ATM et CAZ. En effet, **Ruiz et al., (2004)** ont rapporté que les isolats cliniques étaient plus résistants aux antibiotiques que les isolats environnementaux; ceci peut être dû au fait que les souches cliniques ont été soumises à l'action sélective d'antibiotiques.

La résistance à la ticarcilline est due probablement à un mécanisme non enzymatique, elle est liée à l'association d'une faible perméabilité de la membrane externe de *P. aeruginosa* associée à une hyper expression du phénomène d'efflux. Elle confère souvent un faible niveau de résistance aux  $\beta$ -lactamines anti-*Pseudomonas* autre l'imipénème. Elle touche essentiellement la ticarcilline puis l'aztréonam (**Cavallo et al., 1998**). Quant à la résistance à l'imipénème, elle est souvent liée à une perte de la porine D2 (OprD) et couplée à une faible hydrolyse par la céphalosporinase périplasmique (**Bricha et al., 2009**).

En résumé, les antibiotiques les plus actifs sur nos souches de *P. aeruginosa* sont par ordre décroissant : AK (active à 100%), CIP (97,14%), FEP (91,43%), TOB (85,71%), CSD et IPM (82,86%) et enfin GM (74,29%).

### a) Phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines des souches de *P. aeruginosa*

La répartition des phénotypes de résistance vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines (Figure 21) a révélé la prédominance des mécanismes enzymatiques (88,57%), représentés par : l'hyperproduction de céphalosporinase (Case HN) (57,14%), pénicillinase à haut niveau (Pase HN) associée à une imperméabilité (Imp) (14,29%), imipénèmase (IPMase) (17,14%). Le reste est représenté par le phénotype de résistance par imperméabilité (11,43%). Ces résultats diffèrent de ceux rapportés par **Liazid (2012)**, dont d'autres mécanismes ont été décrits : le mécanisme d'efflux (50%) et l'hyperproduction de céphalosporinase associée à une perte de porine OprD2 (3,57%), le reste étant représenté par le phénotype sauvage (46,42%).

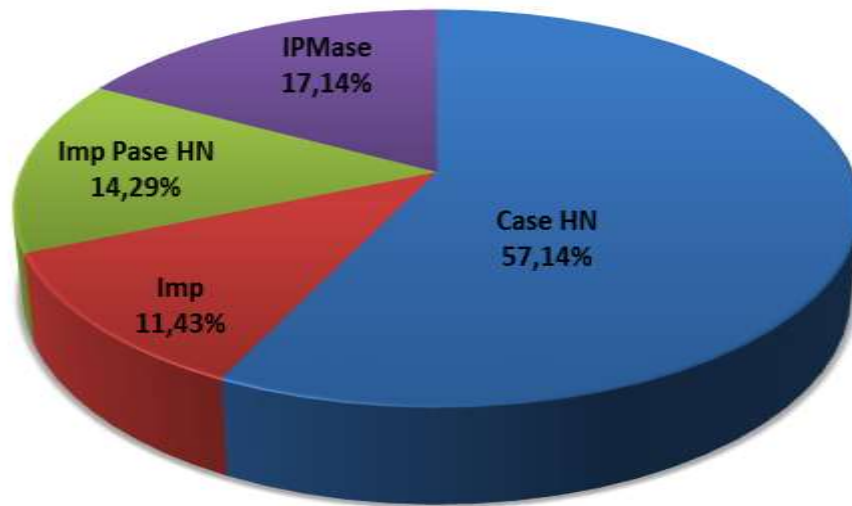


Figure 21 : Répartition des phénotypes de résistance aux β-lactamines de *P. aeruginosa*

**b) Résistance aux aminosides des souches des souches de *P. aeruginosa***

La plupart des souches (26/35 soit 74,28%) expriment un phénotype sauvage (sensibles à GM, AK et TOB). Le reste des souches expriment deux phénotypes de résistance : GM<sup>R</sup> et GM<sup>R</sup>- TOB<sup>R</sup> (Tableau 31), dont les mécanismes de résistance suspects sont à déterminisme enzymatique et de support plasmidique: aminosides acétyl transférase (AAC), aminosides nucléotidyl transférase (ANT) (Fauchère, 1997).

**Tableau 31 : Phénotypes de résistance aux aminosides de *P. aeruginosa***

Nombre de souches	Gentamicine	Tobramicine	Amikacine	Mécanisme de résistance suspect
04	R	S	S	AAC(3)-I
05	R	R	S	AAC(3)-III ou AAC(3)-IV.V ou AAC(6')-II ou ANT(2")

**3.2.2. *Acinetobacter baumannii***

Les espèces d'*Acinetobacter* jouent un rôle important dans la colonisation et l'infection des patients hospitalisés. Elles ont été impliquées dans une variété d'infections nosocomiales, y compris les bactériémies, les infections urinaires et les méningites secondaires. Le rôle principal en tant qu'agent de la pneumonie nosocomiale, en particulier la pneumonie associée à la ventilation, a été limité aux unités de soins intensifs. En général, le traitement des

infections à *Acinetobacter sp.* est souvent extrêmement difficile en raison de la résistance étendue aux principaux groupes d'antibiotiques de ces espèces (**Constantiniu et al., 2004**).

La grande diversité des plasmides confèrent à cette bactérie un grand potentiel d'acquisition des résistances. Aussi, l'utilisation croissante d'antibiotiques à large spectre sélectionne les souches multirésistantes (**Chastre, 2003**). C'est une espèce qui dispose d'un arsenal enzymatique extrêmement vaste et divers pour contrecarrer l'action des antibiotiques (**Mansour et al., 2008**), elle possède des mécanismes de résistances naturelles aux  $\beta$ -lactamines, correspondant principalement à la production d'une céphalosporinase (ou  $\beta$ -lactamase de type AmpC) chromosomique.

Les résultats de l'antibiogramme (Figure 22) ont montré que parmi douze antibiotiques testés, trois (IPM, TOB et CIP) ont conservé une bonne activité sur toutes les souches d'*A. baumannii*. Cependant, **Liaqid (2012)** a trouvé des résultats complètement différents, où les taux de résistance à l'égard de : IPM, TOB et CIP, ont été respectivement : 80%, 5,71% et 97,14%. Généralement, les taux de résistance rapportés par **Liaqid (2012)** sont plus élevés que ceux de notre étude : AK (82,85% contre 33,33%), GM (74,28% contre 66,67%), sauf pour CAZ qui était inactive sur la totalité des souches dans les deux études. Ainsi, dans une étude roumaine (**Constantiniu et al., 2004**), les taux de résistance à IPM et CIP ont été respectivement 8,3% et 16,6%, alors que pour la ceftazidime, un taux inférieur à celui de notre étude a été rapporté (75%).

Par ailleurs, les souches de notre collection ont montré un taux de résistance de 66,67% vis-à-vis des antibiotiques : COT et TE, tandis qu'un taux moindre (33,33%) a été montré à l'égard des antibiotiques PIP et OFX. En plus, une résistance accrue (100%) a été marquée vis-à-vis des antibiotiques TIC et C, alors que **Constantiniu et al., (2004)** ont rapporté un taux de résistance au chloramphénicol plus faible (58,3%).

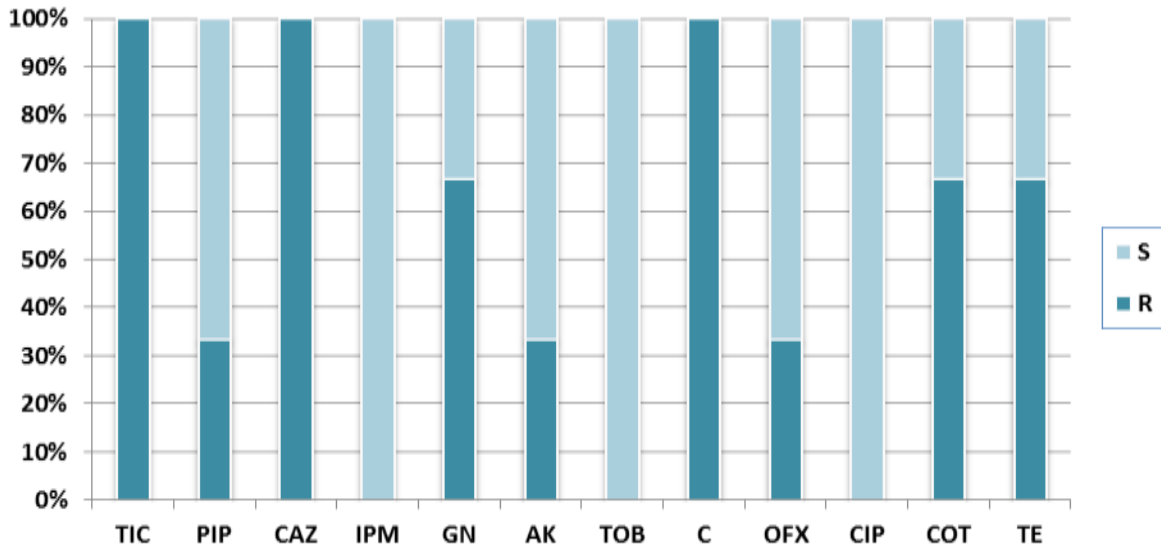


Figure 22 : Sensibilité aux antibiotiques des souches d'*A. baumannii*

En ce qui concerne les phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines, déterminés sur la base des phénotypes définis par **Jehl *et al.*, (1995)**, les souches Ab1 et Ab3 expriment le phénotype III (phénotype céphalosporinase : sensibilité aux pénicillines et imipénème et résistance aux C3G et à l'aztréonam), alors que la souche Ab2 exprime le phénotype IV (phénotype pénicillinase + céphalosporinase : résistance à toutes les  $\beta$ -lactamines, sauf l'imipénème). Donc les souches isolées dans notre travail expriment une résistance enzymatique. Quant aux phénotypes de résistance aux aminosides, on a distingué 3 phénotypes : la souche Ab3 exprime le phénotype sensible à tous les aminosides, la souche Ab2 exprime le phénotype  $GM^R$ , tandis que la souche Ab1 exprime le phénotype  $GM^R AK^R$ .

Il faut noter que parmi les trois souches étudiées, deux souches ont été multi résistantes, Ab 1 résistante à 8/ 12 antibiotiques testés, et Ab 2 résistante à 7 antibiotiques. Ces deux souches restent cependant sensibles à IPM, CIP et TOB. Ce résultat est proche de celui rapporté par **Savov *et al.*, (2012)** dont des souches environnementales ont été résistantes à tous les antibiotiques testés sauf la tobramycine et la colistine.

### 3.2.3. *Stenotrophomonas maltophilia*

Dans notre travail, toutes les souches de *S. maltophilia* ont été résistantes à TIC et PIP. Un taux de résistance élevé a également été noté à l'égard de CAZ et IPM, alors qu'un taux moindre (50%) a été observé pour COT et TE (Figure 23). 40% des souches ont été résistantes

aux trois aminosides testés. Dans cette collection, 6/ 10 souches de *S. maltophilia* ont été multi résistantes à savoir: deux souches résistantes à 8 ATB et 4 souches résistantes à 6 ATB.

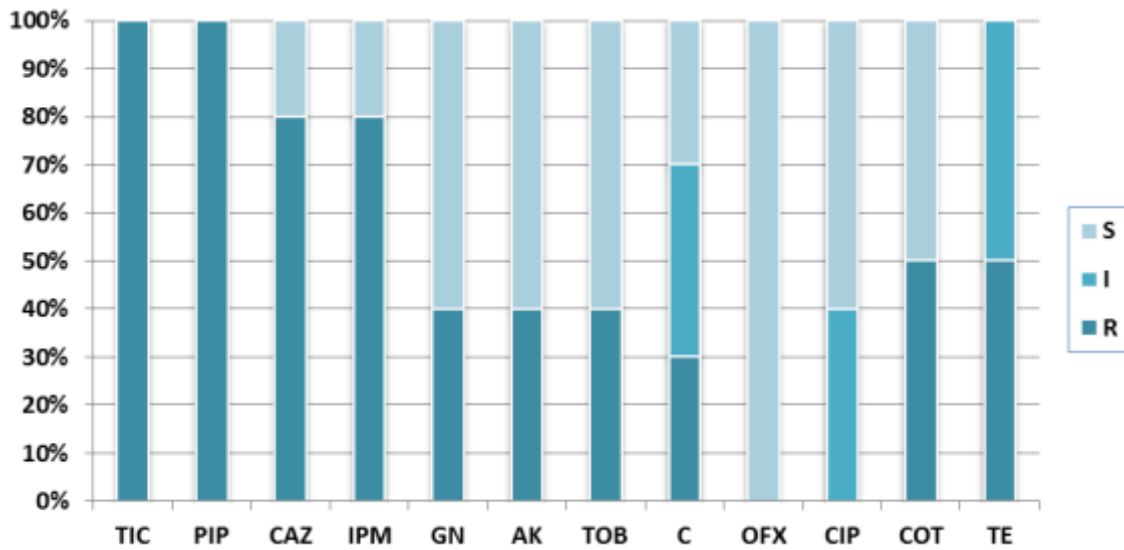


Figure 23 : Sensibilité aux antibiotiques des souches de *Stenotrophomonas maltophilia*

### 3.2.4. *Burkholderia cepacia*

Les résultats de l'antibiogramme ont montré que toutes les souches de *B. cepacia* isolées dans notre travail, ont été résistantes à CAZ, alors que 66,67% des souches ont montré une résistance aux antibiotiques : PIP, TOB, OFX et CIP (Figure 24). Un taux de résistance moindre 41,67%, a été noté vis-à-vis de TE. En ce qui concerne GN, AK et COT, seulement 25% des souches ont été résistantes à ces antibiotiques. On a également noté que la plupart des souches (8/12) ont été multi résistantes : 2 souches résistantes à 10 ATB, 3 souches résistantes à 9 ATB et 3 souches résistantes à 8 ATB.

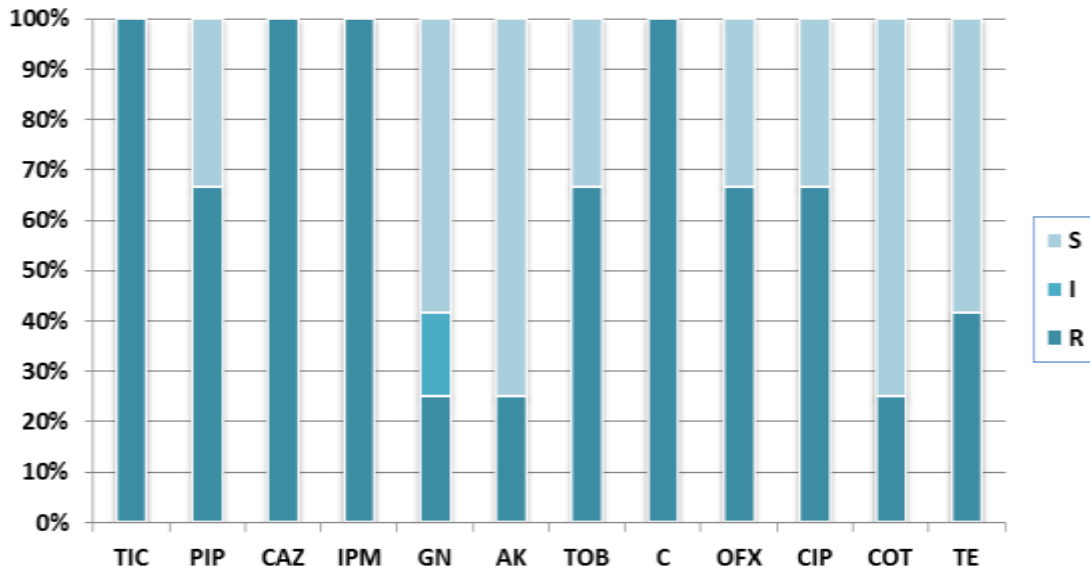


Figure 24 : Sensibilité aux antibiotiques des souches de *Burkholderia cepacia*

### 3.3. Autres bacilles à Gram négatif

#### 3.3.1. *Aeromonas hydrophila*

Les souches d'*A. hydrophila* isolées dans notre étude, ont montré des taux de résistance variables vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines utilisées (ATM : 86,67%, CAZ : 73,33%, TIC : 53,33%, AMC : 46,67%, CTX : 33,33%), mais aucune résistance à IPM n'a été détectée (Figure 25). Chez *A. hydrophila*, la résistance acquise peut entraîner une résistance aux céphalosporines de troisième génération (céfotaxime, ceftazidime) par hyperproduction de céphalosporinase, voire de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (Clave, 2010).

Conformément à la littérature, nos souches se sont montrées sensibles aux aminosides, au cotrimoxazole (Clave, 2010) et nitrofuranes (Janda et Abbott, 2010). Cependant, des résistances ont été observées à l'égard des quinolones testées : 33,33% à NA et 20% à CIP, alors que l'ofloxacine a maintenu son activité sur toutes les souches. Quant aux autres familles d'antibiotiques, des taux de résistances plus ou moins importants ont été marqués : 53,33% (FOS), 26,67% (C) et 6,67% (TE). Concernant la multi résistance, 7 (46,67%) souches parmi les 15 souches isolées se sont montrées multi résistantes.

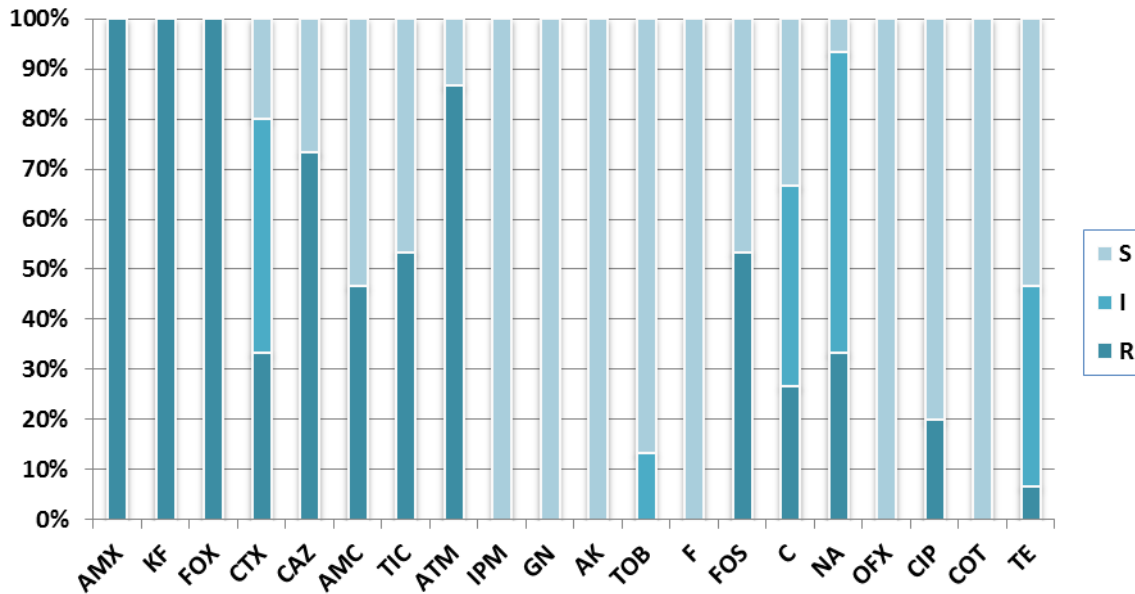


Figure 25 : Sensibilité aux antibiotiques des souches d'*Aeromonas hydrophila*

### 3.3.2. *Pasteurella pneumotropica*

Les souches de *Pasteurella pneumotropica* isolées dans ce travail sont sensibles aux aminosides, aux fluoroquinolones et au COT, ce profil est similaire à celui rapporté par **Frebourg et al., (2002)**. La souche Pn2, multi résistante, a cependant exprimé une résistance à AMX et CTX, contrairement à la souche isolée par **Frebourg et al., (2002)**.

### 3.3.3. *Vibrio fluvialis*

Notre souche est multi résistante : elle résiste à toutes le  $\beta$ -lactamines y compris l'imipénème, elle est également résistante à GM et TOB, à NA et COT. Ces antibiotiques sont couramment utilisés dans les infections à *V. fluvialis* (**Igbinosa et Okoh, 2010**).

## 4. Bacilles à Gram négatif multirésistants

Il n'existe pas de définition consensuelle d'une bactérie multi-résistante. Certains exigent une résistance à trois classes d'antibiotiques, par des mécanismes différents (**Carlet, 2006**).

Selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (**CA-SFM, 1999**), étaient définies comme multirésistantes, les souches



résistantes (R+I) à au moins un antibiotique de trois familles d'antibiotiques différentes parmi les suivantes :  $\beta$ -lactamines, quinolones, aminosides, sulfamides (cotrimoxazole).

**Lemmen *et al.*, (2004)** ont défini la multi résistance des BGN comme la résistance à au moins trois des classes d'antibiotiques suivantes : pénicillines, céphalosporines de troisième génération, carbapénèmes, quinolones et aminoglycosides. *S. maltophilia* est incluse lorsqu'une résistance contre la ciprofloxacine ou la cotrimoxazole est détectée.

**Boutoille (2012)** a défini une bactérie multi-résistante (BMR), toute bactérie non sensible à au moins un agent antimicrobien parmi au moins 3 catégories à tester pour le germe.

**Boutoille (2012)** a également défini d'autres catégories de bactéries résistantes :

➤ **Bactérie résistante extensive (XDR)** : non sensible à un agent parmi toutes, sauf 2 ou moins, catégories à tester pour le germe.

➤ **Bactérie pan-résistante (PRB)** : non sensible à tous les agents parmi toutes les catégories d'antimicrobiens à tester pour le germe.

A partir de ces postulats, le taux de détection des bacilles Gram négatifs multi résistants (BGNMR) dans notre étude est de 19,07% (160 prélèvements donnant un BGN MR sur 839 prélèvements réalisés). Ce taux dépasse largement celui rapporté dans une étude allemande portant sur des souches environnementales multi résistantes Gram positives et Gram négatives (**Lemmen *et al.*, 2004**), et qui était 4,9%.

Concernant le taux des BGNMR parmi le total des souches isolées, il est de 58,82% (180/306). Ce taux très élevé, suscite un engagement de nos établissements hospitaliers dans des programmes de lutte contre les BGN MR.

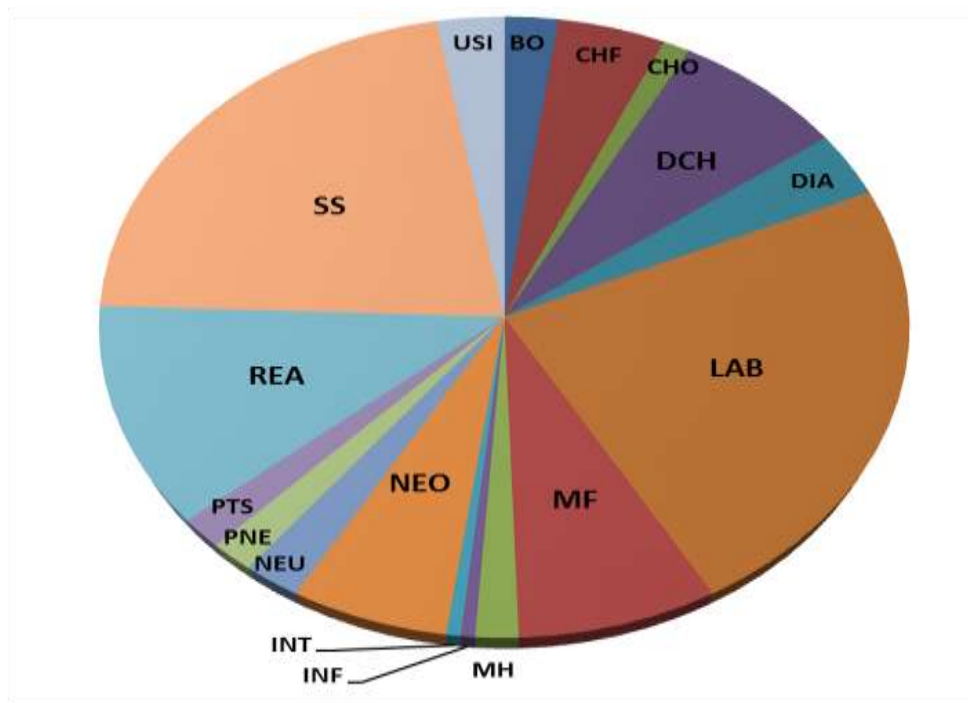
Par ailleurs, le taux des souches multi résistantes parmi les entérobactéries isolées est de 65,35% (149/228). Concernant les BGNnF, le taux des souches multi résistantes est de : 36,67% (22/60).

Du point de vue clinique, les infections provoquées par des BGN ont des caractéristiques qui sont d'un intérêt particulier étant donné que ces micro-organismes sont très efficaces dans l'acquisition de gènes qui codent pour des mécanismes de résistance aux antibiotiques, en particulier en présence d'une pression de sélection antibiotique (**Poza *et al.*, 2012**) comme c'est le cas en milieu hospitalier.

Actuellement, on se dispose de nouveaux antibiotiques pour traiter les infections à BGN MR comme les nouvelles carbapénèmes (méropénème, doripénème). Un autre nouveau antibiotique est la tigécycline, une glycylycylone, active sur la plupart des BGN. Outre son activité sur les cocci à Gram positif, ce produit est actif sur les entérobactéries multi résistantes, les *Acinetobacter spp.* Par contre, ce produit n'a pas d'activité sur les *Pseudomonas*. Dans de rares cas, certains BGN (*Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Acinetobacter...*) peuvent être résistants à tous les antibiotiques à l'exception de la colimycine. Cet ancien antibiotique est alors utilisé dans ce cas difficile (Carlet, 2006).

**4.1. Répartition des bacilles Gram négatifs multi résistants en fonction des services**

Dans notre étude, le laboratoire vient en première position avec un taux de BGNMR de 23,33% parmi les BGNMR totaux, suivi des unités de soins (21,66%), le service de réanimation (11,67%), la médecine femme (07,78%), les sales de déchoquage (07,22%), le service de néonatalogie (06,11%) (Figure 26). Les autres services ont présenté des taux négligeables entre 0 et 4,44%. Il apparait clair qu'il s'agit des services à risques sévères comme le laboratoire, la réanimation, les unités des soins, ou des services à très hauts risques comme la néonatalogie (voir tableau 01).



**Figure 26 : Répartition des BGNMR selon les services**

#### 4.2. Contamination des sites par les bacilles Gram négatifs multi résistants

Les résultats obtenus montrent que le taux de détection des BGNMR dans les différents sites environnementaux (Figure 27) est compris entre 00% et 50%. Ces taux de contamination sont importants, ils excèdent ceux rapportés par **Lemmen *et al.*, (2004)** qui ont trouvé des taux inférieurs à 10% : les poignées de porte (1,8% contre 22,22% dans notre étude), les siphons (2% contre 11,43%), les blouses (3% contre 16,67%), les sièges des toilettes (4% contre 23,33%), le sol (5% contre 13%), les bords du lit (6% contre 27,45%), les tables de malades et les respirateurs (7% contre respectivement 13,56% et 25% dans notre travail). Quant aux draps, on a marqué un taux de contamination de 8,11%, proche de celui rapporté par **Lemmen *et al.*, (2004)**, qui était 6%.

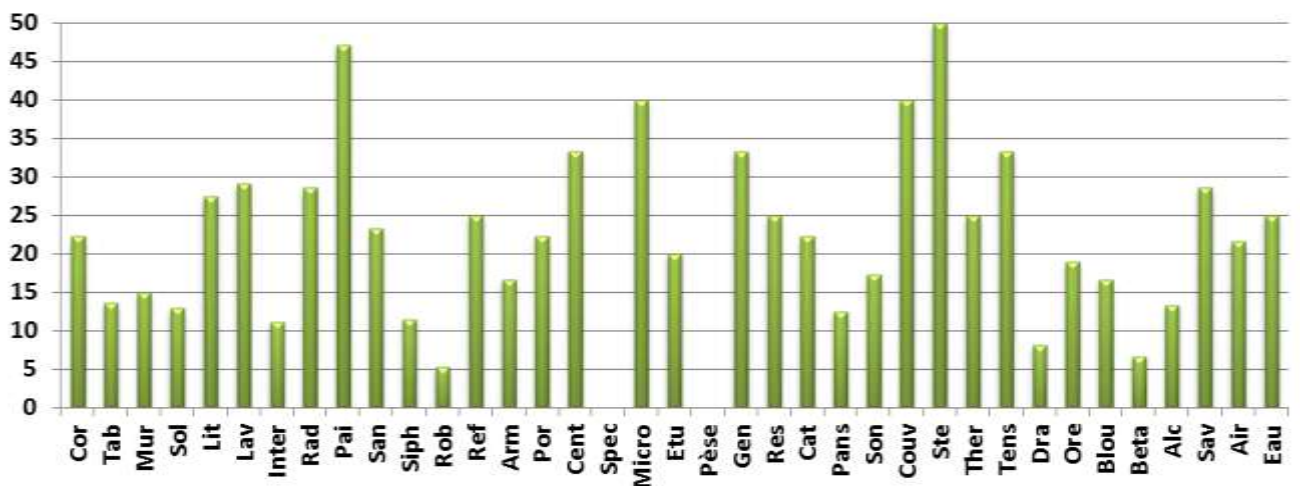


Figure 27 : Taux de contamination des différents sites par les BGNMR

**Cor** :corbeille  
**Tab** :table  
**Lav** :lavabo  
**Inter** : interrupteur  
**Rad** : radiateur  
**Pai** : paillasse  
**San** : sanitaire  
**Siph** : siphon  
**Rob** : robinet

**Ref** : réfrigérateur  
**Arm** : armoire  
**Por** : porte  
**Cent** : centrifugeuse  
**Spec** : spectrophotomètre  
**Micro** : microscope  
**Etu** : étuve  
**Pèse** : pèse-bébé  
**Gen** : générateur

**Res** : respirateur  
**Cat** : cathéter  
**Pans** : instruments de pansement  
**Son** : sonde urinaire  
**Couv** :couveuse  
**Ste** :stéthoscope  
**Ther** :thermomètre  
**Tens** : tensiomètre

**Dra** : drap  
**Ore** : oreiller  
**Blou** : blouse du personnel  
**Beta** : bétadine  
**Alc** : alcool  
**Sav** : savon liquide

Ces résultats montrent une émergence des BGNMR dans l'environnement de nos établissements hospitaliers, ceci signifie qu'il existe un besoin urgent de comprendre l'épidémiologie de ces agents pathogènes, y compris la mesure dans laquelle des surfaces contaminées contribuent à leur transmission (**Otter *et al.*, 2011**).

Certaines BMR, comme les *Acinetobacter*, peuvent persister pendant plusieurs jours dans l'environnement et constituer des réservoirs secondaires. Les zones les plus contaminées sont les surfaces dans l'environnement immédiat d'un patient porteur, et les points fréquemment touchés par le personnel de soins. La contamination des surfaces est plus fréquente chez les patients infectés que simplement porteurs de BMR, en particulier pour certaines infections (plaies ou brûlures étendues, infections urinaires). Une transmission peut ainsi survenir par l'intermédiaire de matériel contaminé, vecteur de BMR. Il s'agit soit d'un matériel partagé entre patients (thermomètres électroniques, brassards à tension, garrots), soit de matériels réutilisables imparfaitement désinfectés ou stérilisés, systèmes de prise de pression vasculaire ou de ventilation le plus souvent ; les BGNnF sont souvent impliqués dans ces épidémies. L'utilisation de matériel à usage unique et la standardisation des méthodes de désinfection-stérilisation en ont réduit la fréquence (**Lucet, 1997**).

En général, les patients colonisés ou infectés ont une concentration supérieure de contamination de leurs surfaces environnantes. En revanche, la concentration de pathogènes nosocomiaux est généralement dans l'intervalle de moins de 1 à 100 UFC / cm<sup>2</sup> sur les surfaces. La présence d'un agent pathogène sur une surface ne représente nécessairement pas un risque de transmission. Toutefois, la dose infectieuse pour la plupart des agents pathogènes nosocomiaux associés à l'environnement semble être faible. Fait important, malgré la concentration relativement faible de contamination sur des surfaces par rapport à celle sur la peau des patients, touchant une surface contaminée par des microorganismes porte approximativement le même risque pour l'acquisition de ces agents sur les mains que de toucher un patient affecté. Donc, la concentration de la contamination est suffisante pour la transmission. Par conséquent, la présence d'un pathogène sur une surface à toute concentration peut être un risque pour la transmission (**Otter et al., 2011**), ce qui se reflète dans les lignes directrices proposées par **Dancer (2004)** pour les normes d'hygiène microbiologiques.

Il a été démontré dans de nombreuses études que les pathogènes nosocomiaux peuvent être transférés des surfaces contaminées aux mains du personnel soignant. Des études in vitro présentent une image dynamique du transfert rapide à partir des surfaces aux mains et vice-versa. Par exemple, des marqueurs d'ADN séchés sur les jouets ont été transférés facilement aux mains des chercheurs et par la suite sur des jouets propres et les marqueurs se propagent rapidement lorsqu'ils sont introduits dans un centre de garderie. De même, des doigts contaminés expérimentalement ont contaminé en série des surfaces avec de multiples

norovirus. Des résultats similaires ont été rapportés en utilisant des surfaces contaminées par des bactéries et bactériophages. Ainsi, des doigts contaminés ont été montrés transférer plus de 30% des bactéries inoculées et des bactériophages à la bouche des volontaires, avec des implications claires pour la transmission féco-orale de pathogènes nosocomiaux. Plusieurs études ont démontré que différentes bactéries pathogènes peuvent être acquises sur les mains du personnel soignant par le contact avec des surfaces de l'environnement en l'absence de contact direct des patients (Otter *et al.*, 2011).

Les BGN MR sont moins souvent isolés de l'environnement et les précautions de barrière sont à prendre seulement quand il y a un contact étroit avec le malade. Par conséquent, l'isolement en une seule chambre ne semble pas être nécessaire (Lemmen *et al.*, 2004).

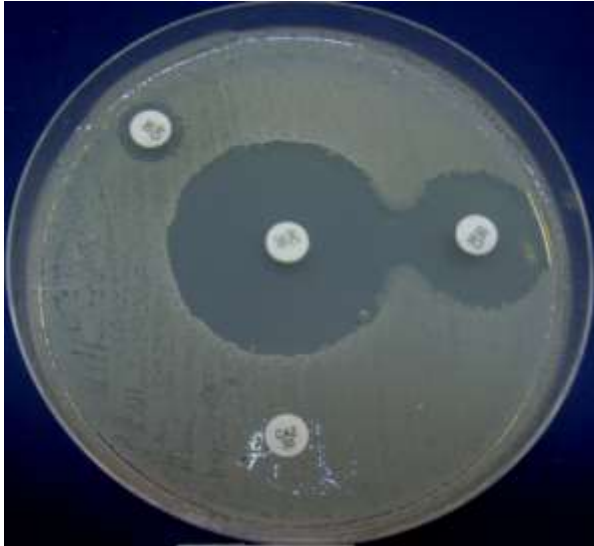
## 5. Entérobactéries productrices des BLSE

### 5.1. Résultats des tests de détection des BLSE

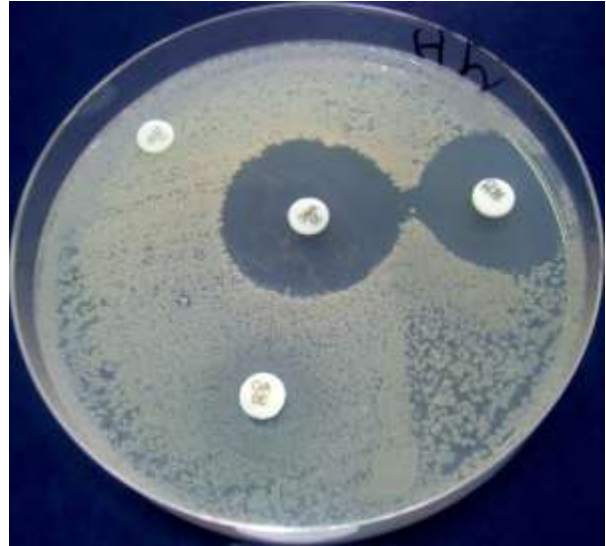
Le screening initial par le test de synergie a permis d'identifier 157 souches comme productrices de BLSE. 102 souches ont été confirmées comme productrices de BLSE par la méthode de rapprochement des disques, et 114 souches par la méthode du double disque. Le tableau 32 présente les résultats obtenus des différents tests réalisés pour la détection des BLSE. Les figures 28-33 présentent des exemples de quelques tests de détection positifs.

**Tableau 32 : Résultats des tests de détection des BLSE**

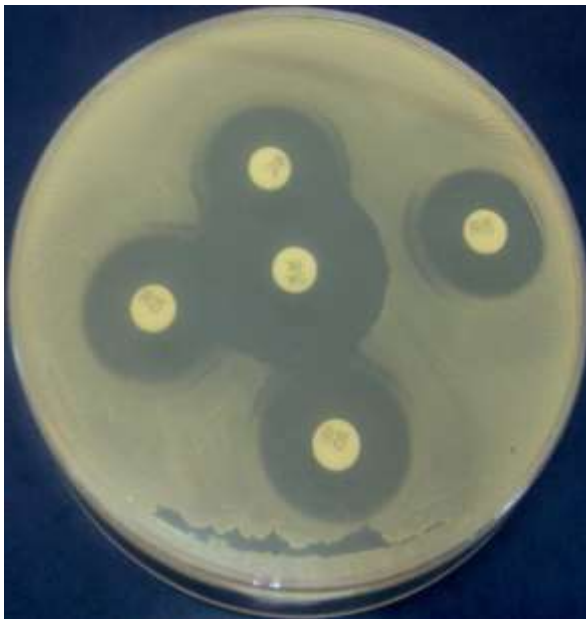
Nombre de souches	Nombre des tests positifs (%)		
	Test de synergie	Test de rapprochement des disques	Test du double disque
228 (100%)	157 (68,86%)	102 (44,74%)	114 (50%)



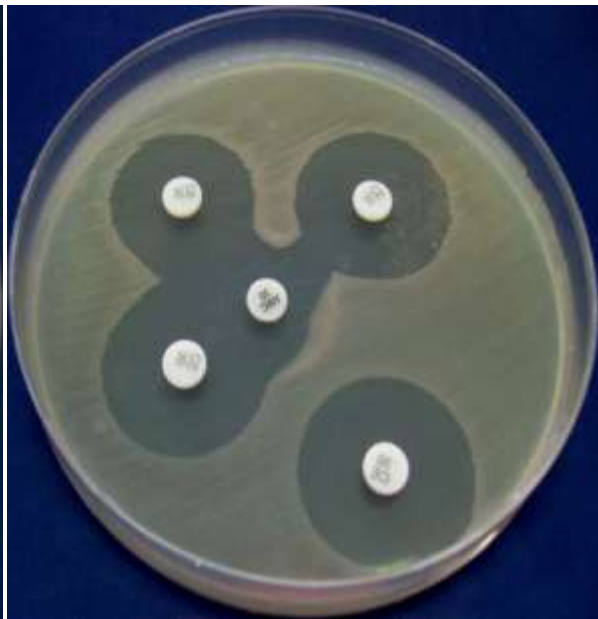
**Figure 28 : Test de synergie positif de la souche Sf9**



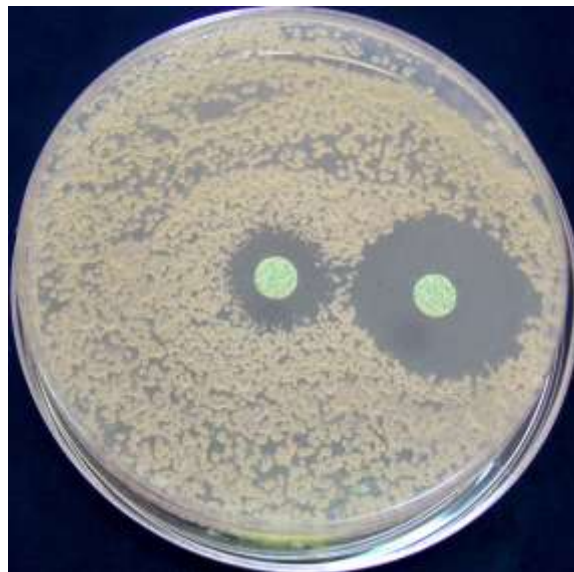
**Figure 29 : Test de synergie positif de la souche Sp31**



**Figure 30 : Test de rapprochement des disques positif de la souche Sf11**



**Figure 31 : Test de rapprochement des disques positif de la souche Sm25**



**Figure 32 : Test du double disque positif de la souche Sf11**

**Figure 33 : Test du double disque positif de la souche E19**

Dans notre étude, le taux de contamination environnementale par les entérobactéries productrices de BLSE (EBLSE) est de 12,87% (108 prélèvements ayant donné EBLSE/ 839). Ce résultat est supérieur à celui trouvé par **Touati *et al.*, (2008a)** et qui était 9% (14/150), alors qu'il dépasse largement le taux trouvé par **Touati *et al.*, (2010)** et qui était 3,7% (16/428). De même, notre résultat dépasse celui rapporté dans une étude américaine prospective (**Guet-Revillet *et al.*, 2012**) qui était 4% (19/ 470).

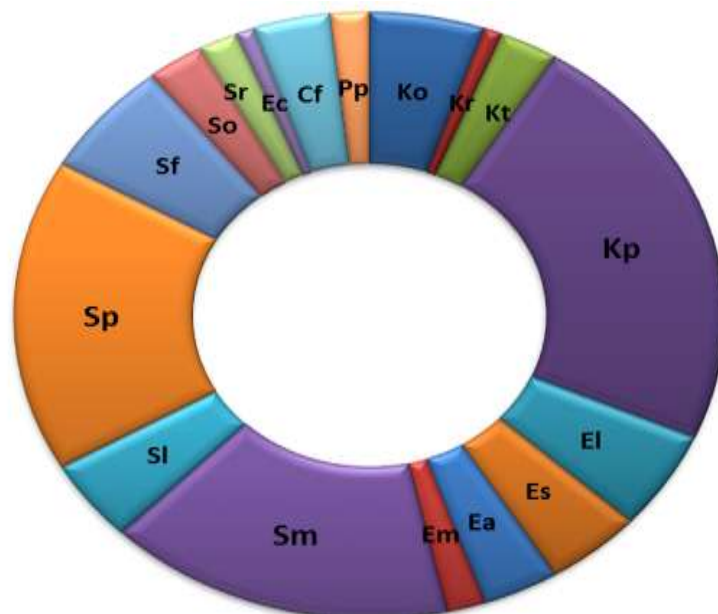
En ce qui concerne, le taux des EBLSE parmi les entérobactéries isolées, il est de 50% (114/228), il dépasse largement le taux trouvé par **Touati *et al.*, (2008a)** qui était 13,86% (14/101), et celui de **Touati *et al.*, (2010)** qui était 25,80% (16/62).

La contamination environnementale importante par les EBLSE observée dans nos établissements hospitaliers pourrait être expliquée en partie par la durée de portage de ces bactéries par les patients. En effet, il a été démontré lors d'une épidémie à *K. oxytoca* producteur de BLSE, que 23,5% des patients colonisés ou infectés ont demeuré colonisés après trois mois. La colonisation par les EBLSE peut persister pendant des mois à des années; les données sont cependant insuffisantes pour déterminer si la durée de portage est différente selon les espèces ou selon les clones d'entérobactéries (**Lowe *et al.*, 2012**). Dans une autre étude, la durée médiane de portage des EBLSE a été estimée entre six mois et un an (**Schnell *et al.*, 2010**). Dans une étude canadienne, seulement 6,8% des patients colonisés ont dégagé le portage

sur 3ans de suivi (Kola *et al.*, 2007). En raison de la longue durée de la colonisation, l'hospitalisation est également susceptible d'être un facteur de risque d'apparition d'une infection communautaire à *K. oxytoca* multirésistante, comme cela a été récemment décrit à Athènes, en Grèce (Tsakris *et al.*, 2011). La contamination environnementale par les EBLSE peut également être due à la dissémination des plasmides porteurs de BLSE entre les entérobactéries (Lucet et Birgand, 2011).

### 5.2. Répartition des EBLSE selon les espèces

Quant aux espèces productrices des BLSE, on a remarqué une grande diversité des espèces avec prédominance de *K. pneumoniae* présentant 22,81% parmi les EBLSE totales, suivie de *S. plymuthica* (16,67%) et *S. marcescens* (15,79%) (Figure 34). Ces résultats sont différents de ceux rapportés par Touati *et al.*, (2008a) et Touati *et al.*, (2010) où les souches EBLSE ont été présentées par seulement deux espèces : *E. cloacae* présentant respectivement 64,29% (9/14) et 87,5% (14/16) et *K. pneumoniae* présentant respectivement 35,71% (5/14) et 12,5% (2/16). Alors que dans notre étude, *E. cloacae* a occupé la 4<sup>ème</sup> position en partage avec *K. oxytoca*, présentant un taux de 05,26%, inférieur à ceux rapportés par Touati *et al.*, (2008a) et Touati *et al.*, (2010).



**Figure 34 : Répartition des EBLSE selon les espèces**



La fréquence des *K. pneumoniae* productrices de BLSE (KpBLSE) parmi les souches de *K. pneumoniae* isolées dans notre étude est de 66,67% (26/39), ce taux est supérieur à celui trouvé dans une étude algérienne similaire (**Abid et al., 2007**), qui était 40% (8/20).

Concernant le taux des *E. coli* productrices de BLSE (EcBLSE) parmi les souches *E. coli* isolées, il est de 20% (1/5), ce résultat est proche de celui rapporté par **Ahoyo et al., (2007)** qui était 15% (7/46). Ainsi, le pourcentage des *E. coli* isolées par rapport aux entérobactéries totales est négligeable, il est de 2,19% (5/228), ce taux est très largement inférieur à celui trouvé par **Ahoyo et al., (2007)** et qui était 46% (46/99).

La contamination fréquente de l'environnement par *Klebsiella* productrices de BLSE (KBLSE) pourrait suggérer que ces bactéries ont une très grande capacité à se propager et / ou persister dans l'environnement. En effet, *Klebsiella* spp sont connus pour former des biofilms, qui peuvent être un moyen de survie pendant de longues périodes dans l'environnement. En plus, il a été démontré, que le portage ou l'infection par les KBLSE est considéré comme le seul facteur de risque significativement associé à la contamination des surfaces (**Guet-Revillet et al., 2012**). En se basant sur cette constatation, on pourrait expliquer la fréquence de contamination environnementale par KBLSE dans notre étude, par la fréquence des patients porteurs de ces bactéries ou infectés, bien que nous n'avons pas effectué des prélèvements cliniques pour chercher les mêmes souches chez les patients dans le même environnement.

Par ailleurs, **Guet-Revillet et al., (2012)**, ont suggéré que la contamination environnementale se produit beaucoup plus souvent lorsque le patient est porteur d'une KBLSE par rapport à un EcBLSE, ce qui corrobore avec nos résultats qui montrent une contamination environnementale par les KBLSE plus importante que celle par des EcBLSE. Ainsi, **Lucet et Birgand (2011)** ont rapporté que certaines souches d'EBLSE comme *K. pneumoniae* et *Enterobacter spp.*, sont plus facilement transmises que d'autres entre patients durant leur séjour, ce qui reflète des capacités de diffusion plus importantes. **Crivaro et al., (2007)** ont également démontré que la durée de séjour à l'hôpital constitue l'un des facteurs de risque pour l'acquisition des EBLSE, ce qui suggère que le milieu hospitalier joue un rôle crucial dans la transmission de ces pathogènes.

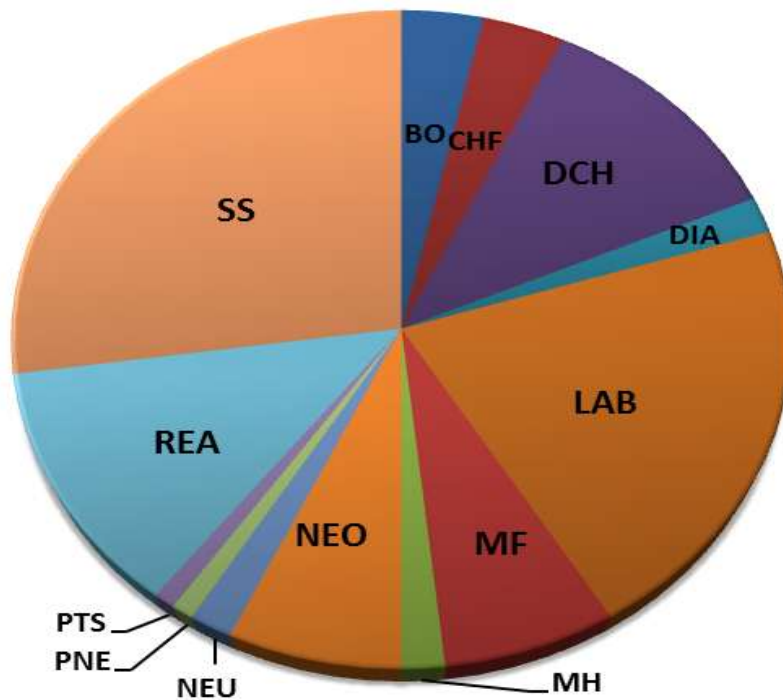
En fonction des genres, *Serratia* occupait la première place avec une fréquence de 47,37% parmi les EBLSE totales, suivi de *Klebsiella* (31,58%) et *Enterobacter* (14,91%). Ce résultat diffère de celui rapporté par **Guet-Revillet et al., (2012)** où *Klebsiella* a prédominé avec une fréquence de 83,33%, et le reste des souches a été présenté par *E. coli* (11,11%) et *C. freundii*

(5,56%). Dans notre travail, la proportion d'EcBLSE était négligeable (0,88% : une seule souche), alors que la fréquence de *C. freundii* producteurs de BLSE (3,51%) est comparable à celle rapportée par **Guet-Revillet et al., (2012)**.

A la lumière de ces résultats, il paraît clair que les souches EBLSE sont majoritairement présentées par les bactéries du groupe K.E.S avec une fréquence très élevée (93,66%).

**5.3. Répartition des EBLSE selon les services**

La répartition des EBLSE en fonction des services (Figure 35), a montré que les unités de soins occupent la première place avec un taux de 27,19% parmi les EBLSE totales, suivies par le laboratoire (21,05%), le service de réanimation (12,28%), les salles de déchoquage (11,41%). Les autres services ont présenté des fréquences moindres comprises entre 0,88% et 07,02%. Dans certains services (pédiatrie, maternité, maladies infectieuses et médecine interne), la fréquence des EBLSE est nulle.



**Figure 35 : Répartition des EBLSE selon les services**

#### **5.4. Répartition des EBLSE selon les sites**

Dans le milieu hospitalier, les entérobactéries sont fréquemment impliquées dans les infections nosocomiales menant à un accroissement de la morbidité, la mortalité et les coûts de l'hospitalisation. Le réservoir de ces agents pathogènes est le tractus gastro-intestinal de patients, et la transmission croisée pourrait se produire par l'intermédiaire des mains contaminées du personnel soignant et par la contamination de l'environnement. Ces bactéries sont de plus en plus résistantes aux antibiotiques disponibles et des éclosions d'infections nosocomiales dues aux EBLSE et aux entérobactéries productrices de carbapénèmases (EPC) ont été rapportées, en particulier dans les unités de soins intensifs (USI) (**Roux *et al.*, 2013**).

Dans notre travail, les résultats montrent que les sites présentant une fréquence d'isolement élevée des EBLSE sont : les lavabos (14 souches), les bords des lits (13), l'air (11), les murs et les paillasse (8 pour chacun), les toilettes, les tables, le sol et les sondes urinaires (6 pour chacun). De même, **Guét-Revillet *et al.*, (2012)** ont rapporté les lavabos et les bords du lit parmi les sites les plus contaminés avec respectivement 5 souches et 2 souches sur un total de 18 EBLSE.

La majorité des sites précédemment cités constituent l'environnement immédiat du patient. Ceci nous a permis de constater d'une part : que la contamination par les EBLSE pourrait être le résultat d'une éjection importante de ces bactéries par les patients dans leur proche environnement; et d'une autre part que la présence de telles bactéries multi résistantes dans l'environnement immédiat du patient constitue un risque réel d'acquisition d'infections nosocomiales. En effet, il a été démontré que les sites plus proches au patient sont plus susceptibles de présenter un risque que ceux situés plus loin. Ainsi, la transmission des EBLSE de patient à patient au moyen de surfaces de l'environnement a été rapportée dans plusieurs études (**Guét-Revillet *et al.*, 2012**).

Dans une autre étude, il a été rapporté que la contamination par le biais de l'environnement pourrait expliquer la propagation persistante de bactéries productrices de BLSE. En effet, des réservoirs inertes (siphons de lavabos, équipements...) peuvent être contaminés et constitueraient un relais à la transmission entre deux personnes (**Claudon *et al.*, 2002**). Dans le cadre des infections aux EBLSE, il a souvent été démontré que le réservoir prépondérant est le patient lui-même. Le second réservoir est constitué par le matériel utilisé, à savoir les tubes endotrachéaux, les sondes urinaires, les cathéters artériels ou veineux,.... Ce matériel a été

incriminé dans de nombreuses études (**Mirabaud, 2003**). Le taux de contamination des sondes urinaires par les EBLSE, dans la présente étude, est de 10,48% (3/ 29 prélèvements).

En général, nous avons détecté les EBLSE dans la plupart des sites (27/37 soit 72,98% des sites prélevés), ce qui suppose que ces sites environnementaux peuvent être un réservoir potentiel pour ces bactéries multirésistantes et que la transmission croisée peut également se produire.

Il faut signaler que dans neuf cas, deux à trois souches EBLSE ont été isolées du même site le même jour (du même échantillon) : six cas présentant deux souches par site et trois cas correspondant à trois souches par site (Tableau 33). Nos résultats montrent qu'un même site peut héberger plusieurs souches EBLSE appartenant à différentes espèces, souvent du groupe KES. En effet, de nombreuses études démontrent un schéma complexe de contamination de l'environnement par des EBLSE au cours d'une période non épidémique; les chambres ont été contaminées par plus d'une espèce d'EBLSE. Une souche peut survivre pendant des semaines ou des mois à des sites multiples, et différentes souches ont été isolées sur le même site de l'environnement dans le même jour (**D'Agata et al., 1999; Kac et al., 2004**).

**Tableau 33 : Les différents échantillons présentant plusieurs souches EBLSE**

Site	Souches isolées
Paillasse	Sp3, Kpp6
Paillasse	Kpp14, Ko4
Lit	Em1, Kpp8
Lit	Sm3, Sr2
Oreiller	Kpp7, Sm7
Sonde urinaire	Kpp17, Cf3
Microscope	Sp10, Sp12, Ea4
Sonde urinaire	Sm21, Sm23, Kpp18
Mur	Ko8, Ko9, Kpo13

Les EBLSE sont censées être transmises comme les autres agents pathogènes nosocomiaux avec la flore cutanée transitoire après le contact direct avec un patient colonisé en l'absence de l'hygiène des mains. Cependant, la contamination des mains ou des vêtements du personnel de la santé pourrait se produire non seulement après un contact direct avec les patients, mais aussi avec l'environnement. Certaines épidémies persistent malgré les mesures de contrôle des

infections. Comme illustré par **D'Agata et al., (1999)**, l'importance potentielle de contamination de l'environnement dans la transmission croisée des bactéries à Gram négatif résistantes, peut être sous-estimée. Des échantillons de l'environnement peuvent faire partie des mesures de surveillance et de contrôle de l'épidémie (**Touati et al., 2008a**).

La fréquence élevée de la contamination environnementale par les EBLSE dans notre travail pourrait conduire le personnel médical à reconsidérer les mesures d'hygiène mises en œuvre autour de porteurs des EBLSE et d'intensifier/ renforcer les mesures environnementales visant ces bactéries multi résistantes. Plusieurs stratégies d'hygiène pour prévenir la propagation de ces bactéries ont été testées dans les deux dernières décennies. Des études ont montré que la transmission de patient à patient diminue après la mise en œuvre de mesures telles que le dépistage des patients, l'isolement géographique du patient (chambre individuelle), la décontamination des porteurs, l'hygiène des mains et l'utilisation de gants et de blouses par le personnel de santé quand ils sont en contact avec le patient ou son environnement. Une intensification des pratiques d'hygiène autour des porteurs des EBLSE devrait réduire la contamination de l'environnement par ces bactéries multi résistantes et donc peut être un moyen de réduire la propagation des EBLSE dans les hôpitaux (**Guet-Revillet et al., 2012**).

Enfin, dans ce travail, on a effectué des prélèvements dans différents services en relation directe avec les patients, mais il y a d'autres sites qui peuvent être des réservoirs pour les EBLSE et qui n'ont pas fait l'objet des prélèvements environnementaux dans notre étude, c'est le cas de la cuisine. Récemment, un clone de *K. pneumoniae* possédant des BLSE de type SHV-1 et CTX-M-15 a été impliqué dans une épidémie d'origine alimentaire dans un hôpital en Espagne, où la cuisine et les manipulateurs d'aliments colonisés étaient les réservoirs présumés (**Calbo et al., 2011**).

### 5.5. Contamination des lavabos par les EBLSE

Le taux de contamination des lavabos par les EBLSE était de 19,44% (14/ 72), ce taux est inférieur à celui rapporté par **Roux et al., (2013)** dans une étude multicentrique, et qui était 30,81% (57/ 185). Ceci pourrait être le fait que dans cette dernière étude, les prélèvements ont été tous réalisés exclusivement dans les unités des soins intensifs dans lesquelles des épidémies aux EBLSE sont fréquemment rapportées **Roux et al., (2013)**.

Parmi les 14 EBLSE isolées des lavabos dans notre travail, *Serratia* a été le genre le plus fréquemment isolé (6/14 soit 42,85%) avec 3 souches de *S. marcescens*, 2 souches de *S.*

*plymuthyica* et une souche de *S. ficaria*. En deuxième position, vient *Klebsiella* (4/14 soit 28,57%) avec 3 souches de *K. pneumoniae* et une souche de *K. terrigena*. Ensuite, vient le genre *Enterobacter* (3/14 soit 21,43%) représenté par 2 souches d'*E. cloacae* et une souche d'*E. sakazakii*. A ces souches du groupe K.E.S, vient s'ajouter une seule souche de *Proteus penneri*. Ces résultats diffèrent de ceux rapportés par **Roux et al., (2013)**, où *Klebsiella* prédominait avec une fréquence de 55%, suivi du genre *Enterobacter* (30%), tandis que le genre *Serratia* (représenté par *S. marcescens*) a seulement représenté 1,67% contre 42,85% dans notre étude.

Ces résultats montrent que la contamination des lavabos dans nos établissements était variée, reflétant la diversité des EBLSE portées par les patients. Cependant, *Serratia* était le genre le plus fréquent. En effet, les *Serratia* sont les entérobactéries les plus résistantes aux agents physiques et chimiques (**De la Maza et al., 2004**). *Klebsiella* et *Enterobacter* ont également été contaminant des lavabos, tandis que *E. coli* n'a pas été rencontrée dans notre travail, bien que *E. coli* est l'espèce la plus fréquemment impliquée dans le portage humain des EBLSE, il peut ne pas être capable de survivre dans les biofilms avec autant de succès que *Klebsiella* et *Enterobacter* (**Roux et al., 2013**).

Les lavabos ont déjà été identifiés comme sources d'épidémies d'infections en unité de soins intensifs. Par exemple, une épidémie d'infections causées par *K. oxytoca* producteur de BLSE a été rapportée dans un hôpital de Toronto au Canada, pendant une période de 4 ans; la source de cette épidémie était les lavabos de lavage des mains, où le taux de contamination a été de 16,4% (149/ 910) (**Lowe et al., 2012**).

L'utilisation des éviers pour l'élimination des fluides corporels a été suggérée comme impliquée dans leur contamination avec EBLSE. Ces microorganismes sont capables de survivre dans les biofilms et se multiplier dans des conditions humides. Une fois contaminé, le lavabo devient un réservoir potentiel aux EBSLE (**Roux et al., 2013**). Des études portant sur le test de marquage fluorescent ont documenté le mécanisme probable de transfert d'agents pathogènes présents dans un évier contaminé aux patients. **Hota et al., (2009)** ont injecté un marqueur fluorescent dans la bonde d'un évier et ils ont ouvert le robinet pendant quelques secondes: des résidus fluorescents ont été trouvés partout dans l'évier, et à au moins 1 m du lavabo. Ils ont également suggéré que les petites particules, non détectées, voyageaient beaucoup plus loin que 1 m. Par conséquent, si la distance entre le lavabo et le lit du patient, ou le matériel de soin du patient, est inférieure à 2 m, la pression de l'eau doit être réduite, et des anti-éclaboussures obstacles doivent être installés autour de l'évier. La combinaison de la

contamination des lavabos et le risque de projections dans les éviers peut avoir contribué au développement des épidémies. Ainsi, il a été suggéré qu'une conception inadéquate de l'évier (de l'eau s'écoulant directement dans l'évier, combinée à une forte pression d'eau et un évier peu profond) peut favoriser la rupture de biofilms bactériens à l'intérieur des canalisations. Ceci facilite le transfert des microorganismes viables dans les surfaces environnantes à proximité immédiate de l'évier, y compris le lit du patient, et la zone où les procédures aseptiques sont effectuées, s'il n'y a pas de barrière d'éclaboussures entre l'évier et ces zones (**Roux et al., 2013**).

Les lavabos sont des éléments permanents de l'environnement hospitalier et la gestion des lavabos contaminés est complexe. Plusieurs mesures doivent donc être prises, dont l'objectif est de réduire, plutôt que d'éliminer la contamination des lavabos. Tout d'abord, une désinfection quotidienne avec de l'eau de javel sera très importante. Dans ce contexte, **Roux et al., (2013)** ont démontré que la désinfection préventive a donné des résultats divergents. Généralement, la désinfection de routine n'a apporté aucune contribution significative à la prévention de la contamination des lavabos. Cependant, l'utilisation quotidienne de l'eau de Javel a semblé être l'approche la plus efficace pour limiter la contamination des drains des lavabos par les EBLSE, et peut donc réduire le risque pour les patients de contracter des infections nosocomiales de leur environnement. Néanmoins, il a été démontré que l'éradication des EBLSE des lavabos est difficile, voire impossible, en particulier lorsque *Klebsiella* spp. ou *Enterobacter* spp. sont impliqués, probablement parce que c'est difficile d'agir sur le biofilm dans les parties distales du système de plomberie et parce que les micro-organismes survivent avec succès dans les biofilms dans les drains d'évier, malgré une exposition fréquente aux désinfectants. Enfin, il serait utile d'évaluer les effets à long terme de l'utilisation de l'eau de Javel pour la décontamination des lavabos, et de déterminer les quantités optimales et les temps d'exposition pour limiter la contamination des lavabos par les EBLSE (**Roux et al., 2013**).

Le risque de contamination via les éclaboussures devrait également être réduit, ceci a été démontré possible en réduisant la pression d'arrivée d'eau, cette mesure est nécessaire lorsque le lit du patient est à moins de deux mètres du lavabo (**Roux et al., 2013**). Pour prévenir la dissémination des EBLSE à partir des lavabos, des changements structurels, y compris la rénovation des éviers et de la tuyauterie, le changement des drainages des lavabos, parfois, une nouvelle conception pour l'installation des éviers de manière à éviter les projections, sont nécessaires. En plus, des politiques de lutte contre les infections possibles sont

nécessaires comme l'hygiène des mains et la délimitation claire entre éviers de lavage des mains éviers et à d'autres fins (**Lowe et al., 2012**). Il est recommandé de réserver un lavabo uniquement pour le lavage des mains, et suggérer que les lavabos utilisés pour l'élimination des déchets devraient être systématiquement considérés comme étant potentiellement contaminés. S'il n'y a qu'un évier par chambre de patient et il est utilisé pour l'évacuation de fluides corporels, une friction des mains à l'alcool doit être utilisée avant les procédures aseptiques (**Roux et al., 2013**).

### **5.6. Résistance aux antibiotiques des souches EBLSE**

Les EBLSE de notre collection ont généralement présenté des taux élevés de résistance aux  $\beta$ -lactamines utilisées, et des taux moindres aux autres familles. Toutes les souches ont été résistantes à l'amoxicilline (Figure 36). Ces souches ont également montré de forts taux de résistance à l'égard des antibiotiques : CAZ (99,12%), TIC et ATM (98,25%), CTX (88,60%), AMC (81,58%) (Tableau 34), ces résultats sont comparables à ceux rapportés par **Touati et al., (2008a)** et **Touati et al., (2010)** où la totalité des souches ont été résistantes à ces antibiotiques.

En revanche, **Touati et al., (2008a)** et **Touati et al., (2010)** ont respectivement rapporté des taux de résistance plus élevés vis-à-vis de nombreux antibiotiques : GM (92,86% et 100% contre 31,58% dans notre étude), TOB (85,71% et 100% contre 37,72%), COT (92,86% et 87,50% contre 49,12%), NA (68,75% contre 56,14%), FOX (86,67% contre 57,02%) et C (68,75% contre 38,60%). Cependant, nos souches ont montré des taux de résistance plus importants vis-à-vis des antibiotiques : IPM (11,40%) et FOS (54,39%), alors que les souches rapportées dans les deux études précédentes ont été toutes sensibles à ces antibiotiques. Quant aux fluoroquinolones, nous avons trouvé des taux de résistance de 29,83% pour OFX et 14,03% pour CIP, ces taux sont supérieurs au taux rapporté par **Touati et al., (2008a)** et qui était 07,14%. Par ailleurs, le taux de résistance le plus faible a été observé pour F (09,65%). Dans l'ensemble, les antibiogrammes ont montré une grande hétérogénéité des souches EBLSE isolées.



**Tableau 34 : Pourcentage de sensibilité aux antibiotiques des EBLSE isolées**

Antibiotique	R		I		S	
	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%
AMX	114	100	00	00	00	00
KF	112	98,24	00	00	02	01,75
FOX	65	57,02	19	16,67	30	26,31
CTX	101	88,60	13	11,40	00	00
CAZ	113	99,12	01	00,88	00	00
AMC	93	81,58	20	17,54	01	00,88
TIC	112	98,24	01	00,88	01	00,88
ATM	112	98,25	02	01,75	00	00
IPM	13	11,40	05	04,39	96	84,21
GN	36	31,58	03	02,63	75	65,79
AK	30	26,32	03	02,63	81	71,05
TOB	43	37,72	14	12,28	57	50
F	11	09,65	00	00	103	90,35
FOS	62	54,39	00	00	52	45,61
C	44	38,60	30	26,31	40	35,09
NA	64	56,14	25	21,93	25	21,93
OFX	34	29,83	06	05,26	74	64,91
CIP	16	14,03	12	10,53	86	75,44
COT	56	49,12	06	05,26	52	45,62
TE	70	61,40	05	04,39	39	34,21

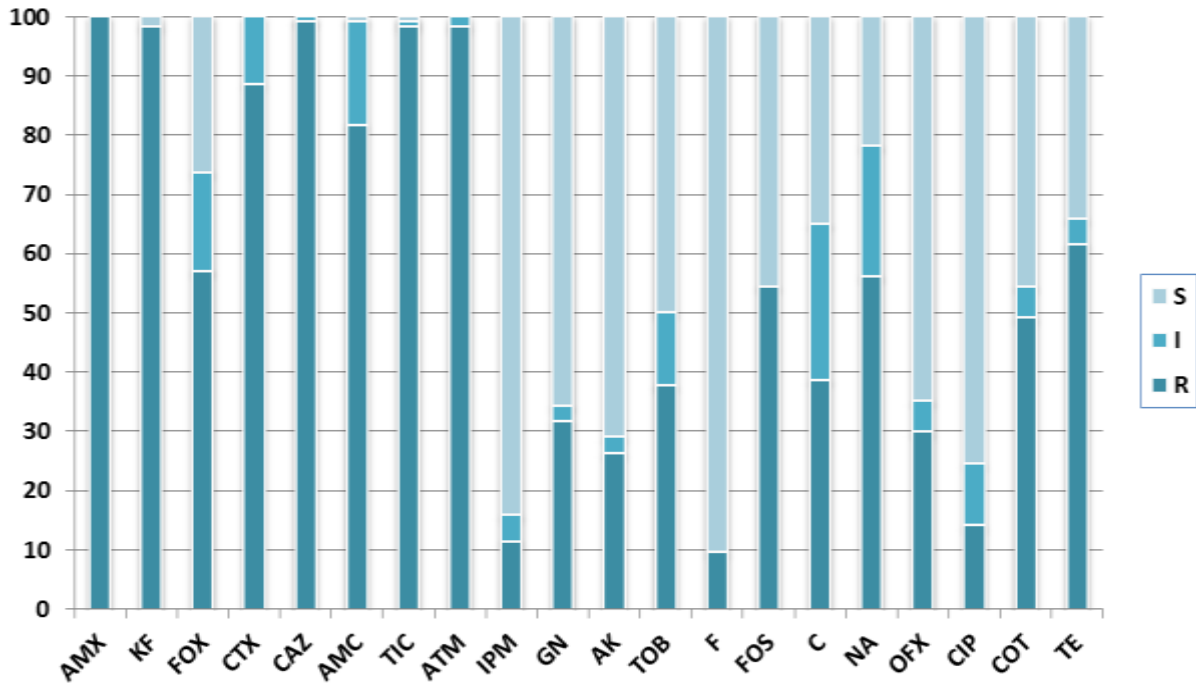


Figure 36 : Sensibilité aux antibiotiques des EBLSE

En ce qui concerne les souches KpBLSE, nos résultats ont montré des taux de résistance à certains antibiotiques, largement inférieurs à ceux rapportés par **Abid et al., (2007)** : F (3,85% contre 31,1% pour l'autre étude), C (34,62% contre 86,4%) et FOX (19,23% contre 47,7%). Quant aux résistances associées au phénotype BLSE, les souches Kp BLSE ont présenté des résistances touchant les différentes familles d'antibiotiques autres que les  $\beta$ -lactamines (aminosides, quinolones, FOS, TE, C, COT et F). Les résistances associées aux aminosides et au chloramphénicol ont aussi été rapportées par **Abid et al., (2007)** alors que les résistances associées au COT et aux F n'ont pas été signalées par **Abid et al., (2007)**.

## 6. Etude moléculaire

### 6.1. Détermination des supports génétiques de la résistance aux antibiotiques

L'objectif de cette partie est de comparer la sensibilité aux antibiotiques avec la présence ou l'absence des plasmides dans des souches de BGN. 45 souches de BGN ont été sélectionnées pour faire l'objet de cette étude : 10 souches sensibles et 35 souches multi résistantes.

Les profils plasmidiques ont montré une corrélation significative entre la présence des plasmides et la résistance aux antibiotiques testés. Ainsi, les souches multi résistantes ont

montré la présence de plasmides de taille importante, alors que les souches sensibles n'ont montré aucune bande électrophorétique.

L'analyse des profils plasmidiques a montré que les souches de BGN multi résistantes hébergent de 1 à 4 plasmides de différentes tailles : 1Kb, 1,7Kb, 1,9Kb, 2Kb, 5Kb, 10Kb, 20Kb, 50Kb, 90Kb, 100Kb, 125Kb, 165Kb et 170Kb. Plusieurs études ont rapporté des plasmides de résistance de tailles comparables chez des souches de BGN multi résistantes.

**Shahid et al., (2008)** ont rapporté des souches de *K. pneumoniae* et *E. coli* multi résistantes (présentant le phénotype BLSE, CASE HN ou BLSE + CASE HN) hébergeant un plasmide de 19,9Kb. Dans une étude ultérieure, **Shahid (2010)** a rapporté des plasmides de 22Kb chez des souches de *Citrobacter freundii*. Ainsi, **Talmask et al., (1988)**, ont rapporté une souche multi résistante de *Klebsiella pneumoniae* hébergeant un plasmide de 48Kb avec des déterminants de résistance à l'amikacine, l'ampicilline, la kanamycine, et la tobramycine.

Dans une étude ivoirienne (**Gangoué Piéboji, 2007**), des plasmides de différentes tailles ( $\approx$  1 Kb, 2Kb, 10Kb, 50Kb et  $\approx$  90 kb) ont été décrits chez des entérobactéries multi résistantes. Ainsi, dans une étude indienne, un plasmide de 54,4Kb a été décrit chez des souches multi résistantes d'*Enterobacter cloacae* résistantes à : AMX, K, AK, C, NA, TE (**Raj, 2012**).

Dans une étude algérienne, **Baba Ahmed et al., (2012)** ont rapporté des plasmides d'environ 90Kb chez des souches d'EBLSE. Dans une étude faite dans un nouveau hôpital en Irak, **Huang et al., (2012)** ont également rapporté des plasmides de poids moléculaire entre 52 et 100Kb chez des entérobactéries multi résistantes.

Un large plasmide d'environ 126Kb a été rapporté par **Najar et al., (2000)** chez des souches multi résistantes de *K. pneumoniae*. Ces souches ont été résistantes à AMX, KF, TIC, CAZ, CTX, GM, TOB. De même, une étude algérienne (**Nedjai et al., 2012**) a décrit un plasmide d'environ 125Kb chez des souches de *K. pneumoniae*.

A l'issue des résultats obtenus, nous avons observé des profils électrophorétiques semblables entre des souches présentant des antibiogrammes très proches, ou entre des souches dérivant du même service, ou du même hôpital, isolées durant la même période. Ceci laisse supposer un échange rapide et facile de plasmides entre des souches bactériennes différentes évoluant dans le même foyer. Cependant, la présence de bandes communes entre les souches ne signifie pas

qu'elles possèdent la même séquence puisque des séquences différentes de l'ADN peuvent avoir la même taille (**Bakkali Yakhlef *et al.*, 2002**).

## **6.2. Transfert de la résistance et analyse des plasmides**

Dans cette partie, on s'est intéressé à caractériser les plasmides de résistance codant des BLSE. 24 souches d'entérobactéries potentiellement productrices de BLSE ont été sélectionnées pour la conjugaison (Tableau 35). Les résultats des expériences de la conjugaison ont montré que parmi ces souches, 10 (41,67%) ont transféré la résistance par BLSE à la souche *E. coli* HK 225. Toutes les souches transconjugantes ont montré un phénotype BLSE et une résistance à la gentamicine et/ou au cotrimoxazole. Par contre le transfert de la résistance aux fluoroquinolones n'a pas été observé.

**Tableau 35 : Concentrations minimales inhibitrices, sensibilité aux antibiotiques et profils plasmidiques des souches EBLSE sélectionnées et leur souche réceptrice**

Souche	Code	Hôpital	Service	Origine	CMI (µg/ml)							Autres marqueurs de résistance	Profil plasmidique Taille (Kb)
					AMX	AMC	CTX	CAZ	IPM	GM	CIP		
<i>K. oxytoca</i>	K.o4	KA	MF	Paillasse	>256	16	4	16	<1	8	<1	GM, FOS,C,NA,COT,TE	170
	K.o9	AS	SS	Mur	>256	16	4	16	1	8	<1	GM,AK,F,C,COT,TE	165
<i>K. terrigena</i>	K.t3	AS	SS	Lavabo	>256	32	>256	128	4	16	64	GM,TOB,FOS,OFX,CIP,COT,TE	170
<i>K. pneumoniae</i>	Kpp14	KA	MF	Paillasse	>256	16	>256	8	1	32	<1	GM,TOB,FOS,C,NA,OFX,COT,TE	165 :90 :60 :5
	Kpp17	KA	MH	Sonde	>256	12	>256	>256	4	64	64	GM,TOB,CIP,COT	125 :20 :1,7 :1
	Kpp18	AS	CHF	Sonde	>256	24	>256	>256	2	64	0,5	GM,TOB,FOS,COT	100 :10 :2 :1,7
	Kpo2	KA	BO	Respirateur	>256	16	8	64	2	2	<1	AK,TOB,C,NA,TE	90 :20 :5 :1,9
	Kpo13	AS	SS	Mur	>256	32	32	128	1	8	<1	GM,AK,TOB,FOS,NA,COT,TE	165 :50 :10
<i>E. cloacae</i>	El7	KA	SS	Sol	>256	>256	>256	>256	<1	32	128	GM,F,C,NA,OFX,CIP,COT,TE	125 :90 :5 :2
	El11	AS	MF	Lavabo	>256	32	48	>256	<1	32	<1	GM,TOB,F,FOS,C,COT,TE	100 :90 :50 :1
<i>E. sakazakii</i>	E.s2	KA	LAB	Eau	>256	24	16	32	<1	2	<1	AK,TOB,FOS,C,NA,OFX	170:20:1,9
	E.s6	BB	REA	Oreiller	>256	16	8	32	<1	8	<1	GM,TOB,NA,OFX,COT,TE	170 :50
<i>E. agglomerans</i>	Ea4	AS	LAB	Microscope	>256	16	8	64	<1	8	<1	GM,TOB,FOS,C,COT,TE	125 :20 :10
	E.a9	AS	SS	Sol	>256	16	8	128	<1	2	<1	AK,TOB,FOS,NA,OFX	125:90
<i>S. marcescens</i>	S.m4	KA	DCH	Toilette	>256	16	64	128	<1	32	<1	GM,TOB,FOS,NA,COT,TE	165 :100 :1,9 :1
	S.m23	AS	CHF	Sonde	>256	16	64	16	<1	64	64	GM,TOB,OFX,CIP,COT	90:20:1
<i>S. plymuthica</i>	S.p10	AS	LAB	microscope	>256	12	32	12	<1	16	<1	GM,TOB,FOS,C,COT,TE	50 :20 :1,7
	S.p11	AS	LAB	table	>256	12	8	16	<1	2	128	F,C,NA,OFX,CIP,COT,TE	170
	S.p26	KA	NEO	toilette	>256	12	16	16	<1	8	<1	GM,FOS,C,NA,COT,TE	170
<i>S. ficaria</i>	S.f5	AS	SS	Paillasse	>256	12	16	12	<1	2	>256	TOB,NA,OFX,CIP,COT	165:50
	S.f6	BB	MF	respirateur	>256	12	8	>256	<1	8	<1	GM,TOB,FOS,NA,OFX,COT,TE	165 :90 :20
<i>E. coli</i>	E.c5	BB	LAB	Etuve	>256	32	>256	96	<1	32	<1	GM,C,NA,COT,TE	20 :1,9 :1,7 :1
<i>C. freundii</i>	C.f3	KA	MH	Sonde	>256	48	16	>256	4	2	<1	TOB,F,FOS,C,NA,COT,TE	170 :20
	C.f4	AS	REA	Lit	>256	>256	>256	>256	1	64	64	GM,AK,TOB,F,NA,OFX,CIP,COT	125:50:20:2
<i>E. coli</i> HK225 (souche réceptrice)	<i>E. coli</i> HK225	/	/	/	2	1	2	2	<1	4	<1	/	/

**AS** : Alia Saleh; **KA** : Khaldi Abdelaziz; **BB** : Bouguerra Boulaaress; **BO** : Bloc opératoire; **NEO** : Néonatalogie; **REA** : Réanimation; **SS** : Salle de soins; **LAB** : laboratoire; **MF** : Médecine femme; **MH** : Médecine homme; **CHF** : Chirurgie femme; **DCH** : Déchoquage

L'analyse des profils plasmidiques des souches transconjugantes a montré le transfert des plasmides de différentes tailles : 10Kb, 20Kb, 125Kb ou 165Kb, qui ont transféré, en plus de la résistance par BLSE, la résistance à la gentamicine et au cotrimoxazole. Dans une étude algérienne, **Nejai *et al.*, (2012)** ont rapporté le transfert des plasmides de 125Kb et d'autres de taille plus importante (>125Kb). Cependant, dans une autre étude algérienne, **Messai *et al.*, (2008)** ont rapporté des plasmides de taille inférieure (77Kb et 85Kb), mais le co-transfert de la résistance à la gentamicine a également été signalé.

En Algérie, ce co-transfert a été démontré dans de nombreuses études. En effet, les gènes (aac(3)-II, aac(6)-Ib) codant la résistance aux aminosides en particulier la gentamicine ont été identifiés chez des souches cliniques d'entérobactéries sur des plasmides associés aux gènes codant des BLSE (CTX-M-3, CTX-M-15 et CTX-M- 28) et les gènes qnrB (**Touati *et al.*, 2006; Meradi *et al.*, 2011; Baba Ahmed-Kazi Tani *et al.*, 2013**). Par ailleurs, plusieurs études ont rapporté que les gènes de BLSE sont co- transférés avec des gènes de résistance à d'autres antibiotiques non  $\beta$ -lactamines (**Sirot *et al.*, 1988; Petit *et al.*, 1988; Livermore, 1995b; Al-Charrakh *et al.*, 2011**).

Les gènes codant pour les BLSE sont principalement situés sur des éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons), expliquant la rapidité de leur diffusion (**Patridge, 2011**). Les résistances associées aux BLSE peuvent être expliquées par le fait que les BLSE sont codées par des gènes qui sont fréquemment localisés sur de larges plasmides conjugatifs, et puisque ces plasmides sont facilement transférés entre les différents membres des entérobactéries, une accumulation des gènes de résistance résulte dans des souches contenant des plasmides de multi résistance (**Sirot, 1995; Bradford, 2001**). Enfin, l'épidémie d'EBLSE est autant une épidémie de supports de résistance qu'une épidémie de souches, comme l'a montré l'intrication entre différentes entérobactéries et différentes BLSE (**Lucet et Birgand, 2011**).

Concernant les CMI des souches transconjugantes, nous avons pu constater un haut niveau de résistance aux  $\beta$ -lactamines testées ainsi qu'à la gentamicine, puisque l'élévation des CMI a été entre 8 et 128 fois supérieure aux CMI mesurées pour la souche réceptrice (*E. coli* HK225).

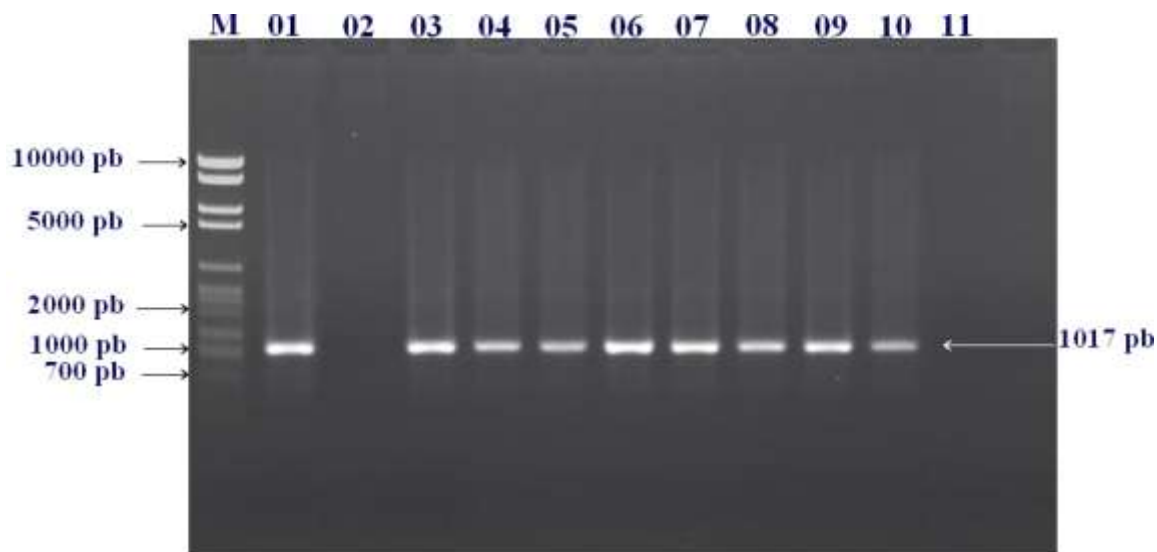
### 6.3. Détection des gènes codant pour la production des BLSE

Les 10 souches transconjugantes ont été soumises à la technique de PCR pour la recherche du type de gène codant les BLSE en utilisant les amorces spécifiques pour *bla TEM*, *bla SHV* et *bla CTX-M-1*. L'examen des produits de PCR après électrophorèse sur gel d'agarose a permis de noter que :

- 8 souches ont produit avec les amorces spécifiques de *bla SHV* des amplicons de 1017 pb (Figure 37) ; précédemment décrits dans plusieurs études (**Guessennd *et al.*, 2008**; **Gangoué Piéboji, 2007**; **Ahoyo *et al.*, 2007**).

- 5 souches ont donné des amplicons de 863 pb avec les amorces spécifiques de *bla CTX-M-1* (Figure 38) ; précédemment décrits par **Messai *et al.*, (2008)**.

- 5 souches dont trois productrices de BLSE SHV et deux autres de BLSE CTX-M-1 ont donné des produits PCR de 1100pb avec les amorces spécifiques de *bla TEM* (Figure 39) pareils à ceux rapportés par **Krishnamurthy *et al.*, (2013)**.



**Figure 37 : Gel d'agarose des produits PCR du gène *bla SHV***

**M** : Marqueur de poids moléculaire (Biomatik, 1Kb DNA ladder) ; **1** : *Salmonella sp* U2A1446 (contrôle positif) ; **2-11** : souches transconjugantes ; **2** : *E.coli* Hk225-Kpp14 ; **3** : *E.coli* Hk225-Kpp17 ; **4** : *E.coli* Hk225-Kpp18 ; **5** : *E.coli* Hk225-Kpo13 ; **6** : *E.coli* Hk225-EI7 ; **7** : *E.coli* Hk225-Ea4 ; **8** : *E.coli* Hk225-Ea9 ; **9** : *E.coli* Hk225-Sf6 ; **10** : *E.coli* Hk225-Cf3 ; **11** : *E.coli* Hk225-Cf4

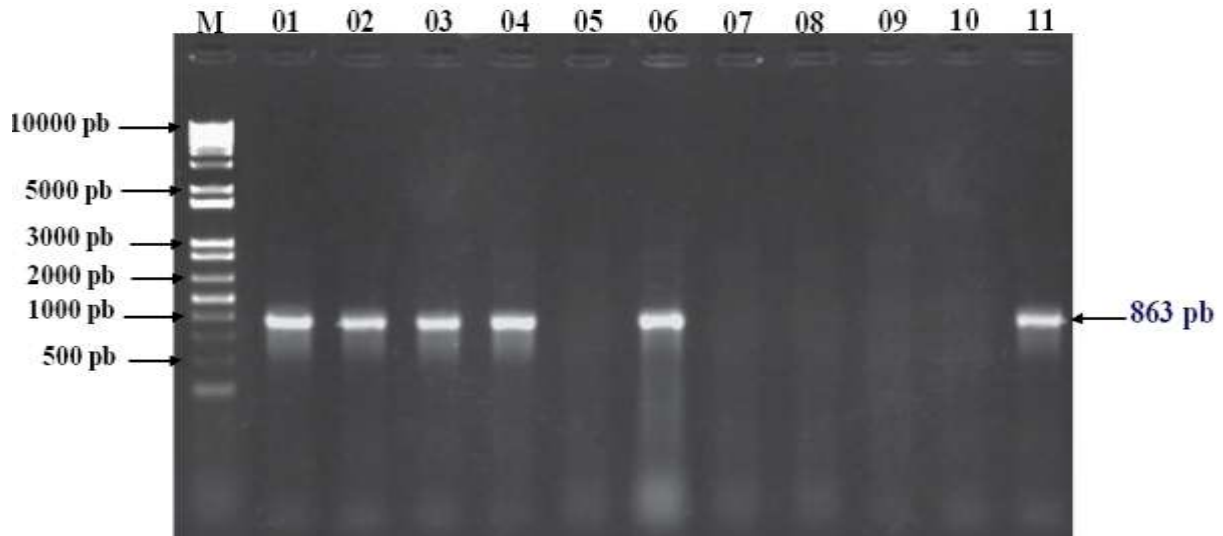


Figure 38 : Gel d'agarose des produits PCR du gène *bla CTX-M-1*

**M** : Marqueur de poids moléculaire (Biomatik, 1Kb DNA ladder) ; **1**, *E. coli* U2A1790 (contrôle positif) ; **2-11** : souches transconjugantes; **2** : *E.coli* Hk225-Kpp14 ; **3** : *E.coli* Hk225-Kpp17 ; **4** : *E.coli* Hk225-Kpp18 ; **5** : *E.coli* Hk225-Kpo13 ; **6** : *E.coli* Hk225-EI7; **7** : *E.coli* Hk225-Ea4; **8** : *E.coli* Hk225-Ea9; **9** : *E.coli* Hk225-Sf6; **10** : *E.coli* Hk225-Cf3; **11** : *E.coli* Hk225-Cf4

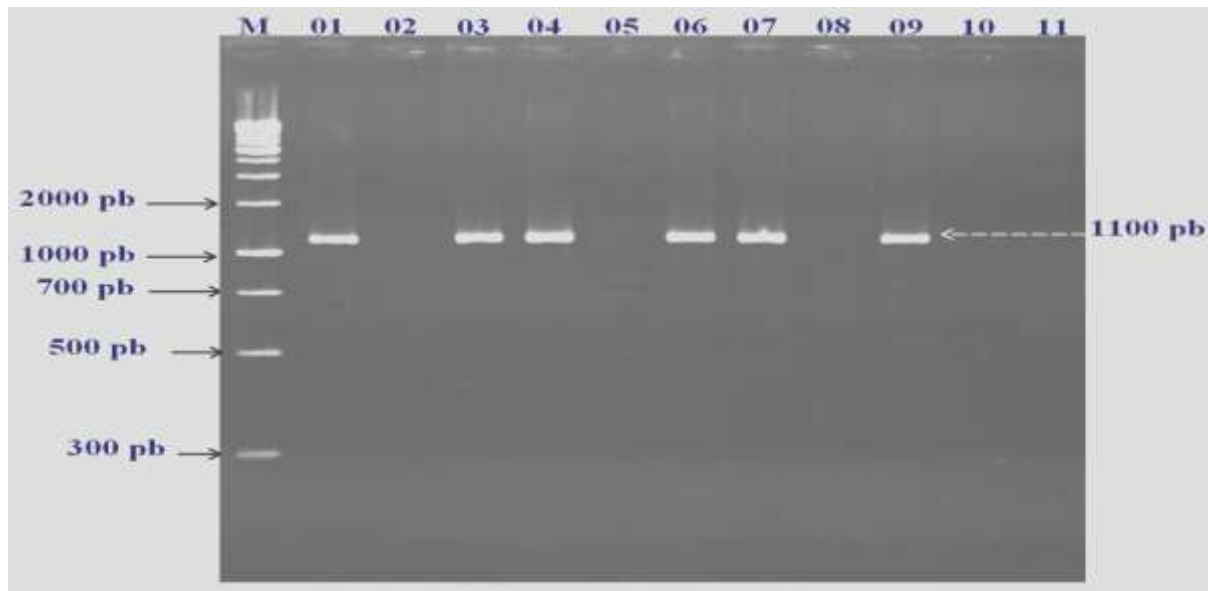


Figure 39 : Gel d'agarose des produits PCR du gène *bla TEM*

**M** : Marqueur de poids moléculaire (Biomatik, 1Kb DNA ladder) ; **1**, *Salmonella* U2A1446 (contrôle positif) ; **2-11** : souches transconjugantes; **2** : *E.coli* Hk225-Kpp17; **3** : *E.coli* Hk225-Kpp14 ; **4** : *E.coli* Hk225-Kpo13; **5** : *E.coli* Hk225-Kpp18; **6** : *E.coli* Hk225-Ea4; **7** :



*E. coli* Hk225-Sf6; **8** : *E. coli* Hk225-EI7; **9** : *E. coli* Hk225-Cf4; **10** : *E. coli* Hk225-Ea9; **11** : *E. coli* Hk225-Cf3.

La présence de plus d'un gène de BLSE a été observée chez 8/10 des souches étudiées : deux souches (*E. coli* HK225-Kpp14 et *E. coli* HK225-Cf4) ont combiné les gènes *bla TEM* et *bla CTX-M-1*, trois souches (*E. coli* HK225-Kpp17, *E. coli* HK225-Kpp18 et *E. coli* HK225-EI7) ont combiné les gènes *bla SHV* et *bla CTX-M-1*, et trois autres souches (*E. coli* HK225-Kpo13, *E. coli* HK225-Ea4 et *E. coli* HK225-Sf6) ont combiné les gènes *bla SHV* et *bla TEM* (Tableau 36).

**Tableau 36 : Caractéristiques des souches transconjugantes**

Souche transconjugante	Gène <i>bla</i>			Plasmides (Kb)
	<i>bla SHV</i>	<i>bla CTX-M-1</i>	<i>bla TEM</i>	
<i>E. coli</i> HK225-Kpp14	-	+	+	165
<i>E. coli</i> HK225-Kpp17	+	+	-	125
<i>E. coli</i> HK225-Kpp18	+	+	-	10
<i>E. coli</i> HK225-Kpo13	+	-	+	165
<i>E. coli</i> HK225-EI7	+	+	-	125
<i>E. coli</i> HK225-Ea4	+	-	+	125
<i>E. coli</i> HK225-Ea9	+	-	-	165
<i>E. coli</i> HK225-Sf6	+	-	+	20
<i>E. coli</i> HK225-Cf3	+	-	-	20
<i>E. coli</i> HK225-Cf4	-	+	+	125

Ces associations sont fréquemment rapportées dans plusieurs études. Dans une étude algérienne, **Nejai et al., (2012)**, ont rapporté l'association des gènes *bla TEM* et *bla CTX-M1* chez des souches du groupe KES. Une autre étude algérienne (**Meradi et al., 2011**) a rapporté la combinaison SHV-TEM et la combinaison TEM-CTX-M-1. **Krishnamurthy et al., (2013)** ont également rapporté la combinaison des gènes *bla TEM* et *bla CTX-M* et les gènes *bla SHV* et *bla CTX-M* chez des souches d '*E. coli*. **Guessend et al., (2008)** ont aussi rapporté les associations : TEM-SHV, SHV-CTX-M-1, TEM-CTX-M-1.

Quant aux plasmides codant les BLSE, l'analyse des résultats obtenus (Tableau 36) a montré que l'association des gènes *bla TEM* et *bla CTX-M-1* ainsi que la combinaison des gènes *bla SHV* et *bla TEM* sont portées sur des plasmides de 125Kb ou 165Kb. Alors que

pour l'association *bla CTX-M-1* et *bla SHV*, nous avons trouvé que ces gènes sont portés sur des plasmides de 10Kb ou 125Kb. Enfin pour le gène *bla SHV*, nous avons constaté qu'il est transféré grâce à des plasmides de 20Kb ou 125Kb. Nos résultats sont proches de ceux rapportés par **Nejai *et al.*, (2012)** qui ont trouvé que les gènes *bla TEM1* et *bla CTX-M-15* sont portés sur des plasmides de 125Kb et que le gène *bla SHV* est porté sur un plasmide de plus de 125Kb.

Les BLSE de type SHV sont très rarement trouvées chez certains genres d'entérobactéries tels *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, chez lesquels la céphalosporinase chromosomique est prédominante (**Jacoby, 1994 ; Livermore, 1995b**). Néanmoins, la BLSE SHV-4 a été mise en évidence chez *Serratia marcescens* et *Enterobacter cloacae* (**Philippon *et al.*, 1989**), la BLSE SHV-5 chez *S. marcescens* (**Gianneli *et al.*, 1994**), *E. cloacae* et *Citrobacter freundii* (**Venezia *et al.*, 1995**), la BLSE SHV-12 chez *C. freundii* et *E. cloacae* (**Gangoué Piéboji, 2000**). Dans notre travail, le type SHV a été trouvé chez les espèces *E. cloacae*, *E. agglomerrans*, *S. ficaria* et *C. freundii*. Cependant, on n'a pas déterminé le type de SHV.

En Algérie, différents types de BLSE SHV ont été décrits, dont le plus fréquemment rapporté est SHV12 (**Iabadene *et al.*, 2008; Iabadene *et al.*, 2009; Berrazeg *et al.*, 2013**).

La BLSE SHV-12 a été isolée pour la première fois en 1997 en Suisse chez une souche de *K. pneumoniae* isolée d'un patient venant de l'Afrique du Nord (**Nüesch-Inderbinnen *et al.*, 1997**). Depuis lors, cette BLSE a une répartition mondiale : Australie (**Howard *et al.*, 2002**), Canada (**Mulvey *et al.*, 2004**), Chine (**Chanawong *et al.*, 2002**), Croatie (**Bedenic *et al.*, 2001**), France (**Weill *et al.*, 2004**), Grèce (**Neonakis *et al.*, 2003**), Inde (**Dhawan *et al.*, 2003**), Italie (**Perilli *et al.*, 2002**), Japon (**Yagi *et al.*, 2000**), Corée (**Kim *et al.*, 1998**), Espagne (**Briñas *et al.*, 2003**), Taiwan (**Yan *et al.*, 2000**), Thaïlande (**Chanawong *et al.*, 2001**), Etats-Unis (**Wong-Beringer *et al.*, 2002**), Afrique du Sud (**Kruger *et al.*, 2004**), Tanzanie (**Blomberg *et al.*, 2005**), Cameroun (**Gangoué Piéboji, 2000**), RCA (**Frank *et al.*, 2006**), Tunisie (**Ben-Hamouda *et al.*, 2004**), Sénégal (**Cardinale *et al.*, 2000**) et Mali (**Weill *et al.*, 2004**). Le gène *bla SHV-12* apparaît alors être un gène particulièrement migratoire (**Gangoué Piéboji, 2007**).

Les BLSE de type SHV, TEM et CTX-M-1 ont été rapportées dans différentes études algériennes. **Touati *et al.*, (2008a)** ont révélé la présence de CTX-M-15 dans des souches environnementales de *K. pneumoniae* et *E. cloacae*, sachant que CTX-M-15 fait partie du

groupe de CTX-M-1 (**Gangoué Piéboji, 2007**). **Messai et al., (2008)** ont également rapporté des souches de *K. pneumoniae* portant les gènes *bla TEM* et *bla CTX-M-1*. Dans une autre étude, **Touati et al., (2010)**, ont rapporté, en plus de la présence de CTX-M-15, la détection de SHV-12 chez des souches de l'environnement. En Bénin, **Ahoyo et al., (2007)**, ont également rapporté la présence du gène *bla SHV* chez des souches environnementales d' *E. coli*.

La BLSE du type CTX-M a été rapportée pour la première fois en Europe Occidentale en 1989 et c'était la CTX-M-1. Cette enzyme a été détectée en Allemagne, en Italie et en France chez des espèces variées d'Entérobactéries. La CTX-M-15 a été identifiée pour la première fois en Inde et au Japon et a été par la suite mise en évidence dans plusieurs autres pays (Canada, Russie, Bulgarie, Pologne, France, Royaume uni, Turquie et Taiwan). Trois autres types de CTX-M ont été rapportés en Afrique, la CTX-M-2 (Afrique du Sud), la CTX-M-3 (RCA) et la CTX-M-12 (Kenya) (**Gangoué Piéboji, 2007**).

En Algérie, la résistance aux  $\beta$ -lactamines chez les entérobactéries est dominée par la production de BLSE de type CTX-M-3 et CTX-M-15 (**Baba Ahmed-Kazi Tani et Arlet, 2014**). Plusieurs études ont rapporté ces BLSE dans différents régions en Algérie : à Annaba (**Bouzidi et al., 2011; Nejai et al., 2012**), à Constantine (**Naas et al., 2005; Naas et al., 2011**), à Béjaia (**Touati et al., 2006; Touati et al., 2008 b, Gharout-Sait et al., 2012**), à Alger (**Ramdani-Bougoussa et al., 2006; Iabadene et al., 2008; Iabadene et al., 2009; Ramdani-Bougoussa et al., 2011; Touati et al., 2012; Kermas et al., 2012**) et à Tlemcen (**Baba Ahmed et al., 2012; Baba Ahmed-Kazi Tani et al., 2013**).

Il faut noter que les différents types de BLSE (CTX-M-1, TEM et SHV) trouvés dans notre étude font partie des BLSE dites transférables, ce qui explique la facilité du transfert entre les entérobactéries (**Philippon, 2013**).

La présence des souches environnementales productrices de BLSE de différents types peut agir comme un réservoir de gènes de résistance, qui peuvent être transmis horizontalement à des souches cliniques ou environnementales. En plus, elle constitue un facteur de risque des épidémies nosocomiales (**Touati et al., 2008a**). Par conséquent, l'environnement inanimé des patients (surfaces et objets), contaminé par des entérobactéries multi résistantes peut servir comme un réservoir secondaire pour une transmission croisée. En effet, plusieurs auteurs, ont rapporté des souches environnementales qui ont été identifiées comme sources d'épidémies

(**Touati et al., 2010**). Par ailleurs, la coexistence des différentes bêta-lactamases dans une même bactérie peut poser un problème de diagnostic et de thérapeutique (**Roh et al., 2008**).

#### **6.4. Recherche moléculaire de la résistance associée**

Le support de la résistance aux quinolones était supposé être uniquement chromosomique jusqu'en 1998 où, **Martinez-Martinez et al., (1998)** ont décrit la première souche dont le support de la résistance est un plasmide transférable (pMG252). Il a été ensuite démontré que le plasmide pMG252 hébergeait le gène *qnr A* codant pour une protéine, QNR A, de 218 acides aminés appartenant à la famille des protéines à motifs pentapeptidiques répétés qui protège le complexe ADN gyrase de l'inhibition par les quinolones (**Hooper, 2009**). Depuis, la résistance plasmidique aux quinolones a été rapportée dans le monde : États-Unis (**Wang et al., 2004**), Corée (**Jeong et al., 2005**), Allemagne (**Jonas et al., 2005**), France (**Cambau et al., 2006**). Quatre autres déterminants plasmidiques également impliqués dans la résistance aux quinolones ont été rapportés (*qnrB*, *qnrS*, *qnrC* et *qnrD*), ainsi que différentes variantes des protéines QnrA et QnrB (**Poirel et al., 2006; Wang et al., 2009; Cavaco et al., 2009**).

La résistance aux quinolones est codée par différents types de gènes dont les gènes *qnr* qui ont été identifiés dans différentes espèces d'entérobactéries et souvent associés à la production de bêta-lactamases à spectre élargi. Les gènes *qnr B* et *qnr S* ont été décrits dans peu de pays (**Guessennd et al., 2008**). En Algérie, les gènes de résistance aux fluoroquinolones sont d'identification plus récente. Les plus répandus sont les déterminants *qnr* (**Baba Ahmed-Kazi Tani et Arlet, 2014**). Pour cette raison, on s'est intéressé dans notre travail à rechercher les gènes *qnr A*, *B* et *S* chez les souches transconjugantes.

Les résultats de PCR ont permis de mettre en évidence le gène *qnr B* seulement chez deux souches *E. coli* HK225-EI7 et *E. coli* HK225-Cf4, dont leurs souches donatrices ont été résistantes à l'acide nalidixique, à l'ofloxacine et à la ciprofoxacine. Les gènes *qnrA* et *qnrS* n'ont pas été détectés. La figure 40 montre des amplicons du gène *qnr B*, de 594 pb, comme décrits par **Guessennd et al., (2008)**. Les gènes *qnr B* et *bla CTX-M-1* ont été transférés par des plasmides de 125Kb à la souche *E. coli* HK225. Ces résultats corroborent à ceux rapportés par **Meradi et al., (2011)** où des souches productrices de BLSE hébergeaient des plasmides de >125Kb portant le gène *qnr B* et le gène *CTX-M-1*. Le gène de type *qnrB* a également été rapporté, au Côte d'Ivoire par **Guessennd et al., (2008)** chez des souches productrices de BLSE.

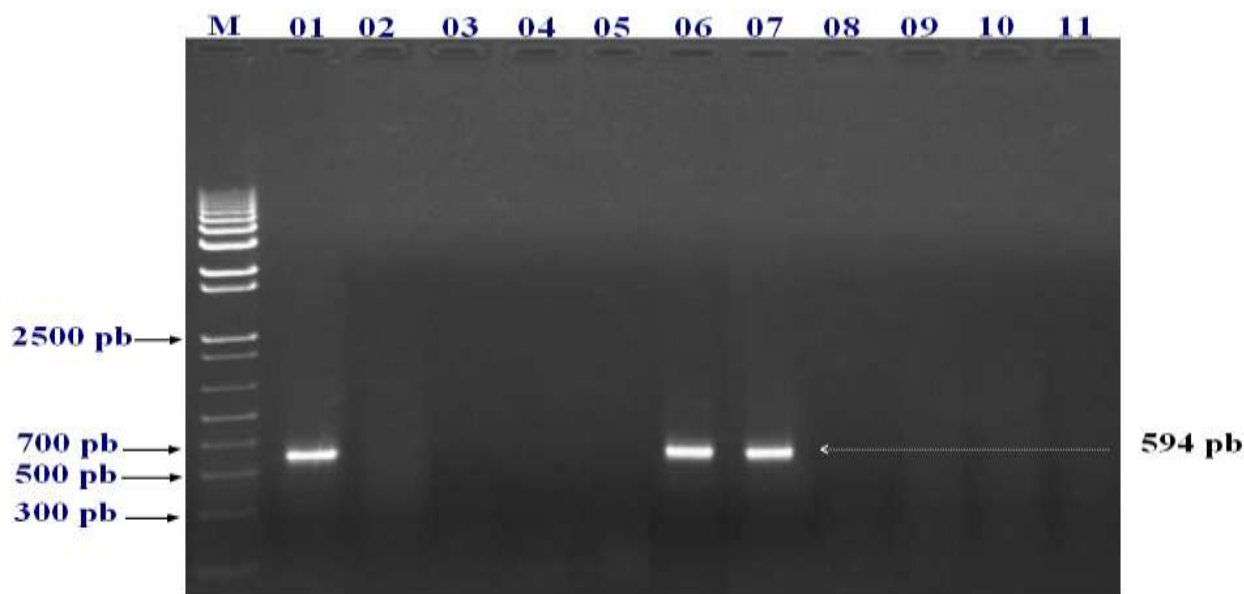


Figure 40 : Gel d'agarose des produits PCR du gène *qnr B*

**M** : Marqueur de poids moléculaire (Biomatik, 1Kb DNA ladder) ; **1** : *E. coli* UAA2118 (contrôle positif); **2-11** : souches transconjugantes; **2** : *E.coli* Hk225-Kpp14 ; **3** : *E.coli* Hk225-Kpp17 ; **4** : *E.coli* Hk225-Kpp18 ; **5** : *E.coli* Hk225-Kpo13 ; **6** : *E.coli* Hk225-EI7; **7** : *E.coli* Hk225-Cf4; **8** : *E.coli* Hk225-Ea9; **9** : *E.coli* Hk225-Sf6; **10** : *E.coli* Hk225-Cf3; **11** : *E.coli* Hk225-Ea4

Beaucoup d'études basées sur des approches moléculaires ont montré l'association entre les déterminants de la résistance aux quinolones et la production de BLSE (**Robicsek et al., 2006; Rodriguez-Martinez et al., 2006; Poirel et al., 2006; Ambrozic Avgustin et al., 2007; Fihman et al., 2008; Lavilla et al., 2008**). Dans notre travail, les deux souches qnr positives hébergeaient deux types de gènes *bla* : la souche *E.coli* Hk225-EI7 était CTX-M-1+ SHV et la souche *E.coli* Hk225-Cf4 était CTX-M-1 + TEM. Ce constat a été également fait à Abidjan en Côte d'Ivoire où des souches qnr hébergeaient au moins deux types de gènes *bla* (**Guessennd et al., 2008**).

Les deux souches qnr B positives (EI7 et Cf4) ont présenté un très haut niveau de résistance à la ciprofloxacine (CMI : 128 et 64 µg/ml), ce qui suggère la présence d'autres mécanismes de résistance tel que des mutations chromosomiques dans les gènes codant pour l'ADN gyrase et la pompe à efflux (**Hooper, 1999; Gu et al., 2004**) et qui n'ont pas été recherchés dans cette étude. Ainsi, ces souches ont montré un très haut niveau de résistance aux céphalosporines de troisième génération testées avec des CMI supérieures à 256 µg/ml. Ces

deux souches ont aussi été résistantes à la gentamicine, mais les niveaux de résistance sont différents.

Les deux transconjugants *E. coli* HK225-E17 et *E. coli* HK225-Cf4 ont montré une diminution de sensibilité à la gentamicine, ce qui indique un cotransfert des gènes de BLSE et d'aminoglycosides. Ces transconjugants ont aussi révélé une diminution de sensibilité à la ciprofloxacine comparativement à la souche réceptrice *E. coli* HK225.

Cependant, le niveau de résistance aux quinolones transférée par le gène *qnr* est relativement faible, puisque l'augmentation des CMI de la ciprofloxacine par rapport aux CMI mesurées vis-à-vis de la souche *E. coli* HK225 est faible. Cette augmentation est peu visible sur l'antibiogramme par diffusion.

L'analyse du contenu plasmidique des souches hébergeant le gène *qnrB* et de leurs transconjugants a montré que le gène *qnr B* et le gène *blaCTX-M-1* sont portés par un même plasmide de haut poids moléculaire (125 Kb). Beaucoup d'études ont rapporté des plasmides conjugatifs dont le poids moléculaire varie entre 40 et 320 kb comme support des gènes de BLSE et les gènes de résistance aux quinolones (**Wang et al., 2003; Mammeri et al., 2005; Ambrozic Avgustin et al., 2007; Lavilla et al., 2008**).

# **Conclusion et perspectives**

## Conclusion et perspectives

Actuellement, on assiste à l'émergence dans nos structures hospitalières des bactéries Gram négatives multirésistantes aux antibiotiques. La dissémination de ces souches dépend d'une part des « réservoirs » et d'autre part de la transmission des germes. Les différents réservoirs potentiels de ces bactéries sont les patients eux-mêmes, le personnel soignant, le matériel médical et l'environnement.

Ces agents pathogènes nosocomiaux peuvent bien survivre ou persister sur des surfaces pour des mois et peuvent ainsi être une source de transmission en continu en l'absence de désinfection régulière préventive des surfaces.

Le rôle particulier de l'environnement dans la propagation des bactéries multi résistantes dans les hôpitaux a été longtemps considéré comme négligeable. A l'échelle nationale, très peu d'études ont été faites dans ce contexte, et les données épidémiologiques concernant la fréquence des bacilles Gram négatifs dans l'environnement font défaut.

Dans cette optique, notre étude a porté sur l'isolement, l'identification biochimique, l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches de bacilles Gram négatifs à partir de l'environnement hospitalier, et la caractérisation moléculaire des souches multi résistantes, particulièrement les entérobactéries productrices des BLSE.

Les résultats de l'identification ont permis de caractériser 306 souches de BGN, dont 74,51% appartiennent aux entérobactéries, 19,61% des BGNnf, et 5,88% appartiennent à d'autres genres de BGN. Les bactéries du groupe K.E.S sont les plus fréquemment isolées (69,28%). La répartition en fonction des espèces a montré que les espèces prédominantes sont : *Serratia marcescens*, *Serratia plymuthica*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*. En revanche, de rares entérobactéries ont été isolées : *Ewingella americana* et *Cedecea neteri*. Quant aux BGNnF, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* prédominent alors que la fréquence d'isolement d'*Acinetobacter baumannii* est négligeable. En fonction des services, le laboratoire, les unités des soins et la réanimation ont présenté des fréquences élevées de BGN. Les sites les plus contaminés ont été les surfaces du proche environnement des patients et précisément ceux couramment touchés comme les bords des lits, les lavabos, les tables et les oreillers.



L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a montré que les souches de BGN isolées expriment une résistance à tous les antibiotiques des différentes familles, mais à des degrés variables. Les taux de résistance les plus élevés ont été marqués à l'égard des différentes  $\beta$ -lactamines avec une efficacité remarquable de l'imipénème. Les aminosides et les fluoroquinolones restent actifs sur la majorité des souches à l'exception de *B. cepacia* montrant des taux élevés de résistance. Le taux de contamination environnementale par les BGNMR est important, il est de 19,07%.

Concernant, les EBLSE, les tests de détection ont permis de caractériser 114 souches productrices de BLSE, soit 50% des entérobactéries isolées, représentées majoritairement par le groupe KES. Le taux de contamination environnementale par les EBLSE a été relativement important (12,87%). Ces souches ont montré un très haut niveau de résistance à l'égard des bêta-lactamines, et des taux élevés de résistance aux antibiotiques : NA, COT, FOS, TE.

L'analyse des profils plasmidiques a montré que les souches de BGN multi résistantes hébergent de 1 à 4 plasmides de différentes tailles allant de 1Kb à 170Kb. Les expériences de la conjugaison réalisées sur des souches EBLSE ont montré le transfert des plasmides de 10Kb, 20Kb, 125Kb ou 165Kb qui ont co-transféré, la résistance à la gentamicine et au cotrimoxazole.

Les PCR des souches transconjugantes ont permis de mettre en évidence les gènes *bla CTX-M-1*, *bla TEM* et *bla SHV*, souvent en association. Concernant la recherche moléculaire de la résistance aux quinolones, les résultats ont montré la présence des gènes *qnrB* transférés sur des plasmides de 125Kb.

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

En plus, il faut adopter un programme de surveillance spécifique pour chaque service en tenant en considération les spécificités des services et leur capacité de contribuer aux infections. L'organisme hospitalier doit évaluer régulièrement la qualité du nettoyage et de la désinfection de l'environnement physique. L'application de ces mesures de base permettra de contribuer à la limitation de la contamination de l'environnement hospitalier et ainsi de la survenue des infections nosocomiales.

Notre étude a attiré l'attention sur le risque d'émergence et de dissémination des BGNMR, dans l'environnement et le risque de leur transmission aux malades. Par ailleurs, on a pu montrer la présence des déterminants de résistance sur des plasmides conjugatifs, ce qui favorise leur mobilité et leur dissémination. Des mesures de contrôle devraient donc être envisagées afin d'instaurer un système de veille nationale, pour superviser l'émergence et la propagation des gènes de résistance.

Les résultats de notre étude permettent aussi de fournir des données épidémiologiques sur les souches de l'environnement au niveau des établissements hospitaliers de Tébessa. Ce type d'étude d'incidence représente un des éléments épidémiologiques qui peut être intégré dans un programme plus global de lutte contre la dissémination des bactéries multi-résistantes.

A notre connaissance, cette étude constitue la première documentant la contamination de l'environnement hospitalier, dans la région de Tébessa. C'est ainsi la première étude régionale caractérisant des BGNMR d'origine environnementale, dans un contexte non-épidémique.

Notre travail ouvre de nombreuses perspectives :

- ✓ Optimiser les méthodes et les milieux de prélèvements pour les différents types de BGN afin d'améliorer la sensibilité et la précision des données.
- ✓ Identifier les relations clonales entre les souches isolées d'un patient hébergeant une bactérie BGN multi résistante et celles isolées de son environnement par l'analyse des fragments de restriction.
- ✓ Des rapports prospectifs contrôlés sont nécessaires pour élucider correctement le rôle joué par la contamination des surfaces et de l'air (et de décontamination) dans la transmission des agents pathogènes nosocomiaux.

# **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

### A

1. Abid F, Boutefnouchet N, Dekhil M, Bouzerna N. *Klebsiella pneumoniae* productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) isolées dans les hôpitaux de la ville de Annaba, Algérie. *Scientific study & Research* 2007; VII (2) : 199-214.
2. Adjidé CC, De Meyer A, Weyer M, Obin O, Lamory F, Lesueur C, Trouillet L, Biendo M, Eb F, Ganry O. Evaluation des risques microbiologiques hydriques associés à *Stenotrophomonas maltophilia* et *Pseudomonas aeruginosa* au CHU d'Amiens. *Pathologie Biologie* 2010; 58 : e1-e5.
3. Aguilera A, Pascual J, Loza E, Lopez J, Garcia G, Lianio F, Quereda C, Ortufno J. Bacteraemia with *Cedecea neteri* in a patient with systemic lupus erythematosus. *Postgrad Med J* 1995; 71: 179-180.
4. Ahoyo AT, Baba-Moussa L, Makoutode M, Gbohoun A, Bossou R, Dramane K, Sanni A, Prévost G. Incidence de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline dans le service de néonatalogie du centre hospitalier départemental du Zou et des Collines au Bénin. *Archives de pédiatrie* 2006; 13 : 1391-1396.
5. Ahoyo AT, Baba-Moussa L, Anago AE, Avogbe P, Missihoun TD, Loko F, Prévost G, Sanni A, Dramane K. Incidence d'infections liées à *Escherichia coli* producteur de bêta lactamase à spectre élargi au Centre hospitalier département du Zou et Collines au Bénin. *Médecine et maladies infectieuses* 2007; 37 : 746-752.
6. Al-Charrakh AH, Yousif SY, Al-Janabi HS. Occurrence and detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella* isolates in Hilla, Iraq. *African Journal of Biotechnology* 2011; 10 (4): 657-665.
7. Ambler RP. The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond (Biol)* 1980; 289: 321-331.
8. Ambrozic Avgustin J, Keber R, Zerjavic K, Orazem T, Grabnar M. Emergence of the quinolone resistance-mediating gene aac (6')-Ib-cr in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella* isolates collected in Slovenia between 2000 and 2005. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 4171-3.

9. Ameziane N, Bogard M, Lamoril J. Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. Elsevier Masson, 2006, 705p.
10. Auajjar N, Attrassi B, Elhaloui N, Badoc A. Multirésistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* et *Staphylococcus aureus* et survie sur divers tissus hospitaliers. *Bull Soc Pharm Bordeaux* 2006; 145 : 61-76.
11. Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H. Bactériologie clinique. 2<sup>ème</sup> édition. Ellipses, Paris, 1992, 511p.
12. Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H. Bactériologie clinique. 3<sup>ème</sup> édition. Ellipses, Paris, 2000, 602 p.
13. Ayliffe GAJ. Role of the environment of the operating suite in surgical wound infection. *Rev Infect Dis* 1991; 13 (suppl 10): S800-4.

## B

14. Baba Ahmed Z, Ayad A, Mesli E, Messai Y, Bakour R, Drissi M. CTX-M- 15 extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae in the intensive care unit of Tlemcen Hospital, Algeria. *East Mediterr Health J* 2012; 18: 382-6.
15. Baba Ahmed-Kazi Tani Z, Decré D, Genel N, Boucherit-Otmani Z, Arlet G, Drissi M. Molecular and epidemiological characterization of enterobacterial multi-drug-resistant strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008-2010). *Microb Drug Resist* 2013; 19:185-90.
16. Bakkali Yakhlef SE, Assali NE, Amara AK, Belabed AM. Analyse de la diversité génétique des plasmides d'*Escherichia coli* antibiorésistants causant la colibacillose aviaire. *Actes Inst Agron Vet (Maroc)* 2002; 22(2): 103-108.
17. Bale MJ, Bennett PM, Benninger JE, Hinton M. The survival of bacteria exposed to dessication on surfaces associated with farm buildings. *Journal of Applied Bacteriology* 1993; 75:519-528.
18. Barbier F, Wolff M. Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa* vers l'impasse thérapeutique. *Med Sci (Paris)* 2010; 26 (11): 960-968.

19. Bathily MD. Sensibilité aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif isolées d'infections urinaires de 1999 à 2001. Thèse de doctorat en Pharmacie. Université de Bamako, Mali, 2002, 88p.
20. Bauer TM, Ofner E, Just HM, Daschner FD. An epidemiological study assessing the relative importance of airborne and direct contact transmission of microorganisms in a medical intensive care unit. *J Hosp Infect* 1990; 15: 301-9.
21. Bear N, Klugman KP, Tobiansky L, Koornhof HJ. Wound colonization by *Ewingella americana*. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 650-651.
22. Beaudreuil S, Hebibi H, Charpentier B, Durrbachr A. Les infections graves chez les patients en dialyse péritonéale et en hémodialyse chronique conventionnelle : péritonites et infections de la voie d'abord vasculaire. *Réanimation* 2008; 17: 233-241.
23. Bedenic B, Randegger CC, Stobberingh E, Hächler H. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases from *Klebsiella pneumonia* strains isolated in Zagreb, Croatia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20: 505-508.
24. Ben Jaballah N, Bouziri A, Kchaou W, Hamdi A, Mnif K, Belhadj S, Khaldi A, Kazdaghli K. Épidémiologie des infections bactériennes nosocomiales dans une unité de réanimation néonatale et pédiatrique tunisienne. *Médecine et maladies infectieuses* 2006; 36 : 379-38.
25. Ben Romdhane F, Bouguerra C, Sahnoun O, Loussaief C, Kacem B, Mastouri M, Tabka-Stambouli R, Chakroun M, Bouzouaia N. Les bactéries multi-résistantes isolées chez les malades hospitalisés dans un service de maladies infectieuses. *Rev Tun Infectiol* 2007; 1 (4):12-15.
26. Ben-Hamouda T, Foulon T, Ben-Mahrez K. Involvement of SHV-12 and SHV-2a encoding plasmids in outbreaks of extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian neonatal ward. *Microb Drug Resist* 2004; 10:132-138.
27. Bercault N, Poisson DM, Linassier P, Cami G, Gueveler C. Evolution de la résistance à l'imipénème de *Pseudomonas aeruginosa* en réanimation polyvalente. *Réan Urg* 1994; 3 (5) : 579-584.
28. Berche P, Gaillard JL, Simonet M. Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. 1<sup>ère</sup> édition. Médecine-sciences Flammarion, 1988, 660p.

29. Berche P, Gaillard JL, Simonet M. Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. Collection de la biologie à la clinique. 3<sup>ème</sup> édition. Médecine-Sciences-Flammarion, France, 1991, 660p.
30. Bergogne-Bérézin E, Dellamonica P. Antibiothérapie en pratique clinique. 2<sup>ème</sup> édition. Masson, Paris, 1999, 496p.
31. Berrazeg M, Drissi M, Medjahed L, Rolain JM. Hierarchical clustering as a rapid tool for surveillance of emerging antibiotic resistance phenotypes in *Klebsiella pneumoniae* strains. *J Med Microbiol* 2013; 62: 864-74.
32. Berthelot P, Grattard F, Mahul P. Exogenous contamination of mechanically ventilated patients by *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*. In : CIPI, Nice, 1998a, S804.
33. Berthelot P, Grattard F, Ros A, Lucht F, Pozzetto B. Nosocomial legionellosis outbreak over a three-years period investigation and control. *Clin Microbiol Infect* 1998b; 4: 385-91.
34. Berthelot P, Mallaval FO, Fascia P, Turco M, Lucht F. Maîtrise des moyens de prévention de l'infection urinaire nosocomiale : sondes et techniques. *Médecine et maladies infectieuses* 2003; 33 : 499-505.
35. Berthelot P, Grattard F, FO Mallaval, Ros A, Lucht F, Pozzetto B. Épidémiologie des infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia*. *Pathologie Biologie* 2005; 53: 341-348.
36. Bertrand X, Blasco G, Belle E, Boillot A, Capellier G, Talon D. Importance de la transmission croisée dans l'épidémiologie de *Pseudomonas aeruginosa* en service de soins intensifs. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 2003; 22: 505-509.
37. Bimar MC, Hajjar J, Pottecher B. Risque infectieux nosocomial en anesthésie. Recommandations générales. *Ann Fr Anesth Réanim* 1998 ; 17 : 392-402.
38. Birnboim HC. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* 1983; 100: 243 - 255.
39. Blomberg B, Juren R, Manji KP, Tamin BS, Mwakagile DSM, Urassa WK, Fataki M, Msangi V, Tellevik MG, Maselle SY, Langeland Y. High rate of fatal cases of pediatric septicemia caused by Gram-negative bacteria with extended-spectrum beta-lactamases in Dar Es Salaam, Tanzania. *J clin Microb* 2005; 43: 745-749.

40. Boissel P, Proye C, Pathologie chirurgicale. Tome 1: Chirurgie générale vasculaire et endocrinienne. Masson, Paris, 1991, 451p.
41. Bonilla HF, Zervos MJ, Kauffman CA. Long-term survival of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on a contaminated surface (letter). *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996; 17 (12): 770-2.
42. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother* 2004; 48: 1-14.
43. Bonten MJM, Hayden MK, Nathan C, van Voorhis J, Matushek M, Slaughter S, Rice T, Weinstein RA. Epidemiology of colonization of patients and environment with vancomycin-resistant enterococci. *The Lancet* 1996; 348:1615-1619.
44. Boukerzaza S. Etude génétique et moléculaire du phénotype de résistance des *Salmonella enterica* sérotype Senftenberg. Mémoire de Magistère : Génétique moléculaire. Université Mentouri de Constantine, 2006, 92p.
45. Boulard G, Ravussin P, Humayou J. Prévention de l'infection urinaire nosocomiale au cours du sondage vésical. *Ann Fr Anesth Reanim* 1992; 11 : 720-723.
46. Bourgeois CM, Mesle JF, Zucca J. Microbiologie alimentaire : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Tome 1. Edition Lavoisier, Collection sciences et techniques, Paris, 1996, 672p.
47. Bousseboua H. Éléments de microbiologie : Programme de graduation : biologie, médecine, pharmacie, chirurgie dentaire, sciences vétérinaires, sciences alimentaires, agronomie. 2<sup>ème</sup> édition. Edition Campus-Club, 2005, 304p.
48. Boutoille D. Thérapeutique des infections à bactéries multirésistantes : le point sur la recherche clinique. Maladies Infectieuses et Tropicales CHU de Nantes. DESC Maladies Infectieuses, 2012, 80 p.
49. Bouzidi N, Aoun L, Dekhil M, Granier SA, Poirel L, Brisabois A, *et al.* Co-occurrence of aminoglycoside resistance gene *armA* in non-Typhoid *Salmonella* isolates producing CTX-M-15 in Algeria. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 2180-1.
50. Boyadjiev I, Leone M, Garnier F, Albanèse J, Martin C. Prise en charge des pneumonies acquises sous ventilation mécanique : Revue générale. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 2006; 25 : 761-772.



51. Boyce JM, Potter-Bynoe G, Chenevert C, King T. Environmental contamination due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : possible infection control implications. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997; 18: 622-9.
52. Boyd DA, Tyler S, Christianson S, Mc Geer A, Muller MP, Willey BM. Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term facilities in Toronto, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3758-64.
53. Bradford PA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 933-951.
54. Brenner DJ, Farmer JJ, Noel R, Krieg JT. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, (The *Proteobacteria*), Part B (The *Gammaproteobacteria*), 2<sup>ème</sup> Edition vol. 2. Springer-Verlag, New York, 2005, 1106p.
55. Bricha S, Ounine K, Oulkheir S, EL Haloui NE, Attarassi B. Facteurs de virulence et épidémiologie liés au *Pseudomonas aeruginosa*. *Revue tunisienne d'infectiologie* 2009; 2 : 7-14.
56. Briñas L, Moreno MA, Teshager T, Zarazaga M, Sáenz Y, Porrero C, Dominguez L, Torres C. Beta-lactamase characterization in *Escherichia coli* isolates with diminished susceptibility or resistance to extended-spectrum cephalosporins recovered from sick animals in Spain. *Microb Drug Resist* 2003; 9: 201-09.
57. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1211–1233.
58. Buttery JP, Alabaster SI, Heine RG, Scott SM, Crutchfield RA, Birgham A *et al.* Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a pediatric oncology ward related to bath toys. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17 (6) : 509-13.

C

59. Calbo E, Freixas N, Xercavins M, Riera M, Nicolas C, Monistrol O, *et al.* Foodborne nosocomial outbreak of SHV1 and CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology and control. *Clin Infect Dis* 2011; 52:743-9.
60. Cambau E, Lascols C, Sougakoff W, Bébéar C, Bonnet R, Cavallo JD, *et al.* Occurrence of qnrA-positive clinical isolates in French teaching hospitals during 2002-2005. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12(10): 1013-20.
61. Carbonelle B, Denis F, Marmonier A, Pinon G, Vargues R. Bactériologie médicale, techniques usuelles. Edition SIMEP, France, 1987, 330p.
62. Cardinale E, Colbachini P, Perrier-Gros-Claude JD, Gassama A, Aidara-Kane A. Dual emergence in food and humans of a novel multiresistant serotype of *Salmonella* in Senegal: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 35: C: 12. *J Clin Microbiol* 2000; 39: 2373-2374.
63. Carle S. Les infections nosocomiales. *L'actualité pharmaceutique* 2005; pp1-8.
64. Carlet J. Comment prendre en charge les bactéries vraiment multi-résistantes. *Pathologie infectieuse MAPAR* 2006; 589-592.
65. CA-SFM. AntibioGramme en diffusion. Recommandations techniques et Guide d'interprétation. Communiqué 1998 du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. *Sanofi Diagnostics Pasteur*, 12p.
66. CA-SFM. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Communiqué, 1999. *Pathol Biol* 1999 ; 47 : 845-72.
67. CA-SFM. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Recommandations 2008. 50 p.
68. Cattoir V. Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie Biologie* 2004; 52 (10): 607-616.
69. Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM. qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar kentucky and bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 603-8.

70. Cavallo JD, De Mouy D, Fabre R, Garrabe E, Armengaud M. *Pseudomonas aeruginosa* en pratique de ville : étude AFORCOPIBIO 1995-1996. *Méd mal infect* 1998; 28: 258-259.
71. Cavallo JD, Plesiat P, Couetdic G, Leblanc F, Fabre R. Mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: prevalence of OprM-overproducing strains in a French multicentre study. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50 (6): 1039-1043.
72. Chabaa L, Makoumba-Nzambi MM, Masrar S, Tligui H, Zouhdi M, Alaoui MA. *Pseudomonas aeruginosa* : état actuel de l'épidémiologie et de l'antibiorésistance au CHU de Rabat-salé L. *Biologie infectiologie* 2000; Tome VI(2):34-44.
73. Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum beta-lactamases in Gram negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48: 839-852.
74. Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Xiong JH, Hawkey PM. Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among Enterobacteriaceae in the People's Republic of China. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 630-637.
75. Chastre J. Infections due to *Acinetobacter baumannii* in the ICU. *Semin Respir Crit Car Med* 2003; 24(1): 069-078.
76. Chefson-Girault C, Gotty S. Infections liées à l'environnement. Formation des correspondants en hygiène hospitalière. CHU- Hôpitaux de Rouen, 2008, 45 p.
77. Cholley P. Analyse génétique des souches multi-résistantes de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'Est de la France, apport prédictif potentiel sur le risque infectieux. Thèse de doctorat : Recherche clinique, Innovation technologique, Santé publique. Université de Franche-Comté, France, 2010, 161 p.
78. Claudon A, Meunier O, Arpin C, Quentin C, Christmann D, Koffel JC, Jehl F. Les bactéries productrices de bêtalactamases à spectre étendu : étude au centre hospitalo-universitaire de Strasbourg. *Médecine et maladies infectieuses* 2002; 32 : 228-240.
79. Clave D. Fiche technique : *Aeromonas hydrophila*. Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique. Laboratoire de Bactériologie Hygiène CHU Toulouse, 2010, 4p.
80. Clavilier L, Hervieu F, Letodé O. Gènes de résistance aux antibiotiques et plantes transgéniques, Edition INRA, Paris, 2001, 206p.

81. Constantiniu S, Romaniuc A, Iancu LS, Filimon R, Tarași I. Cultural and biochemical characteristics of *Acinetobacter* spp. Strains isolated from hospital units. *The Journal of Preventive Medicine* 2004; 12 (3-4): 35- 42.
82. Corthier G, Rampal P, Beaugerie L, Marteau P. Colites infectieuses de l'adulte. Edition John Libbey Eurotext, Paris, 2001, 261p.
83. Corvaglia AR. Rôle des résidus d'antibiotiques dans les environnements hydriques sur la sélection et la diffusion de bactéries résistantes des genres *Aeromonas*, *Acinetobacter* et *Legionella*. Thèse de doctorat en sciences : Biologie. Université de Genève, 2006, 230p.
84. Cosgrove SE, Kaye KS, Eliopoulous GM, Carmeli Y. Health and economic outcomes of the emergence of third-generation cephalosporin resistance in *Enterobacter* species. *Arch Intern Med* 2002; 162: 85-190.
85. Courvalin P. Centre national de référence de la résistance aux antibiotiques (C.R.A.B). Rapport annuel d'activité 1999. Institut Pasteur, 85 p.
86. Crivaro V, Bagattini M, Salza MF, Raimondi F, Rossano F, Triassi M, Zarrilli R. Risk factors for extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Serratia marcescens* and *Klebsiella pneumoniae* acquisition in a neonatal intensive care unit. *Journal of Hospital Infection* 2007; 67: 135-141.
87. CTIN : Comité Technique national des Infections Nosocomiales. Surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé : air, eaux et surfaces. Ministère chargé de la santé, 2002; 78p.

## D

88. D'Agata EM, Venkataraman L, De Girolami P, Samore M. Molecular epidemiology of ceftazidime-resistant Gram negative bacilli on inanimate surfaces and their role in cross-transmission during nonoutbreak periods. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3065-3067.
89. Da Costa PS, Tostes MM, de Carvalho Valle LM. A case of keratoconjunctivitis due to *Ewingella americana* and a review of unusual organisms causing external eye infections. *Braz J Infect Dis* 2000; 4: 262-7.
90. Dancer SJ. How do we assess hospital cleaning? A proposal for microbiological standards for surface hygiene in hospitals. *J Hosp Infect* 2004; 56:10-15.

91. Dancer SJ. The role of environmental cleaning in the control of hospital-acquired infection. *J Hosp Infect* 2009; 73:378-385.
92. De Champs C, Sirot D, Chanal C, Poupart MC, Dumas MP, Sirot J. Concomitant dissemination of three extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among different Enterobacteriaceae isolated in a French hospital. *J Antimicrobial Chemother* 1991; 27:441-7.
93. De la Maza LM, Pezzlo MT, Shigei JT, Peterson EM. Color Atlas of Medical Bacteriology. Washington, DC: ASM Press, 2004, 316 p.
94. Delarras C. Microbiologie. 90 heures de Travaux pratiques. *Gaëtan Morin, France*, 1998, 276p.
95. Delmas C. Fiche technique : *Cedecea neteri* Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique. Laboratoire de Bactériologie CHU Purpan. 2003, 2 p.
96. Dembele D. Antibio prophylaxie dans les services de chirurgie générale et pédiatrique de l'hôpital Gabriel Toure (Mali). Thèse de doctorat en médecine. Mali: Université de Bamako, 2005, 139p.
97. Denis F, Ploy MC, Martine C, Bingen E, Quentin R. Bactériologie médicale: techniques usuelles. Paris, Elsevier Masson SAS, 2007, 640p.
98. Devreese K, Claeys G, Verschraegen G. Septicemia with *Ewingella americana*. *J Clin Microbiol* 1992; 30 (10): 2746-2747.
99. Dhawan B, Bonnet R, Shukla NK, Mathur P, Das BK, Kapil A. Infection with an extended-spectrum beta-lactamase-producing strain of *Serratia marcescens* following tongue reconstruction. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2233-2234.
100. Didier R. Dictionnaire de maladies infectieuses diagnostic-épidémiologie-répartition géographique-taxonomie-symptomatologie. Editions scientifiques et médicales, Elsevier Masson, Paris, 1998, 1162p.
101. Doi Y, Wachino JI, Ishiguro M, Kurokawa H, Yamane K, Shibata N, Shibayama K, Yokoyama K, Kato H, Yagi T, Arakawa Y. Inhibitor sensitive AmpC  $\beta$ -lactamase variant produced by an *Escherichia coli* clinical isolate resistant to oxyiminocephalosporins and cephamycins. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2652-2658.

- 102.** Doran TI. The role of *Citrobacter* in clinical disease of children: Review. *Clinical Infectious Diseases* 1999; 28(2): 384-394.
- 103.** Doublet B. Caractérisation des éléments génétiques mobiles du gène de résistance au florfénicol *floR* chez *Salmonella enterica* et *Escherichia coli*. Thèse de Doctorat de Sciences de la Vie et de la Santé. Université François Rabelais (Tours), Tours, France, 2004, 107 p.
- 104.** Drabick JA, Gracely EJ, Heidecker GJ, Lipuma JJ. Survival of *Burkholderia cepacia* on environmental surfaces. *J Hosp Infect* 1996; 32: 267- 76.
- 105.** Drees M, Snyderman DR, Schmid CH, Barefoot L, Hansjosten K, Vue PM, *et al.* Prior environmental contamination increases the risk of acquisition of vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis* 2008; 46(5):678-85.
- 106.** Duckro AN, Blom DW, Lyle EA, Weinstein RA, Hayden MK. Transfer of vancomycin-resistant enterococci via health care worker hands. *Archives of Internal Medicine* 2005; 165:302-307.
- 107.** Dupray E. Hétérogénéité phénotypique et pouvoir pathogène de Vibrionaceae isolées de zones littorales bretonnes. Thèse de doctorat en sciences pharmaceutiques. Université Paris-Sud, 1986, 159 p.
- 108.** Durocher A, Hajjar J, Hugonnet S. Prévention de la transmission des micro-organismes en réanimation. Indicateurs et modalités de surveillance. *Réanimation* 2002 ; 11 : 288-301.

## **E**

- 109.** Eisenstein B, Zaleznif D. Enterobacteriaceae. In : Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Vol 2. 5<sup>ème</sup> édition, Churchill Livingstone. 2000 : 2294-2310.
- 110.** Elouennass M, Bajou T, Lemnouer AH, Foissaud V, Hervé V, Baaj AJ. *Acinetobacter baumannii* : étude de la sensibilité des souches isolées à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V, Rabat, Maroc. *Médecine et maladies infectieuses* 2003; 7 (33): 361-364.
- 111.** Emmerson AM, Hawkey PM, Gillespie S. Principles and Practice of Clinical Bacteriology, J. Wiley & Sons, 1997, 802p.

112. Engelhart S, Krizek L, Glasmacher A, Fischnaller E, Marklein G, Exner M. *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a haematologyoncology unit associated with contaminated surface cleaning equipment. *Journal of Hospital Infection* 2002; 52:93-98.
113. Eyquem A, Alouf J, Montagnier JL. *Traité de microbiologie clinique : deuxièmes mises à jour et compléments*. PICCIN, 2000, 238p.

## F

114. Falk PS, Winnike J, Woodmansee C, Desai M, Mayhall CG. Outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a burn unit. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2000; 21:575-582.
115. Farmer III JJ, Sheth NK, Hudzinsky JA, Rose HD, Asbury MF. Bacteremia due to *Cedecea neteri* sp. nov. *J Clin Microbiol* 1982; 16: 775-8.
116. Farrington M, Brenwald N, Haines D, Walpole E. Resistance to dessication and skin fatty acids in outbreak strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 1992; 36 (1) : 56-60.
117. Fauchère JL. *Bactériofiches. Techniques en Bactériologie Clinique*. Edition Ellipses, 1997, 174p.
118. Faure S. Transfert d'un gène de résistance aux  $\beta$ -lactamines *bla*CTX-M-9 entre *Salmonella* et les entérobactéries de la flore intestinale humaine : impact d'une antibiothérapie. Thèse de doctorat : Biologie et santé. Université de rennes 1 (France) 2009, 184p.
119. Fazeli H, Akbari R, Moghim Sh, Narimani T, Arabestani MR, Ghoddousi AR. *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients, hospital means, and personnel's specimens. *Journal of Research in Medical Sciences* 2012; 17(4): 332-337.
120. Fernandez-Cuenca F, Martinez-Martinez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:565-74.
121. Ferroni A, Sermet-Gaudelus I, Abachin E, Quesnes G, Lenoir G, Berche P, J.L. Gaillard. Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des souches atypiques de

- bacilles à Gram négatif non fermentants isolées chez des patients atteints de mucoviscidose. *Pathologie Biologie* 2003; 51: 405-411.
122. Fierobe L, Lucet JC, Decre D, Muller-Serieys C, Deleuze A, Joly-Guillou ML, Mantz J, Desmots JM. An outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in critically ill surgical patients. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2001, 22:35-40.
123. Figarella J, Leyral G, Terret M. Microbiologie générale et appliquée. Collection Sciences et techniques biologiques. Editions Delagrave, 2007, 285p.
124. Fihman V, Lartigue MF, Jacquier H, *et al.* Appearance of aac (6)-Ib-cr gene among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in a French hospital. *J Infect* 2008; 56: 454-9.
125. Fitzpatrick F, Murphy OM, Brady A, Prout S, Fenelon LE. A purpose built MRSA cohort study. *Journal of Hospital Infection* 2000; 46:271-279.
126. Flanagan PG, Paull A. Isolation of *Burkholderia cepacia* by enrichment. *J Clin Pathol* 1998; 51 : 557-8.
127. Flandrois JP. Bactériologie Médicale. Presses universitaires de Lyon, 1997, 309p.
128. Floret N, Bertrand X, Thouverez M, Talon D. Infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa* : origine exogène ou endogène de la bactérie responsable ? *Pathologie Biologie* 2009; 57 : 9-12.
129. Frank T, Arlet G, Gautier V, Talarmin A, Bercion R. Extended spectrum  $\beta$ -Lactamase-producing Enterobacteriaceae, Central African Republic. *Emerging Infect Dis* 2006; 12: 863-865.
130. Frebourg NB, Berthelot G, Hocq R, Chibani A, Lemeland JF. Septicemia due to *Pasteurella pneumotropica*: 16S rRNA sequencing for diagnosis confirmation. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40 (2): 687-689.

## G

131. Gaillon S, Nagorzanski G, Buisson Y. Le linge peut-il avoir des propriétés antibactériennes ? Evaluation d'un nouveau procédé. *Hygiène S* 1996 ; 14 : 50-54.
132. Galleni M, Lamotte-Brasseur J, Rossolini GM, Spencer J, Dideberg O, Frère JM. the metallo-  $\beta$ -lactamase working group. Standard numbering scheme for class B  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother* 2001; 45: 660-663.



133. Gangoué Piéboji J. Résistance des bacilles à Gram négatif aux antibiotiques: prévalence et caractérisation des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi à l'Hôpital Central de Yaoundé. Thèse de Doctorat de 3<sup>e</sup> cycle, Université de Yaoundé I, 2000, 210 p.
134. Gangoué-Piéboji J. Caractérisation des bêta-lactamases et leur inhibition par les extraits de plantes médicinales. Thèse de doctorat en sciences : Biochimie, Université de Liège, 2007, 104p.
135. Gassama Sow A. Etude du rôle des intégrons dans la multi résistance aux antibiotiques des bactéries entéropathogènes isolées en Afrique sub-saharienne. Thèse de doctorat en microbiologie. France : Université de Limoges, 2004, 97 p.
136. Gautam V, Singhal L, Ray P. *Burkholderia cepacia* complex: Beyond *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2011; 29 (1): 4-12.
137. Gerar D, Philippe S. La maîtrise des maladies infectieuses, " un défi de santé publique une ambition médico- scientifique ", Académie des sciences, EDP Sciences, 2006, 440p.
138. Gharout-Sait A, Touati A, Benallaoua S, Guillard T, Brasme L, Madoux J, *et al.* CTX-M from community-acquired urinary tract infections in Algeria. *Afr J Microbiol Res* 2012; 6: 5306-13.
139. Gianneli D, Tzelepi E, Tzouvelekis LS, Mentis AF, Nikolopoulou C. Dissemination of cephalosporin-resistant *Serratia marcescens* strains producing a plasmidic SHV type  $\beta$ -lactamase in Greek hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 764-767.
140. Goetz AM, Stout JE, Jacobs SL, Fisher MA, Ponzer RE, Drenning S, *et al.* Nosocomial legionnaire's disease discovered in community hospitals following cultures of the water system: seek and ye shall find. *Am J Infect Control* 1998; 26 (1): 8-11.
141. Goldmann DA, Hoskins WC. Control of nosocomial antimicrobial-resistant bacteria: a strategic priority for hospitals worldwide. *Clin Infect Dis* 1997; 24 (Suppl. 1): S139-S145.
142. Grare M, Dibama HM, Lafosse S, Ribon A, Mourer M, Regnouf-de-Vains JB, *et al.* Cationic compounds with activity against multidrug-resistant bacteria: interest of a new compound compared with two older antiseptics, hexamidine and chlorhexidine. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 432-8.
143. Grattard F, Pozzetto B. Marqueurs moléculaires enquête de bactéries nosocomiales épidémiques. *Hygiene S* 1999; 7 (4): 371-7.

144. Gray JW, George RH. Experience of vancomycin-resistant enterococci in a children's hospital. *Journal of Hospital Infection* 2000, 45:11-18.
145. Grimont PA, Farmer JJ III, Grimont F, Asbury MA, Brenner DJ, Deval C. *Ewingella americana* gen.nov., sp.nov., a new *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *Ann Microbiol (Paris)* 1983; 134A: 39-52.
146. Grundmann H, Kropec A, Hartung D, Berner R, Daschner F. *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive unit : reservoirs and ecology of nosocomial pathogen. *J Infect Disease* 1993; 168 (4): 943-7.
147. Gu Y, Zhang J, Yu Y, Zhou Z, Du X. Drug-resistant mechanisms and prevalence of *Enterobacter cloacae* resistant to multi-antibiotics. *Chin J Nosocomiol* 2004; 14: 1321-4.
148. Guessennnd N, Bremont S, Gbonon V, Kacou-NDouba A, Ekaza E, Lambert T, Dosso M, Courvalin P. Résistance aux quinolones de type qnr chez les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi à Abidjan en Côte d'Ivoire. *Pathologie Biologie* 2008; 56 (7-8) : 439-446.
149. Guet-Revillet H, Le Monnier A, Breton N, Descamps P, Lecuyer H, Alaabouche I, Bureau C, Nassif X, Zahar JR. Environmental contamination with extended-spectrum  $\beta$ -lactamases : Is there any difference between *Escherichia coli* and *Klebsiella spp* ? *American Journal of Infection Control* 2012; 40: 845-8.
150. Guillaume PY. Les milieux de culture en microbiologie. 2004.

## H

151. Hajjar H, Hartemann P, Luu-Duc D, Nicolle MC, Perraud M, Bertrou A, Cetre JC, Chapuis C, Guignement S, Fabry J. Vigilance environnementale : Contrôles microbiologiques de l'environnement hospitalier. *HYGIENES* 2000; VIII(3) : 139-179.
152. Hammond DS, Schooneveldt JM, Nimmo GR, Huygens F, Giffard PM. *blaSHV* genes in *Klebsiella pneumoniae*: different allele distributions are associated with different promoters within individual isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 256-263.
153. Hanna H, Raad I, Gonzalez V, Umphrey J, Tarrand J, Neumann J, Champlin R. Control of nosocomial *Clostridium difficile* transmission in bone marrow transplant patients. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2000; 21:226-228.

154. Hanna H, Umphrey J, Tarrand J, Mendoza M, Raad I. Management of an outbreak of vancomycin-resistant enterococci in the medical intensive care unit of a cancer center. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2001; 22:217-219.
155. Hayden MK, Blom DW, Lyle EA, Moore CG, Weistein RA. Risk of hand or glove contamination after contact with vancomycin-resistant enterococcus or the colonized patients' environment. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; 29(2):149-54.
156. Heizmann WR, Michel R. Isolation of *Ewingella americana* from a patient with conjunctivitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10: 957-959.
157. Helps CR, Harbour DA, Corry JEL. "PCR-based 16S ribosomal DNA detection technique for *Clostridium estertheticum* causing spoilage in vacuum-packed chill-stored beef," *International Journal of Food Microbiology* 1999; 52 (1-2): 57-65.
158. Henry DA, Campbell ME, Lipuma JJ, Speert DP. Identification of *Burkholderia cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis and use of a simple new selective medium. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 614-9.
159. Hirai Y. Survival of bacteria under dry conditions from a viewpoint of nosocomial infection. *Journal of Hospital Infection* 1991; 19:191-200.
160. Holmes B, Aucken HM, Collier L, Balows A, Sussman M. *Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Serratia* and other members of the *Enterobacteriaceae*. In (Eds.), *Microbiology and Microbial infections: Systematic Bacteriology* 9<sup>ème</sup> édition. London : Arnold, 1998, pp. 999-1033.
161. Hooper DC. Mechanism of action and resistance. *Drug Resist Updat* 1999; 2: 38-55.
162. Hota B. Contamination, Disinfection, and Cross-Colonization: Are Hospital Surfaces Reservoirs for Nosocomial Infection? *Clinical Infectious Diseases* 2004; 39: 1182-1189.
163. Hota S, Hirji Z, Stockton K, *et al.* Outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization and infection secondary to imperfect intensive care unit room design. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009; 30:25-33.
164. Howard C, Daal A, Kelly G, Schooneveld J, Nimmo G, Giffard MP. Identification and minisequencing-based discrimination of SHV  $\beta$ -lactamases in nosocomial infection-associated *Klebsiella pneumoniae* in Brisbane, Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 659-664.

165. Huang XZ, Frye JG, Chahine MA, Glenn LM, Ake JA, Su W, Nikolich MP, Lesho EP. Characteristics of plasmids in Multi-Drug-Resistant Enterobacteriaceae isolated during prospective surveillance of a newly opened hospital in Iraq. *PLoS ONE* 2012; 7(7), e40360: 8p.
166. Huslage K, Rutala WA, Sickbert-Bennett E, Weber DJ. A quantitative approach to defining “high-touch” surfaces in hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010; 31:850-853.

## I

167. Iabadene H, Messai Y, Ammari H, Ramdani-Bougoussa N, Lounes S, Bakour R, *et al.* Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 133-6.
168. Iabadene H, Messai Y, Ammari H, Alouache S, Verdet C, Bakour R, *et al.* Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases among Enterobacteriaceae in Algiers hospitals. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34: 340-2.
169. Igbinosa EO, Okoh AI. *Vibrio Fluviialis*: an unusual enteric pathogen of increasing Public Health Concern. *Int J Environ Res Public Health* 2010; 7(10): 3628-3643.
170. Inglis PW, Peberdy JF. Isolation of *Ewingella americana* from the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Curr Microbiol* 1996; 33: 334-7.
171. Isenberg H. Enterobacteriaceae. In : Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR : Infectious Diseases. Saunders, 1992: 1463-1478.

## J

172. Jacoby GA, Sutton L. Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 164-9.
173. Jacoby GA. The genetics of extended-spectrum beta-lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13 : 2-11.
174. Jalalpoor S. Study of the antibiotic resistance pattern among the bacterial isolated from the hospital environment of Azzahra Hospital, Isfahan, Iran. *African Journal of Microbiology Research* 2011; 5 (20): 3317-3320.

175. Janda JM, Abbott SL. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clinical Microbiology Reviews* 2010; 23 (1): 35-73.
176. Jarvis WR, Martone WJ. Predominant pathogens in hospital infections. *J Antimicrob Chemother* 1992; 29 (Suppl. A): 19-24.
177. Jawad A, Heritage J, Snelling AM, Gascoyne-Binzi DM, Hawkey PM. Influence of relative humidity and suspending menstrua on survival of *Acinetobacter* spp. on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2881-7.
178. Jawad A, Seifert H, Snelling AM, Heritage J et Hawkey PM. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic cases. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1938-41.
179. Jehl F, Meunier O, Monteil H. L'antibiogramme des bacilles à Gram négatif aérobies-stricts opportunistes. *Revue française des laboratoires* 1995; 277 : 29-33.
180. Jeong JY, Yoon HJ, Kim ES, Lee Y, Choi SH, Kim NJ, *et al.* Detection of qnr in clinical isolates of *Escherichia coli* from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2522-4.
181. Jonas D, Biehler K, Hartung D, Spitzmüller B, Daschner FD. Plasmid mediated quinolone resistance in isolates obtained in german intensive care units. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(2): 773-5.

## K

182. Kaatz GW, Gitlin SD, Schaberg DR, Wilson KH, Kauffman CA, Seo SM, Fekety R. Acquisition of *Clostridium difficile* from the hospital environment. *American Journal of Epidemiology* 1988; 127:1289-1294.
183. Kac G, Podglajen I, Vaupré S, Colardelle N, Buu-Hoï A, Gutmann L. Molecular epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated from environmental and clinical specimens in a cardiac surgery intensive care unit. *J Hosp Infect* 2004; 25:852e855.
184. Kallel H, Dammak H, Mahjoubi F, Bahloul M, Chelly H, Chaari A, Rekik N, Hammami, Bouaziz M. Apport diagnostique de l'écouvillonnage de la zone d'insertion cutanée dans l'exploration des infections liées aux cathéters veineux centraux dans un

- service de réanimation médicochirurgicale. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 2005; 24 : 1343-1348.
- 185.** Kati C, Bibashi E, Kokolina E, Sofianou D. Case of peritonitis caused by *Ewingella americana* in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3733- 3734.
- 186.** Kermas R, Touati A, Brasme L, Le Magrex-Debar E, Mehrane S, Weill FX, *et al.* Characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* serotype Brunei and Heidelberg at the Hussein Dey hospital in Algiers (Algeria). *Foodborne Pathog Dis* 2012; 9: 803-8.
- 187.** Kim J, Kwon Y, Pai H, Kim JW, Cho DT. Survey of *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum beta-lactamases: prevalence of SHV-12 and SHV-2a in Korea. *J clin Microbiol* 1998; 36: 1446-1449.
- 188.** Kliebe C, Nies BA, Meyer RM, wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28: 302-307.
- 189.** Knothe HP, Shah V, Kreméry M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983; 11: 315-317.
- 190.** Kohler T, Pechere JC, Plesiat P. Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance. *Cell Mol Life Sci* 1999; 56: 771-8.
- 191.** Kola A, Holst M, Chaberny IF, Ziesing S, Suerbaum S, Gastmeier P. Surveillance of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing bacteria and routine use of contact isolation: experience from a three-year period. *J Hosp Infect.* 2007; 66:46–51.
- 192.** Kourta D. 18% des hospitalisés sont contaminés. *El Watan*, 05- 05- 2013.
- 193.** Kramer A, Schwebke I et Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces ? A systematic review. *BMC Infectious Diseases* 2006; 6 (130): 8 p.
- 194.** Krishnamurthy V, Vijaykumar GS, Sudeepa Kumar M, Prashanth HV, Prakash R, Nagaraj ER. Phenotypic and genotypic methods for detection of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from ventilator associated pneumonia. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2013; 7 (9): 1975-1978.

195. Kruger T, Szabo D, Keddy KH, Deeley K, Marsh JW, Hujer AM, Bonomo RA, Paterson DL. Infections with nontyphoidal *Salmonella* species producing TEM-63 or a novel TEM enzyme, TEM-131, in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4263-4270.

## L

196. Lahsoun M, Boutayeb H, Zerouali K, Belabbes H, El Mdaghri N. Prévalence et état de sensibilité aux antibiotiques d'*Acinetobacter baumannii* dans un CHU marocain. *Médecine et maladies infectieuses* 2007; 37: 828-831.
197. Lashéras A, Guisset O, Boulestreau H, Rogues AM, Fiore M, Szajner S, Bezian MC, Gabinski C, Gachie JP. Réservoirs et transmission de *Pseudomonas aeruginosa* en réanimation médicale. *Médecine et maladies infectieuses* 2006; 36 : 99-104.
198. Lavigne JP, Gaillard JB, Bourg G, Tichit C, Lecaillon E, Sotto A. Étude de souches de *Stenotrophomonas maltophilia* sécrétrices de BLSE : détection de CTX-M et étude de la virulence. *Pathologie Biologie* 2008; 56 : 447-453.
199. Lavilla S, Gonzales-Lopez J, sabate M, Garcia Fernandez A, Larrosa MN, Bartolome RM, et al. Prevalence of qnr genes among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase- producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 291-5.
200. Leclerc H, Gaillard JP, Simonet M. Microbiologie générale : la bactérie et le monde bactérien. Edition Doin, Paris, 1995, 535p.
201. Lemmen SW, Häfner H, Zolldann D, Stanzel S, Lütticken R. Distribution of multi-resistant Gram-negative versus Gram-positive bacteria in the hospital inanimate environment. *Journal of Hospital Infection* 2004; 56:191-197.
202. Léone M, Arnaud S, Boisson C, Blanc-Bimar MC, Martin C. Infections urinaires nosocomiales sur sonde en réanimation : physiopathologie, épidémiologie et prophylaxie. *Ann Fr Anesth Réanim* 2000 ; 1 : 23-34.
203. Lepoivre PH. Phytopathologie. 1<sup>ère</sup> édition. De Boeck Université, Bruxelles, 2003, 427p.
204. Liassine N. Problème des pathogènes Gram négatif résistants aux antibiotiques en milieu hospitalier. *Schweiz Med Wochenschr* 2000; 130(50): 1930-1936.

- 205.** Liazid A. Etude de la résistance aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif non fermentantes au niveau du C.H.U de Tlemcen. Mémoire de magister. Option : Maîtrise de la qualité microbiologique et du développement microbien. Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, 2012, 95 p.
- 206.** Lidwell OM, Lowbury W, Blowers R, Stanley SI, Lowe D. Effect of ultraclean air in operating rooms on deep sepsis in the joint after total hip or knee replacement: a randomised study. *Br Med J* 1982; 285 (6334): 10-14.
- 207.** Lidwell OM, Lowbury EJ, Whyte W, Blowers R, Stanley SJ, Lowe D. Airborne contamination of wounds in joint replacement operations : the relationship to sepsis rates. *J Hosp Infect* 1983; 4: 111-31.
- 208.** Lidwell OM, Elson RA, Lowbury EJ, Whyte W, Blowers R, Stanley SJ, Lowe D. Ultraclean air and antibiotics for prevention of postoperative infection. A multicenter study of 8,052 joint replacement operations. *Acta Orthop Scand* 1987; 58 : 4-13.
- 209.** Ling ML, Ang A, Wee M, Wang GC. A nosocomial outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* originating from an intensive care unit. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2001; 22:48-49.
- 210.** Livermore DM.  $\beta$ -lactamase mediated resistance: past, present and future. *J Infect Dis Soc* 1995a; (6): 75-83.
- 211.** Livermore DM.  $\beta$ -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995b; 8:557-584.
- 212.** Lowe C, Willey B, O'Shaughnessy A, Lee W, Lum M, Pike K, Larocque C, Dedier H, Dales L, Moore C, McGeer A, and the Mount Sinai Hospital Infection Control Team. Outbreak of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella oxytoca* infections associated with contaminated handwashing sinks. *Emerging Infectious Diseases* 2012; 18(8):1242-1247.
- 213.** Lucet JC. Facteurs de risque de colonisation- infection par les bactéries multi résistantes (BMR). *Rean Urg* 1997; 6 (2 bis): 187-192.
- 214.** Lucet JC, Birgand G. Les bacilles à Gram négatif multi-résistants : où va-t-on ? *Journal des Anti-infectieux* 2011; 13 (2) : 122-132.



## M

- 215.** Maertens J, Delforge M, Vandenberghe P, Boogaerts M, Verhaegen J. Catheter-related bacteremia due to *Ewingella americana*. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 103-104.
- 216.** Maki DG, Alvarado CJ, Hassemer CA, Zilz MA. Relation of the inanimate hospital environment to endemic nosocomial infection. *N Engl J Med* 1982; 307: 1562-6.
- 217.** Mammeri H, Van De Loo M, Poirel L, Martinez-Martinez L, Nordmann P. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 71-6.
- 218.** Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML, Silver LC, Jarvis WR. The Hospital Infection Practice Advisory Committee. Guideline for prevention of surgical site infection 1999. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999; 20: 247-80.
- 219.** Mansour W, Bouallegue O, Dahmen S, Boujaafar N. Caractérisation des mécanismes enzymatiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines chez des souches de *Acinetobacter baumannii* isolées à l'hôpital universitaire Sahloul, Sousse en Tunisie (2005). *Pathologie Biologie* 2008; 56 (3) : 116-120.
- 220.** Marc V, Anne-Lise BG, Hervé B, Robin D, André P. Microbiologie et pathologie infectieuse. 2<sup>ème</sup> édition américaine de Boeck université, 1999, 973p.
- 221.** Martinez JA, Ruthazer R, Hansjosten K, Barefoot L, Snyderman DR. Role of environmental contamination as a risk factor for acquisition of vancomycin-resistant enterococci in patients treated in a medical intensive care unit. *Archives of Internal Medicine* 2003; 163:1905-1912.
- 222.** Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998; 351: 797-9.
- 223.** Matagne A, Lamotte-Brasseur J, Frère JM. Catalytic properties of class A  $\beta$ -lactamases: efficiency and diversity. *Biochem J* 1998; 330: 581-598.
- 224.** Matthew P, Muller MD. Résistance des bactéries Gram-négatif due aux bêta-lactamases. *Maladies infectieuses et Microbiologie* 2004; 3 (6) : 15-23.
- 225.** Maza ML, Pezzlo TT, Peterson ME, Shigei TJ. Color Atlas of Medical Bacteriology. ASM Press, Washington, 2004, 316p.

226. McCarthy KM, Van Nierop W, Duse A, Von Gottberg A, Kassel M, Perovic O, Smego R. Control of an outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in an oncology ward in South Africa: effective use of limited resources. *Journal of Hospital Infection* 2000; 44:294-300.
227. McGuckin MB, Thopre RJ, Abrutyn E. Hydrotherapy : an outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* wound infections related to Hubbard tank treatments. *Arch Phys Med Rehabil.* 1981; 62 (6): 283-5.
228. McNeil MM, Davis BJ, Solomon SL, Anderson RL, Shulman ST, Gardner S, Kabat K, Martone WJ. *Ewingella americana*: recurrent pseudobacteremia from a persistent environmental reservoir. *J Clin Microbiol* 1987; 25(3): 498-500.
229. Meradi M, Djahoudi A, Abdi A, Bouchakour M, Perrier Gros Claude JD, Timinouni M. Résistance aux quinolones de types qnr, aac (6')-Ib-cr chez les entérobactéries isolées à Annaba en Algérie. *Pathologie Biologie* 2011; 59: e73-e78.
230. Merrer J, Carbonne A. Recommandations nationales pour la prévention de la transmission croisée : quoi de neuf pour la pratique quotidienne en réanimation ? *Réanimation* 2010; 19: 361-365.
231. Messai Y, Iabadene H, Benhassine T, Alouache S, Tazir M, Gautier V, Arlet G, Bakour R. Prevalence and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Pathologie Biologie* 2008; 56 : 319-325.
232. Meyer A, Deiana J, Bernard A. Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. 2<sup>ème</sup> édition. Biosciences et techniques, Doin, 2004, 430p.
233. Mirabaud MI. Entérobactéries à bêta-lactamases à spectre élargi en pédiatrie en 1996. Thèse de doctorat en médecine. Suisse : Université de Genève, 2003, 52 p.
234. Moulin M, Coquerel A. Pharmacologie. 2<sup>ème</sup> édition. Masson, Paris, 2002, 840p.
235. Mouterde O, Vassal S, Malandin J, Massot J, Mallet E. *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* dans l'environnement d'enfants atteints de mucoviscidose. *Med Mal Infect* 1995; 25: 727-32.
236. Muller HE, Fanning GR, Brenner DJ. Isolation of *Ewingella americana* from mollusks. *Curr Microbiol* 1995; 31(5): 287-290.

**237.** Mulvey RM, Bryce E, Boyd D, Ofner-Agostini M, Christianson S, Simor ES, Paton S, & the Canadian Hospital Epidemiology Committee of The Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program, Health Canada. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Canadian hospitals. *Antimicrob Agents Chemoter* 2004; 48: 1204-1214.

## N

**238.** Naas T, Lezzar A, Bentchouala C, Smati F, Scheftel JM, Monteil H, *et al.* Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Senftenberg isolates producing CTX-M bêta-lactamases from Constantine, Algeria. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 439-40.

**239.** Naas T, Bentchouala C, Cuzon G, Yaou S, Lezzar A, Smati F, *et al.* Outbreak of *Salmonella enterica* serotype Infantis producing ArmA 16S RNA methylase and CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase in a neonatology ward in Constantine, Algeria. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 38: 135-9.

**240.** Nadjar D, Rouveau M, Verdet C, Donay JL, Herrmann JL, Lagrange PH, Philippon A, Arlet G. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing transferable AmpC-type  $\beta$ -lactamase (ACC-1) originating from *Hafnia alvei*. *FEMS Microbiology Letters* 2000; 187: 35-40.

**241.** Nedjai S, Barguigua A, Djahmi N, Jamali L, Zerouali K, Dekhil M, Timinouni M. Prevalence and characterization of extended spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. *Médecine et maladies infectieuses* 2012; 42: 20-29.

**242.** Neely AN, Maley MP. Survival of *Enterococci* and *Staphylococci* on hospital fabrics and plastic. *J Clin Microbiol* 2000; 38(2): 724-726.

**243.** Neely AN. A survey of gram-negative bacteria survival on hospital fabrics and plastics. *Journal of Burn Care and Rehabilitation* 2000; 21:523-527.

**244.** Neonakis IK, Scoulica EV, Dimitrio SK, Gikas AI, Tselentis YJ. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates in a university hospital in Greece: detection of SHV-5 in *Pseudomonas aeruginosa* and prevalence of SHV-12. *Microb Drug Resist* 2003; 9: 161-165.

245. Nordmann P, Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Plésiat P. Naturally Occurring Class A  $\beta$ -Lactamases from the *Burkholderia cepacia* Complex. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(3): 876-882.
246. Noskin GA, Stosor V, Cooper I, Peterson LR. Recovery of vancomycin-resistant enterococci on fingertips and environmental surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995; 16 (10): 577-81.
247. Nüesch-Inderbilen MT, Kayser FH, Hächler H. Survey and molecular genetics of SHV  $\beta$ -lactamases en enterobacteriaceae in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 943-949.
248. Nwankwo E. Isolation of pathogenic bacteria from fomites in the operating rooms of a specialist hospital in Kano, North-western Nigeria. *Pan African Medical Journal* 2012; 12 (90): 10 p.

## O

249. Oie S, Kamiya A. Survival of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on naturally contaminated dry mops. *J Hosp Infect* 1996; 34: 145-9.
250. Oliveira AC, Damasceno QS. Surfaces of the hospital environment as possible deposits of resistant bacteria: a review. *Rev Esc Enferm USP* 2010; 44 (4):1112-7.
251. Orji MU, Mbata TI, Kalu OU. Isolation of pathogenic bacteria from hospital staff apparel in Nigeria. *Malawi Medical Journal* 2005; 17(4): 128-130.
252. Otter JA, Yezli S, GL French. The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2011; 32(7): 687-699.
253. Ould Brahim Elkory M. Bacille pyocyanique : identification et sensibilité aux agents antibactériens. Thèse de Magister. Université Badji Mokhtar-Annaba, 1998, 115p.

## P

254. Pagès JM. Porines bactériennes et sensibilité aux antibiotiques. *Médecine/Sciences* 2004; 20(3): 346-351.
255. Partridge SR. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2011; 35: 820-55.

256. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta lactamases: A clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18:657-86.
257. Pavese P. Infections urinaires nosocomiales : définition, diagnostic, physiopathologie, prévention, traitement. *Médecine et maladies infectieuses* 2003; 33 : 266s-274s.
258. Pechère JC, Micha-Hamzhepour M, Kohler T. L'efflux antibiotique, un mécanisme de résistance multiple chez *Pseudomonas aeruginosa*. *Bulletin de l'académie nationale de médecine* 1998; 182 (3): 599-615.
259. Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to Gram-negative bacteria. *The New England Journal of Medicine* 2010; 362 (19): 1804-13
260. Pérez JL, Gómez E, Sauca G. Survival of gonococci from urethral discharge on fomites. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 1990; 1:54-55.
261. Perilli M, Dell'Amico E, Segatore B, De Massis MR, Bianchi C, Luzzaro F, Rossolini GM, Toniolo A, Nicolletti G, Amicosante G. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from an Italian nationwide survey. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 611-614.
262. Petit A, Sirot DL, Chanal CM, Sirot JL, Labia R, Gerbaud G, Cluzel RA. Novel plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* more resistant to ceftazidime than to other broad- spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 626-630.
263. Philippon AM, Paul GA, Jacoby GA. Properties of PSE-2  $\beta$ -lactamase and genetic basis for its production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 24:362-369.
264. Philippon A, Labia R, Jacoby JA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 1131-1136.
265. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type  $\beta$ - lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother* 2002; 46: 1-11.
266. Philippon A, Arlet G.  $\beta$ -Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel ! *Annales de biologie clinique* 2006; 64 (1): 37-51.
267. Philippon A. Les bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu (BLSE). Revues générales et analyses prospectives. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* 2013; 28 : 287-296.

- 268.** Pien FD, Farmer JJ III, Weaver RE. Polymicrobial bacteremia caused by *Ewingella americana* (family *Enterobacteriaceae*) and an unusual *Pseudomonas* species. *J Clin Microbiol* 1983; 18:727-729.
- 269.** Pien FD, Bruce AE. Nosocomial *Ewingella americana* bacteremia in an intensive care unit. *Arch Intern Med* 1986; 146:111-112.
- 270.** Poirel L, Nordmann P. Nomenclature of GES-type extended-spectrum  $\beta$ -actamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2148-2150.
- 271.** Poirel L, Nordmann P. Résistance aux  $\beta$ -lactamines chez *Acinetobacter baumannii* : évolution et émergence de nouveaux mécanismes. *Antibiotiques* 2006; 8 (2): 100-107.
- 272.** Poirel L, Leviandier C, Nordmann P. Prevalence and genetic analysis of plasmid mediated quinolone resistance determinants Qnr A and Qnr S in *Enterobacteriaceae* isolates from a French university hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3992-7.
- 273.** Pound MW, Tart SB, Okoye O. Multidrug-Resistant *Ewingella Americana*: A Case Report and Review of the Literature. *The Annals of Pharmacotherapy* 2007; 41: 2066-2070.
- 274.** Pourriat JL, Martin C. Principes de réanimation chirurgicale. 2<sup>ème</sup> Edition. Arnette, Paris, 2005, 1430p.
- 275.** Poza M, Gayoso C, Gómez MJ, Rumbo-Feal S, Tomás M, Aranda J, Fernández A, Bou G. Exploring bacterial diversity in hospital environments by GS-FLX titanium pyrosequencing. *PLOS ONE* 2012; 7(8): e44105.10 p.
- 276.** Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiologie. 2<sup>ème</sup> édition française. De Boeck Université, 1999, 981p.
- 277.** Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiologie. 2<sup>ème</sup> édition française. De Boeck & Larcier s.a, 2003, 1137p.

## **R**

- 278.** Rahal K. Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale selon les recommandations de l'O.M.S., I.N.S.P. Algérie, 1999.
- 279.** Rahal K. Standardisation de l'antibiogramme en Médecine Humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'O.M.S. 4<sup>ème</sup> édition, 2005, 95p.

280. Rahal K. Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale selon les recommandations de l'O.M.S., I.N.S.P. Algérie, 2011. 192p.
281. Raj A. Antibiotic resistance, plasmid and RAPD profiles of multidrug-resistant coliform bacteria isolated from sewage samples of Ghaziabad City, India. *Universal Journal of Environmental Research and Technology* 2012; 2 (4): 318-324.
282. Ramdani-Bouguessa N, Mendonca N, Leitao J, Ferreira E, Tazir M, Canica M. CTX-M-3 and CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* from a hospital in Algiers. Algeria. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4584-6.
283. Ramdani-Bouguessa N, Manageiro V, Jones-Dias D, Ferreira E, Tazir M, Canica M. Role of SHV beta-lactamase variants in resistance of clinical *Klebsiella pneumoniae* strains to beta-lactams in an Algerian hospital. *J Med Microbiol* 2011; 60: 983-7.
284. Rampling A, Wiseman S, Davis L, Hyett AP, Walbridge AN, Payne GC, Cornaby AJ. Evidence that hospital hygiene is important in the control of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp infect* 2001; 49: 109-16.
285. Rhame F. The inanimate environment. In : Benett J, Brachman P. Hospital infections (4th ed). Lippincott-Raven, Philadelphia, 1998, 299-324.
286. Riou F. Le point sur l'épidémiologie et la prévention des légionelloses en milieu hospitalier. *Hygiène S* 1993; 3: 22-34.
287. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis* 2006; 6: 629-40.
288. Rockstroh T. Changes in the nomenclature of bacteria after the 8th edition of Bergey's Manual of the Determinative Bacteriology. *Z Arztl Fortbild (Jena)* 1977; 71: 545-50.
289. Rodriguez-Martinez JM, Poirel L, Pascual A, Nordman P. Plasmid mediated quinolone resistance in Australia. *Microb Drug Resist* 2006; 12(2): 99-102.
290. Rodriguez-Villalobos H, Struelens MJ. Résistance bactérienne par  $\beta$ -lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur. *Réanimation* 2006; 15 (3): 205-213.
291. Roh KH, Uh Y, Kim JS, Kim HS, Shin DH, Song W. First outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing both SHV-12-type extended-spectrum beta-lactamase and DHA-1-Type AmpC beta-lactamase at a Korean Hospital Yonsei. *Med J* 2008; 49(1): 53-7.

- 292.** Rouillon S, Ourdanabia S, Jamart S, Hernandez C et Meunieral O. Étude de l'efficacité d'un produit détergent désinfectant pour sols et surfaces sur les souches bactériennes isolées à partir de l'environnement hospitalier. *Pathologie Biologie* 2006; 54 : 325-330.
- 293.** Roux D, Aubier B, Cochard H, Quentin R, van der Mee-Marquet N. Contaminated sinks in intensive care units: an underestimated source of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in the patient environment. *Journal of Hospital Infection* 2013; (85): 106-111.
- 294.** Ruiz L, Dominguez MA, Ruiz N, Vinas M. Relationship between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital setting. *Arch Med Res* 2004; 35:251-7.
- 295.** Ryan KJ, Ray CG. Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious diseases. 4<sup>ème</sup> edition. McGraw-Hill, USA, 2004, 979p.
- 296.** Ryoo NH, Ha JS, Jeon DS, Kim JR, Kim HC. A case of pneumonia caused by *Ewingella americana* in a patient with chronic renal failure. *J Korean Med Sci* 2005; 20:143-5.

## S

- 297.** Sarlangue J. Prévention des infections à bactéries multi résistantes en néonatalogie. *Rean Urg* 1997; 6 (2 bis): 254-259.
- 298.** Savov E, Mihaylova G, Petrov N, Borisova M, Triphonova A, Kjoseva E, Gala JL, Ireng L, Grigorov D, Zagorchina A. Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* infections in multiprofile hospital. *Trakia Journal of Sciences* 2012; 10(2): 59-64.
- 299.** Scharmann W, Heller A. Survival and transmissibility of *Pasteurella pneumotropica*. *Laboratory Animals* 2001; 35: 163-166.
- 300.** Schnell D, Kouatchet AT, Lecuyer H, *et al.*, Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* rectal carriage at hospital admission predictable ? Risk factors at hospital admission. *J Hosp Infect* 2010; 76(2):178-80.
- 301.** Segonds C, Chabanon G, Couetdic G, Michel-Bnand Y, Bingen E. Epidemiology of pulmonary colonization with *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients, The French Obsenatoire *Burkholderia cepacia* study group. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 841- 2.



- 302.** Segonds C, Chabanon G. *Burkholderia cepacia*: dangers of a phytopathogen organism for patients with cystic fibrosis. *Ann Bio Clin* 2001; 59 (3): 69-259.
- 303.** Segonds C, Chabanon G, Monteil H. Espèces du complexe *Burkholderia cepacia*: épidémiologie, pathogénicité et résistance aux antibiotiques. *Antibiotiques* 2006; 8 (1): 43-50.
- 304.** Sexton T, Clark P, O'Neill E, Dillane T, Humphreys H. Environmental reservoirs of methicillin-resistant staphylococcus aureus in isolation rooms: correlation with patient isolates and implications for hospital hygiene. *J Hosp Infect* 2006; 62(2):187-94.
- 305.** Shahid M, Malik A, Akram M, Agrawal LM, Khan AU, Agrawal M. Prevalent phenotypes and antibiotic resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* at an Indian tertiary care hospital: plasmid-mediated ceftazidime resistance. *International Journal of Infectious Diseases* 2008; 12: 256-264.
- 306.** Shahid M. *Citrobacter* spp. Simultaneously Harboring *bla* CTX-M, *bla* TEM, *bla* SHV, *bla* ampC, and insertion sequences IS26 and *orf* 513: an evolutionary phenomenon of recent concern for antibiotic resistance. *Journal of Clinical Microbiology* 2010; 48(5): 1833-1838.
- 307.** Shiferaw T, Beyene G, Kassa T, Sewunet T. Bacterial contamination, bacterial profile and antimicrobial susceptibility pattern of isolates from stethoscopes at Jimma University Specialized Hospital. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2013; 12 (39): 8p.
- 308.** Sirot J, Chanal C, Petit A, Sirot D, Labia R, Gerbaud G. *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae producing novel plasmid-mediated beta-lactamases markedly active against third-generation cephalosporins: epidemiologic studies. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 850-859.
- 309.** Sirot D. Extended-spectrum plasmid-mediated  $\beta$ -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 1995; 36:19-34.
- 310.** Sougakoff W, Trystram D. Résistance aux  $\beta$ -lactamines. Université Pierre et Marie Curie, Faculté de médecine, 2003, 78p.

- 311.** SRLF : Société de réanimation de langue française. Recommandations des experts de la Société de réanimation de langue française. Prévention de la transmission croisée en réanimation. *Réanimation* 2002 ; 11 : 250-6.
- 312.** Stock I, Sherwood KJ, Wiedemann B. Natural antibiotic susceptibility of *Ewingella americana* strains. *J Chemother* 2003; 15:428-441.
- 313.** Stout JE, Yu VL. Legionellosis. *N Engl J Med* 1997; 337 (10): 682-7.
- 314.** Syed H, Syed A, Chetan M, Rishi S. *Ewingella Americana*: an emerging true pathogen. *Case Reports in Infectious Diseases* 2012; 2012: 2 p.

## T

- 315.** Talon D. The role of the hospital environment in the epidemiology of multiresistant bacteria. *J Hosp Infect* 1999; 43: 13-17.
- 316.** Thom KA, Johnson JK, Lee MS, Harris AD. Environmental contamination due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* surrounding colonized or infected Patients. *Am J Infect Control* 2011; 39 (9): 711-715.
- 317.** Timsit JF. Infections liées aux cathéters : aspects microbiologiques. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 2005; 24: 282-284.
- 318.** Tolmasky ME, Chamorro RM, Crosa JH, Marini PM. Transposon-mediated amikacine resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Agents Chemother* 1988; 32: 1416-1420.
- 319.** Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Introduction à la microbiologie. Editions du nouveau pédagogique inc, Quebec, 2003, 945p.
- 320.** Touati A, Benallaoua S, Forte D, Madoux J, Brasme L, De CC. First report of CTXM-15 and CTX-M-3 beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Bejaia, Algeria. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27: 397-402.
- 321.** Touati A, Brasme L, Benallaoua S, Madoux J, Gharout A, de Champs C. *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing CTX-M-15 recovered from hospital environmental surfaces from Algeria. Letters to the Editor / *Journal of Hospital Infection* 2008a; 68 (2): 183-185.
- 322.** Touati A, Brasme L, Benallaoua S, Gharout A, Madoux J, De CC. First report of qnrB-producing *Enterobacter cloacae* and qnrA-producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008b; 60:287-90.

- 323.** Touati A, Zenati K, Brasme L, Benallaoua S, de Champs C. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase characterisation and heavy metal resistance of Enterobacteriaceae strains isolated from hospital environmental surfaces. Letters to the Editor / *Journal of Hospital Infection* 2010; 75(1):78-79.
- 324.** Touati A, Medboua C, Touati D, Denine R, Brasme L, De Champs C. CTX-M- 15-producing Enterobacteriaceae isolates causing bloodstream infections at the Beni-Messous hospital in Algiers (Algeria). *Int Res J Microbiol* 2012; 3: 181-5.
- 325.** Touati M. Antibio-résistance des bacilles à Gram négatif non fermentants isolés au niveau des services de réanimation - CHU Annaba. Thèse de doctorat en microbiologie. Option : Microbiologie appliquée. Université Badji Mokhtar-Annaba, 2013, 137p.
- 326.** Tsakris A, Poulou A, Markou F, Pitiriga V, Piperaki ET, Kristo I, *et al.*, Dissemination of clinical isolates of *Klebsiella oxytoca* harbouring CMY-31, VIM-1, and a new OXY-2-type variant in the community. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:3164-8.
- 327.** Tsokos M. Fatal Waterhouse-Friderichsen syndrome due to *Ewingella americana* infection. *Am J Forensic Med Pathol* 2003; 24:41- 4.
- 328.** Tzouveleki L, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ. CTX-M-type  $\beta$ -lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Inter J Antimicrob Agents* 2000; 14: 137-142.

## V

- 329.** Venezia RA, Scarano FJ, Preston KE, Steele LM, Root TP, Limberger R, Archinal W, Kacica MA. Molecular epidemiology of an SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase in Enterobacteriaceae isolated from infants in a neonatal intensive care unit. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 915-923.
- 330.** Verity P, Wilcox MH, Fawley W, Parnell P. Prospective evaluation of environmental contamination by *Clostridium difficile* in isolation side rooms. *Journal of Hospital Infection* 2001; 49:204-209.
- 331.** Veskey D, Streifel A. Environmental services. In : Mayhall C. Hospital epidemiology and infection control. William & Wilkins, Baltimore; 1996, 818-23.
- 332.** Vora S, Auckenthaler R. Que signifie « $\beta$ -lactamases à spectre élargi» en pratique ? *Rev Med Suisse* 2009; 220: 1991-4.

W

- 333.** Wagenvoort JHT, Sluijsmans W and Penders RJR. Better environmental survival of outbreak vs sporadic MRSA isolates. *J Hosp Infect* 2000; 45: 231-4.
- 334.** Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-  $\beta$  -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; 18:306-325.
- 335.** Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2242-8.
- 336.** Wang M, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the qnr gene in *Klebsiella pneumonia* clinical isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1295-9.
- 337.** Wang M, Guo Q, Xu X, Wang X, Ye X, Wu S, *et al.* New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 0. AAC. 01400-08v1.
- 338.** Weber DO, Gooch JJ, Wood WR, Britt EM, Kraft RO. Influence of operating room surface contamination on surgical wounds: a prospective study. *Arch Surg* 1976; 111:484-488.
- 339.** Weber DJ, Rutala WA. Environmental issues and nosocomial infections. In :Wenzel RP. Prevention and control of nosocomial infections (3rd ed). Williams & Wilkins, Baltimore, 1997a, 491-514.
- 340.** Weber DJ, Rutala WA. Role of the environmental contamination in the transmission of vancomycin-resistant enterococci. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997b; 18: 306-9.
- 341.** Weber DJ, Rutala WA, Miller MB, Huslage K, Sickbert-Bennett E. Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: Norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. *American Journal of Infection Control* 2010; 38(5) (Suppl 1): S25-33.
- 342.** Webster C, Towner KJ, Humphreys H. Survival of *Acinetobacter* on three clinically related inanimate surfaces. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2000; 21:246.
- 343.** Weernink A, Severin WPJ, Tjernberg I, Dijkshoorn L. Pillows, an unexpected source of *Acinetobacter*. *J Hosp Infect* 1995; 29: 189-199.

- 344.** Weill FX, Demartin M, Tandé D, Espié E, Rakotoarivony I, Grimont PDA. SHV-12-like extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing strains of 19 *Salmonella enterica* serotypes Babelsberg and Enteridis isolated in France among infants adopted from Mali. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2432-2437.
- 345.** Wendt C, Dietze B, Dietz E, Rüdén H. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1394-7.
- 346.** Wendt C, Wiesenthal B, Dietz E, Ruden H. Survival of vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococci on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3734-6.
- 347.** Wieczorek P, Sacha P, Hauschild T, Zórawski M, Krawczyk M, Tryniszewska E. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*- the role of Ade ABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. *Folia Histochem Cytobiol* 2008; 46 (3): 257-267.
- 348.** Wilks SA, Michels H, Keevil CW. The survival of *Escherichia coli* O157 on a range of metal surfaces. *International Journal of Food Microbiology* 2005; 105:445-454.
- 349.** Williams AP, Avery LM, Killham K, Jones DL. Persistence of *Escherichia coli* O157 on farm surfaces under different environmental conditions. *Journal of Applied Microbiology* 2005; 98:1075-1083.
- 350.** Wong-Beringer A, Hindler J, Loeloff M, Queenan AM, Lee N, Pegues DA, Quinn JP, Bush K. Molecular correlation for the treatment outcomes in bloodstream infections caused by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to ceftazidime. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 135-146.

## Y

- 351.** Yagi T, Kruokawa H, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y. A preliminary survey of extended-spectrum  $\beta$  -lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 184: 53-56.
- 352.** Yan JJ, Wu SM, Tsai SH, Wu JJ, Su IJ. Prevalence of SHV-12 among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and identification of a novel AmpC enzyme (CMY-8) in southern Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:1438-1442.

**Z**

- 353.** Zoutman D. Amélioration de la qualité du nettoyage de l'environnement. *Qmentum Quarterly* 2013; 5(4) : 07-10.

# **ANNEXES**

**ANNEXES**

**Tableau 37 : Classification des  $\beta$ -lactamases d' après Bush-Jacoby-Medeiros (Bush *et al.*, 1995)**

Classe moléculaire (Ambler)	Groupes fonctionnels (Bush & al.)	Type de $\beta$ -lactamase et exemples représentatifs	Bactéries impliquées	Inhibition par acide clavulanique	Inhibition par EDTA	$\beta$ -lactamines hydrolysées	$\beta$ -lactamines stables
<b><math>\beta</math>-lactamases à sérine active Classe A</b>	2a	Pénicillines	Bactéries à Gram positif	++	-	Pénicillines sauf pénicillines M	Pénicillines M, C1G, carbapénèmes
	2b	$\beta$ -lactamase à large spectre TEM-1 & 2, SHV-1 plasmidiques et chromosomiques	Bactéries à Gram négatif	++	-	Amino-, carboxy- et uréido-pénicillines, C1G, C2G	Céphamycines, C3G, moxalactam, carbapénèmes, aztreonam
	2be	$\beta$ -lactamases à spectre élargi aux C3G et à l'aztreonam SHV-2 à 9, TEM-3 à 29, VEB-1, plasmidiques	Entérobactéries, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	-	Idem 2b + C3G et aztreonam	Céphamycines, moxalactam, carbapénèmes
	2br	$\beta$ -lactamases à large spectre résistant à l'acide clavulanique TRI : dérivé TEM-30 à -41, plasmidiques	Entérobactéries	-	-	Idem 2b + associations aux inhibiteurs de $\beta$ -lactamases	Idem 2b
	2c	Carbénicillases PSE-1, PSE-3, PSE-4 plasmidiques	Bactéries à Gram négatif	+	-	Idem 2b	Idem 2b
	2e	Céphalosporinases chromosomiques inhibées par l'acide clavulanique - Cefuroximase Cum A ( <i>P.vulgaris</i> ), - L2 ( <i>S.maltophilia</i> )	Bactéries à Gram négatif (surtout entérobactéries)	++	-	Amino-, carboxy- et uréido-pénicillines, C1G, C2G, certaines C3G	Ceftazidime, céphamycines, aztreonam, carbapénèmes
	2f	Carbapénémases à site actif sérine et inhibées par l'acide clavulanique Ex : IMI-1, NMC-A, chromosomiques	Entérobactéries	+	-	Idem 2b + aztreonam, carbapénèmes et certaines C3G	Certaines C3G
<b>Classe C</b>	1	Céphalosporinase AmpC chromosomiques (Entérobactéries*, <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Acinetobacter</i> spp.) et plasmidiques (CMY, FOX, MOX, MIR-1...)	Bactéries à Gram négatif	-	-	Toutes les $\beta$ -lactamines sauf les carbapénèmes	Carbapénèmes
<b>Classe D</b>	2d	Oxacillines OXA-1 à -20 plasmidiques et chromosomiques	Bacilles à Gram négatif	V	-	Idem 2b (+ parfois C3G, aztreonam ou carbapénème)	Variable
<b>Pas de classe attribuée</b>	4	Enzymes indéterminées Ex : enzymes chromosomiques de <i>C. jejuni</i> , <i>C. cepacia</i> ...	Espèces variées	-	-	Variable	Variable
<b><math>\beta</math>-lactamases Zinc-dépendances Classe B</b>	3	Métallo- $\beta$ -lactamases IMB-1/3 chromosomiques ou plasmidiques, enzymes chromosomiques de <i>Aeromonas</i> spp., <i>Flavobacterium</i> spp., <i>S.maltophilia</i> L1	Bactéries à Gram négatif	-	++	Large profil de substrats dont les carbapénèmes	Variable
Inhibition : inhibiteur fort++, inhibiteur modéré+, négligeable -, V : variable							
* <i>E. coli</i> (bas niveau), <i>E. cloacae</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>M. morgani</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>H. alvei</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>P. rettgeri</i>							



Tableau 38 : Prélèvements réalisés au cours de la période d'étude

Dates des prélèvements	Etablissement hospitalier	Service	N/ service	N/ hôpital	N/ année
06/ 04/ 2009	Khaldi Abdelaziz	Réanimation	15	62	149
		Bloc opératoire	10		
		Dialyse	06		
		Déchoquage	10		
		Laboratoire	11		
		Salles des soins	10		
23/ 04/ 2009	Khaldi Abdelaziz	Laboratoire	13	87	
		Bloc opératoire	14		
		Dialyse	10		
		Déchoquage	16		
		Réanimation	19		
		Salles des soins	15		
24/ 04/ 2010	Alia Saleh	Laboratoire	14	70	
		Salles des soins	18		
		Déchoquage	18		
		Réanimation	20		
03/ 05/ 2010	Alia Saleh	Salle des soins	16	29	
		Laboratoire	13		
07/ 05/ 2010	Alia Saleh	Laboratoire	10	52	
		Déchoquage	13		
		Salles des soins	12		
		Réanimation	17		
	Polyclinique Hammamet	Salle des soins	16	27	
		Laboratoire	11		
13/ 05/ 2010	Bouguerra Boulaares	Réanimation	20	58	
		Salle des soins	13		
		Laboratoire	13		
		Médecine femme	12		

Tableau 38 (suite)

Dates des prélèvements	Etablissement hospitalier	Service	N/ service	N/ hôpital	N/ Année	
16/ 05/ 2010	Khaldi Abdelaziz	Néonatalogie	45	75	189	
		Réanimation	19			
		Médecine femme	11			
23/ 05/ 2010	Khaldi Abdelaziz	Néonatalogie	50	50		
27/ 03/ 2011	Alia Saleh	Médecine homme	02	12		
		Médecine femme	07			
		Chirurgie femme	03			
	Khaldi Abdelaziz	Maternité	02	02		
29/ 03/ 2011	Bouguerra Boulaares	Médecine femme	06	06		
	Alia Saleh	Médecine femme	05	24		
		Médecine homme	01			
		Réanimation	15			
		Chirurgie femme	03			
12/ 04/ 2011	Alia Saleh	Laboratoire	22	45		
		Salles des soins	20			
		PTS	03			
16/ 04/ 2011	Alia Saleh	Réanimation	19	33		
		Unités des soins intensifs	14			
18/ 04/ 2011	Alia Saleh	Médecine homme	01	08		
		Chirurgie femme	07			
30/ 05/ 2011	Alia Saleh	Réanimation	19	59		
		Salles des soins	16			
		Maladies infectieuses	09			
		Médecine femme	11			
		Médecine homme	04			

Tableau 38 (suite)

Dates des prélèvements	Etablissement hospitalier	Service	N/ service	N/ hôpital	N/ Année
09/ 03/ 2012	Bouguerra Boulaares	Maladies infectieuses	07	39	140
		Pneumo-phtisiologie	11		
		PTS	01		
		Laboratoire	08		
		Neurologie	12		
10/ 04/ 2012	EPH Bir El Ater	Pédiatrie	04	31	
		Maternité	03		
		Médecine interne	07		
		Laboratoire	07		
		Salles des soins	09		
		PTS	01		
30/ 04/ 2012	Alia Saleh	Salles des soins	07	38	
		Chirurgie femme	13		
		Chirurgie osseuse	08		
		Laboratoire	10		
14/ 05/2012	EPH Ouenza	Déchoquage	10	32	
		Laboratoire	08		
		Maternité	05		
		Salles des soins	08		
		PTS	01		
<b>Total</b>	<b>839 prélèvements</b>				

**PTS** : Poste de transfusion sanguine

**EPH** : Etablissement public hospitalier

**N** : Nombre des échantillons

---

## Milieux de culture utilisés

### 1) Bouillon nutritif

#### ➤ Composition

- Tryptone 10g
- Extrait de viande 5g
- Chlorure de sodium 5g

pH 7,2

#### ➤ Préparation

25 par litre. Autoclaver 20 minutes à 120°C.

### 2) Gélose nutritive

#### ➤ Composition

- Extrait de viande 1g
- Extrait de levure 2.5g
- Peptone 5,0g
- Chlorure de sodium 5,0g
- Agar 15g

pH 7

#### ➤ Préparation

28 g par litre. Chauffer lentement jusqu'à dissolution, ajuster si nécessaire le pH, répartir, autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.

### 3) Gélose Mac Conkey :

#### ➤ Composition :

- Peptone de caséine 7g
- Peptone de viande 3g
- Lactose 10g
- Mélange de sels biliaires 1.5g
- Chlorure de sodium 5.0

- Rouge neutre 0.03g
- Cristal violet 0.001g
- Agar agar 13.5g

#### 4) Gélose Mueller-Hinton :

##### ➤ Composition :

- Infusion de viande de bœuf 300g
- Hydrolysate de caséine 17.5g
- Amidon 1.5g
- Gélose 17g

pH final 7,4

##### ➤ Préparation :

Porter à l'ébullition 38 g par litre d'eau distillée, puis répartir dans des flacons, stériliser à l'autoclave (120 °C pendant 15 mn).

#### 5) Gélose au cétrimide

- Peptone 20 g
- Sulfate de potassium 10 g
- Chlorure de magnésium 03 g
- Phosphate di-potassique 0,3 g
- Cétrimide 0,3 g
- Glycérol 10ml
- Agar 13,5 g

pH = 7,2 ± 0,2

#### 6) Milieu King A

- Peptone tryptique de gélatine (peptone A) 20 g
- Sulfate de Potassium anhydre 10 g
- Chlorure de Magnésium anhydre 1, 5 g
- Agar 20 g

pH =  $7,0 \pm 0,2$  à 25°C

**7) Milieu King B**

- Peptone tryptique de gélatine (peptone A) 20 g
- Sulfate de Potassium anhydre 10 g
- Chlorure de Magnésium anhydre 1, 5 g
- Agar 20 g

pH = 7,2

**8) Bouillon LB**

- Tryptone 10g
- Extrait de levure 5g
- NaCL 10g

## Réactifs utilisés

### 1) Réactif de la recherche de l'oxydase :

Disques imprégnés d'une solution à 1% de chlorhydrate de tétraméthylparaphénylènediamine.

### 2) Réactif de Kovacs :

- |                                 |       |
|---------------------------------|-------|
| - P-diméthyl aminobenzaldéhyde  | 7 g   |
| - Alcool amylique               | 75 ml |
| - Acide chlorhydrique concentré | 20 ml |

### 3) Réactifs de Voges-Proskauer (VP) :

#### VP I :

- |                          |        |
|--------------------------|--------|
| - Hydroxyde de potassium | 40 g   |
| - Eau                    | 100 ml |

#### VP II :

- |                     |        |
|---------------------|--------|
| - $\alpha$ naphthol | 6 g    |
| - Ethanol           | 100 ml |

### 4) Réactif de la recherche de la tryptophane désaminase (TDA) :

- |                         |        |
|-------------------------|--------|
| - Perchlorure de fer    | 3,4 g  |
| - Eau distillée stérile | 100 ml |

### 5) Réactifs pour la recherche de la nitrate réductase (NR) :

#### Réactif NR 01 :

- |                      |        |
|----------------------|--------|
| - Acide sulfamilique | 0,8 g  |
| - Acide acétique 5N  | 100 ml |

#### Réactif NR 02 :

- |                     |        |
|---------------------|--------|
| - Naphtylamine      | 0,5 g  |
| - Acide acétique 5N | 100 ml |

Tableau 39 : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api 20E (BioMérieux SA)

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	Ortho-nitro-phényle-Galactoside	Béta- galactosidase	Incolore	Jaune (1)
ADH	L-arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orangé (2)
LDC	L-lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orangé (2)
ODC	L-ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orangé (2)
CIT	Citrate de sodium	Utilisation du citrate	Vert pâle/jaune	Bleu-vert/vert (3)
H <sub>2</sub> S	Thiosulfate de sodium	Production d'H <sub>2</sub> S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/fin liseré
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orangé (2)
TDA	L-tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA / immédiat	
			Jaune	Marron foncé
IND	L-tryptophane	Production d'indole	James/ 2 mn	
			Jaune	Anneau rouge
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP 1 + VP 2/ 10mn	
			Incolore	Rosé-rouge (5)
GEL	Gélatine de kohn	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	Fermentation/oxydation (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
MAN	D-mannitol	Fermentation/oxydation (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxydation (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
SOR	D-sorbitol	Fermentation/oxydation (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
RHA	L-rhamnose	Fermentation/oxydation (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
SAC	D-saccharose	Fermentation/oxydation (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
MEL	D-melibiose	Fermentation/oxydation (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/oxydation (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
ARA	L-arabinose	Fermentation/oxydation (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
Nitrate réductase Tube GLU	Potassium nitrate	Production de NO <sub>2</sub>	NIT1 + NIT2 / 2-3 mn	
			Jaune	Rouge
		Réduction au stade N <sub>2</sub>	Zinc / 5mn	
			Rouge/orangé	Jaune

(1) Une très légère couleur jaune est également positive

(2) Une couleur orange apparaissant après 36-48 heures d'incubation doit être considérée négative.



- (3) Lecture dans la cupule (zone aérobie).  
 (4) La fermentation commence dans la partie inférieure des tubes, l'oxydation commence dans la cupule.  
 (5) Une légère coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être lue négative.  
 (BioMérieux SA)

**Tableau 40 : Tableau de lecture de l'API 20 NE (BioMérieux SA)**

Tests	Composants actifs	Réaction/enzyme	Résultats	
			Négatif	Positif
NO <sub>3</sub>	Potassium nitrate	réduction des nitrates en nitrites	NIT 1 +NIT 2/ 5 min	
			Incolore	Rose-rouge
		réduction des nitrates en azote	Zn/ 5min	
			Rose	incolore
TRP	L-tryptophane	formation d'indole	Kovacs/ immédiat	
			Incolore Vert pâle/ jaune	Rose
GLU	D-glucose	fermentation	Bleu à vert	Jaune
ADH	L-arginine	arginine Dihydrolase	Jaune	Orange/ rose/ rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Orange/ rose/ rouge
ESC	Esculine citrate de fer	Hydrolyse (β-glucosidase)	Jaune	Gris/ marron/ noir
GEL	Gélatine (origine bovine)	Hydrolyse de la gélatine (protéase)	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl-βD-galactopyranoside	β-galactosidase (Para-NitroPhényl-βD-Galactopyranosidase)	Incolore	jaune
GLU	D-glucose	assimilation	transparente	Trouble
ARA	L-arabinose	assimilation	transparente	Trouble
MNE	D-mannose	assimilation	transparente	Trouble
MAN	D-mannitol	assimilation	transparente	Trouble
NAG	N-acétyl-glucosamine	Assimilation	transparente	Trouble
MAL	D-maltose	assimilation	transparente	Trouble
GNT	Potassium gluconate	assimilation	transparente	Trouble
CAP	Acide caprique	assimilation	transparente	Trouble
ADI	Acide adipique	assimilation	transparente	Trouble
MLT	Acide malique	assimilation	transparente	Trouble
CIT	Trisodium citrate	assimilation	transparente	Trouble
PAC	Acide phénylacétique	assimilation	transparente	Trouble

**Tableau 41 : Solutions utilisées pour l'extraction de l'ADN plasmidique  
(Boukerzaza, 2006)**

<b>Solutions</b>	<b>Solution S1</b>	<b>Solution S2</b>	<b>Solution S3</b>
<b>Composition (pour 1L)</b>	- Glucose 5mM - EDTA 10mM - Tris-Hcl 25mM  pH 8.0	- NaOH 0,2M  - SDS 1%	- Acétate de Sodium 3 M  pH 4.8
<b>Conservation</b>	Autoclaver et garder à température ambiante	Garder à température ambiante	Garder à 4°C

**Solution utilisée pour l'électrophorèse sur gel d'agarose :**

➤ **Tampon Tris- Acétate- EDTA (TAE) 10X**

- Tris base 8mM
- Acide acétique glacial 4mM
- EDTA 0,5 M 20ml
- Eau distillée qsp 1L

Ajuster le pH à 8,5. Cette solution stock est à diluer 10 fois (TAE 1X).

**Solution pour la reconstitution des amorces et la conservation de l'ADN :**

➤ **Solution TE (Tris - EDTA)**

- Tris-HCl 10mM
- EDTA 1mM
- Eau distillée qsp 1L

pH 8

# PREVALENCE AND CHARACTERIZATION OF EXTENDED-SPECTRUM $\beta$ -LACTAMASE- PRODUCING ENTEROBACTERIACEAE ISOLATED FROM HOSPITAL ENVIRONMENTS

DEBABZA MANEL<sup>1</sup>, MECHAI ABDELBASSET<sup>1,2</sup> AND CHETTIBI HOURIA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Natural and Life Sciences, Faculty of Exact Sciences and Natural and Life Sciences, Tebessa University, 12000. Algeria.

<sup>2</sup>Microbiology laboratory, Faculty of natural and life sciences, Badji-Mokhtar University, Annaba 23000, Algeria.

(Received : 22 November, 2013; accepted : 20 December, 2013)

**Key words:** Enterobacteriaceae, Antimicrobial susceptibility, Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, hospital Environment.

**Abstract**—Bacteria producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) among clinical isolates have been reported in many countries. However, data concerning the role of environmental contamination in the dissemination of (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* are currently lacking. In this context, the aim of this study was to investigate and characterise *Enterobacteriaceae* strains isolated from different places in a hospital and to determine the occurrence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*. The bacterial isolates were identified on the basis of standard cultural, morphological and biochemical characteristics. Antibiotic susceptibility of the isolates was tested by disk diffusion method. A total of 637 strains of *Enterobacteriaceae* were isolated between 2007-2012. Susceptibility study showed that the imipenem was the most active antibiotic against overall enterobacteria with resistance rate of 2.51%, however the high resistance rates were observed to ampicillin (98.11%) and cephalixin (78.65%). The prevalence of ESBL was 136 (21.35%) and ESBL-producing strains were *K. pneumoniae* 66 (28.45 %), *E. coli* 31 (25.41%), *S. marcescens* 18 (19.15%), *K. oxytoca* 9 (17.31%), *En .cloacae* 5 (5.43%), *C. freundii* 04 (16%) and *P. mirabilis* 03 (15%). ESBL production was confirmed by double disk screening, combination disk method and E-test ESBL strip. All selected isolates harbored from one to four different plasmids with molecular sizes ranging from 5-170 kb. In general, most transconjugants acquired ceftazidime resistance by an ESBL gene encoded on the largest plasmid (>125 kb) found in the respective isolate. In addition, these transconjugants co-expressed other antibiotic resistance markers such as amikacin and ciprofloxacin.

## INTRODUCTION

$\beta$ -Lactams are considered to be among the safest, most efficacious and most widely prescribed antibiotics for the treatment of bacterial infections. Benzylpenicillin (Penicillin G ) belongs to this class of antibiotic, was the first successful chemotherapeutic agent used during World War II (Abraham, 1977). The use of penicillin was followed by the development of newer antibiotics such cephalosporins and carbapenems for antibiotic resistant infections (Bradford, 2001).

Resistance to  $\beta$ -lactams is mediated by four mechanisms; restriction of antimicrobial concentration within the bacterial cell (e.g. via porin loss or active efflux); a decrease in affinity of the  $\beta$ -lactam for the target PBP enzymes; or hydrolysis of

the drug by a  $\beta$ -lactamase enzyme (Rupp and Fey, 2003). It has been reported that the appearance of  $\beta$ -lactamases with increased catalytic efficiency for  $\beta$ -lactams seem to be the major resistance mechanism in Gram negative bacteria. However, the combination of increased  $\beta$ -lactamase production with decreased  $\beta$ -lactam concentrations within the periplasm results in perhaps the most effective  $\beta$ -lactam resistance mechanism (Davies and Davies, 2010).

Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) are an increasingly important cause of resistance in Gram-negative bacteria throughout the world. *Enterobacteriaceae* are significant causes of serious infections and many of the most important members of this family are becoming increasingly resistant to currently available antibiotics. It is important to note

that controlling the development and spread of these multidrug-resistant bacteria in the hospital setting requires vigilance and combination of approaches that need to be applied in a disciplined and coordinated manner (Bush, 2009).

With the introduction of technological methods and molecular biology led to a significant new approach for the characterization of  $\beta$ -lactamases. However molecular classifications for class A and class B  $\beta$ -lactamases were initially proposed by Ambler, on the basis of the four amino acid sequences available in 1980. There are now four major molecular classes of  $\beta$ -lactamases. Classes A, C and D include  $\beta$ -lactamases with an active-site serine (Huovinen *et al.*, 1998), whereas class B  $\beta$ -lactamases include zinc at their active site.

The inanimate hospital environment may serve as a reservoir for resistant bacteria that pose hospital infection risks. The increasing emergence and spread of multiply resistant bacteria in hospitals is of great concern and continues to challenge infection control and hospital epidemiology practice worldwide (Reddy *et al.*, 2007).

Traditional sites for Gram-negative microbes in hospitals have been those constantly or intermittently exposed to water. This includes hand-wash basins, sinks, sluices, showers, baths and toilets. Bacterial biofilm builds up in plumbing components, including taps, water filters and sink traps underneath water outlets. It hosts and protects a multitude of water-loving organisms and poses a threat to nearby debilitated patients (Khan *et al.*, 2012).

Isolation of (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* from hospitalized patients has been reported (Khan *et al.*, 2012; Minarini *et al.*, 2007), however, the influx of this organisms in hospital environment remains poorly studied. The present study is the first evaluation of (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* colonization of a hospital environment and characterization of the obtained isolates.

## MATERIALS AND METHODS

### Collection of strains

A total of 637 *Enterobacteriaceae* isolates were collected during the period of 2007 to 2012, at the Tebessa hospital. This hospital consists of 3 operating rooms, 5 intensive care units (ICUs) with 52 beds, 8 wards with 130 beds and an outpatient department. Approximately, 15000 patients are admitted at the outpatient department per year and

more than 900 operations and invasive diagnostic therapeutic procedures are performed annually.

The sampling was performed in three operating rooms, all ICUs, six wards and the outpatient department. Specimens were collected from the medical devices, various hospital surfaces and inanimate objects, such as floor areas, bed frames, over-bed tables, chairs, lockers, window sills, door handles, bath room sites such as urinals, bathtubs, sinks, faucet, toilet seats, stands for infusion apparatus, mobile instrument tables, instruments, respirators, mobile monitor units and sterilizing drums. The samples were taken with sterile cotton tipped swabs moistened with phosphate-buffered saline (pH 7.2) and transported to the research laboratory within 2 h.

All species were identified both by conventional techniques and by MiniAPI, a semi-automatized assay (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Isolates were frozen at  $-30^{\circ}\text{C}$  in brain-heart infusion broth with 15% glycerol until processed for further experimentation.

### Susceptibility testing and detection of ESBL production

#### Antibiotic susceptibility testing

Antibiotic susceptibility testing was performed on Mueller-Hinton agar by a standard disk diffusion method with appropriate antimicrobial drugs according to the CA-SFM (2012). *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 strains were used as quality controls for antimicrobial susceptibility and the ESBL screening tests, respectively.

#### ESBL testing

Production of ESBL in all isolated strains was determined by the double-disk synergy test (DDS) according to Jarlier *et al.* (1988) and by the combination disk method. The DDS test was performed on meat peptone agar inoculated with the investigated strain. Disks with 30 $\mu\text{g}$  cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone or aztreonam were placed 25mm and 30mm (centre to centre) from a central disk containing amoxicillin/clavulanic acid (20/10  $\mu\text{g}$ ). Isolates with the typical increase of the inhibition zone between cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone or aztreonam and amoxicillin/clavulanic acid were identified as ESBL producers. The combination disk (CD) method was employed by placing disks with ceftazidime (30 $\mu\text{g}$ ) and

ceftazidime/clavulanic acid (30/10 $\mu$ g) on the surface of the inoculated agar. ESBL positive isolates were those in which the growth inhibition zone around the ceftazidime/clavulanic acid disk was >5mm larger than the zone around ceftazidime alone.

#### Plasmid isolation and conjugation experiments

Plasmid extraction was performed as described by Kado and Liu (1981). Briefly, bacterial cultures from heart infusion broth (HIB) agar plates were suspended in microcentrifuge tubes with lysis buffer, heated for 15 minutes at 70°C and mixed with an equal volume of phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25: 24: 1) for extraction of the plasmid. The supernatants from centrifugation were loaded on a 0.8% agarose gel in Tris-Acetate-EDTA (TAE) buffer and run two hours at 100 v in TAE buffer. Plasmids R6K (40 kb), R1 (93 kb) and pUD21 (170 kb) were used as molecular weight markers. Bacterial isolates bearing plasmids were selected to represent isolation sources and bacterial species.

Mating assays were performed as described by Miller (1972) using the *Escherichia coli* HK 225 (Rif<sup>r</sup>) strain as a recipient. Selective agents were used at the following concentrations: 200 mg/L for rifampicin and 8 mg/L for cefotaxime. Transconjugants were subjected to antibiotic susceptibility testing. The broth dilution minimal inhibitory concentration (MIC) reduction method was used as a confirmatory test.

#### Statistical analysis

To compare the ESBL-producing isolates from different sources, the chi-square analysis was done using Minitab software (ver. 15.0). *P* values <0.05 were considered to be statistically significant.

## RESULTS

#### Epidemiological background

During the five-year study period, 290 samples from environmental sources and medical devices were screened for ESBL-producing *Enterobacteriaceae*. The distribution of the isolates from various samples and ESBL-producing *Enterobacteriaceae* is presented in Table 1. Among 637 *Enterobacteriaceae* isolates in this work, *K. pneumoniae* was the most prevalent with 232 (36.42%) isolates followed by *E. coli* with 122 (19.15%) isolates, *S. marcescens* with 94 (14.76%), *En. cloacae* 92 (14.44%) and *K. oxytoca* 52 (8.16%). In all cases the isolates were related to bacteria causing

nosocomial infections in hospital. The frequency of the isolates according to the sites of sampling was as follows: work surfaces 171 (26.84%), toilet seats 135 (21.19%), sinks 97 (15.23%), floor areas 84 (13.19%), basket 80 (12.56%), incubators 44 (6.91%). Only a reduced number from the bed frames 26 (4.17%) was obtained.

#### Phenotypes of resistance to antibiotics

Susceptibility of 637 *Enterobacteriaceae* isolates from various environmental samples and medical devices for selected antimicrobial agents was tested. The rates of resistance to ampicillin and the co-resistance to others antibiotics according to bacterial species are mentioned in Table 2. As a whole, the antimicrobial resistance rate was the highest in ampicillin (98.55%) and cephalexin (78.65%) respectively. Imipenem remains fully effective against these bacteria. In this study, only 16 isolates were found to be resistant to imipenem: 8 isolates of *K. pneumoniae*, 2 each of *En. cloacae* and *K. oxytoca*, 1 each of *E. coli*, *P. mirabilis*, *C. freundii* and *S. marcescens*. With regard to cefotaxime, *E. coli*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis*, *C. freundii* and *En. cloacae* showed resistance rates of <50%. *C. freundii* and *En. cloacae* also showed resistance rates of <30% for ceftazidime. With regard to ciprofloxacin, the highest resistance rates were detected in *E. coli* isolates (47.54%), whereas the majority of *C. freundii* and *Enterobacter cloacae* isolates were found to be susceptible to ciprofloxacin. Netilmicin and gentamicin were moderately effective, 57.46% and 39.87% respectively.

#### Prevalence of ESBL production

A total of 136 (21.35%) isolates were defined and selected as extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) producers in accordance with the CA-SFM criteria. The DDS method showed that 129 of 136 (94.85%) isolates were characterized as ESBL-producing strains, whereas the CD method with cefotaxime detected 136 (100%) of the isolates as ESBL producers. Etest ESBL cefepime was used to avoid false positive results in ESBL detection. Cefepime is not efficiently degraded by the AmpC enzyme, which could be present in the isolates. 136 (100%) of isolates were detected as ESBL producers by the Etest ESBL.

#### Prevalence of *Enterobacteriaceae* strains and ESBL production among isolation sources

Table 1 presents a summary of the prevalence of

**Table 1.** Distribution of *Enterobacteriaceae* isolates and ESBL-producing strains in the hospital environment according to sites of sampling.

	Isolation source											total
	work surfaces	sinks	incubators	floor areas	basket	bed frames	toilet seats					
<i>K. pneumoniae</i>	No. of Isolates	38	14	46	30	7	52					232
	No. of ESBL (%)	3 (7.89)	5 (35.71)	9 (19.56)	5 (16.67)	1 (14.28)	16 (30.77)					66 (28.45)
	<i>P value</i>	<0.001	0.040	<0.001	<0.001	0.008	<0.001					
<i>E. coli</i>	No. of Isolates	18	4	15	12	5	36					122
	No. of ESBL (%)	2 (11.11)	0 (0)	5 (33.33)	2 (16.67)	0 (0)	10 (27.78)					31 (25.41)
	<i>P value</i>	<0.001	1.000	0.019	0.001	1.000	<0.001					
<i>S. marcescens</i>	No. of Isolates	17	12	10	2	2	21					94
	No. of ESBL (%)	2 (11.76)	4 (33.33)	1 (10)	0 (0)	1 (50)	3 (14.28)					18 (19.15)
	<i>P value</i>	<0.001	0.039	<0.001	1.000	1.000	<0.001					
<i>K. oxytoca</i>	No. of Isolates	6	2	3	11	2	5					52
	No. of ESBL (%)	2 (33.33)	0 (0)	0 (0)	1 (9.1)	0 (0)	1 (20)					9 (17.31)
	<i>P value</i>	0.175	1.000	1.000	<0.001	1.000	0.070					
<i>En .cloacae</i>	No. of Isolates	15	11	4	17	10	9					92
	No. of ESBL (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (5.88)	0 (0)	1 (11.11)					5 (5.43)
	<i>P value</i>	1.000	1.000	1.000	<0.001	1.000	<0.001					
<i>C. freundii</i>	No. of Isolates	3	1	6	1	0	3					25
	No. of ESBL (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (100)					4 (16)
	<i>P value</i>	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000					
<i>P. mirabilis</i>	No. of Isolates	0	0	0	7	0	9					20
	No. of ESBL (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (22.22)					3 (15)
	<i>P value</i>	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.013					
Total	No. of Isolates	97	44	84	80	26	135					637
	No. of ESBL (%)	9 (9.28)	9 (20.45)	15 (17.86)	9 (11.25)	2 (7.69)	36 (26.67)					136 (21.35)
	<i>P value</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001					<0.001

ESBL production among 07 representative sources. For all *Enterobacteriaceae* strains, the isolates from work surfaces showed significantly higher ESBL production rates 56 (32.75%) ( $P < 0.001$ ) than were seen in the isolates from other sources. In addition to the work surfaces, toilet seats were the other isolation source associated with significantly higher ESBL production rates 36 (26.67%).

ESBL-producing *K. pneumoniae* were detected in all types of samples. Therefore, *K. pneumoniae* was the most frequently isolated species from toilet seats (52 isolates). Among 232 *K. pneumoniae* isolates, 46 (19.83%) and 45 (19.40%) of the isolates were derived from floor areas and work surfaces, respectively. 27(60%) of the *K. pneumoniae* isolates from work surfaces were estimated to generate ESBL and this rate was significantly higher than those of other sources.

By way of concordance to the *K. pneumoniae*, approximately 36 (29.51%) of *E. coli* isolates were from toilet seats. Work surfaces were the 2nd most frequently encountered source of *E. coli* isolation 32 (26.23%). *E. coli* isolates from toilet seats evidenced relatively high ESBL production strains 10 (27.78%) than those from other sources.

*S. marcescens* was isolated most frequently from work surfaces 30 (31.91%), followed by toilet seats 21 (22.34%) and sinks 17 (18.08%). The number of ESBL producing strains in *S. marcescens* did not differ significantly among isolation sources. They were higher in those from work surfaces (07), incubators (04) and toilet seats (03).

### Plasmid profiles and resistance transfer

Twelve representatives strains were selected on the basis of their phenotypes of resistance harboured from one to five different plasmids with molecular sizes ranging from 05 -170 kb (Table 3). Conjugating experiments were made to determine the transferability of plasmids carrying the ESBL genes, by using *E. coli* HK 225 as recipient strain. Tow transconjugants *E. coli* HK 225-K.pn 47 and *E. coli* HK 225-E.co 79 were obtained respectively from isolates K. pn 47 and E. co 79 (Table 3). Analysis of the plasmid contents of strains K. pn 47 and E.co 79 and their transconjugants shows that in *K. pneumoniae*, ESBL markers are carried by a high molecular plasmid (165 Kb), whereas in *E. coli* ESBL markers were transferred alone by a plasmid with a molecular weight of 125Kb. Ceftazidime resistance was conjugatively transferred to *E. coli* HK 225 from isolates K. pn 47 and E.co 92 which were taken as

**Table 2.** Resistance and ESBL production rates of strains isolated from hospital environments

Bacterial species	no. of isolates	Resistance phenotypes rates <sup>a</sup> (%)										ESBL production Screening positive (%)	
		AMP	LEX	CAZ	CXM	CRO	CTX	COT	CIP	IMP	GEN		NET
<i>K. pneumoniae</i>	232	232 (100)	172 (74.14)	100 (43.1)	130 (56.03)	90 (38.79)	160 (68.96)	166 (71.55)	91 (39.22)	8 (03.45)	103 (44.4)	154 (66.38)	66 (28.45)
<i>E. coli</i>	122	112 (91.80)	79 (64.75)	60 (49.18)	54 (44.26)	48 (39.34)	78 (63.93)	72 (59.1)	58 (47.54)	1 (0.82)	41 (33.61)	56 (45.9)	31 (25.41)
<i>S. marcescens</i>	94	94 (100)	92 (100)	30 (31.91)	94 (100)	32 (34.04)	39 (41.49)	59 (62.76)	27 (28.72)	1 (1.06)	32 (34.04)	42 (44.68)	18 (19.15)
<i>K. oxytoca</i>	52	52 (100)	28 (53.85)	20 (38.46)	14 (26.92)	22 (42.31)	21 (40.38)	32 (61.54)	12 (23.08)	2 (3.85)	18 (34.61)	34 (65.38)	9 (17.31)
<i>En. cloacae</i>	92	92 (100)	92 (100)	15 (16.30)	23 (25)	34 (36.96)	27 (29.35)	56 (60.87)	20 (21.74)	2 (2.17)	39 (42.39)	50 (54.35)	5 (5.43)
<i>C. freundii</i>	25	25 (100)	25 (100)	7 (28)	9 (36)	10 (40)	12 (48)	17 (68)	5 (20)	1 (4)	12 (48)	16 (64)	04 (16)
<i>P. mirabilis</i>	20	18 (90)	13 (65)	9 (45)	9 (45)	10 (50)	6 (30)	14 (70)	5 (25)	1 (5)	9 (45)	14 (70)	03 (15)
Total	637	625 (98.11)	501 (78.65)	241 (37.83)	333 (52.28)	246 (38.62)	343 (53.85)	416 (65.31)	218 (34.22)	16 (2.51)	254 (39.87)	366 (57.46)	136 (21.35)

<sup>a</sup>The interpretative criteria was based on CA-SFM guidelines (2012).

AMP: ampicillin, LEX: cephalaxin, CXM: cefturoxime, CAZ: ceftazidime, CRO: ceftriaxone, CTX: ceftriaxone, IMP: imipenem, CIP: ciprofloxacin, COT: cotrimoxazole, GEN: gentamicin and NET: netilmicin.

**Table 3.** Minimum inhibitory concentrations of a range of antibiotics and plasmids profiles of ESBL-producing selected isolates, their transconjugants and recipient strain

Strains	Code	Specimen	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )							Profile of plasmid sizes (kb)	
			AMP	CAZ	CXM	CRO	CTX	CIP	IMP	GEN	GEN
<i>K. pneumoniae</i>	K.pn 17	work surfaces	256	08	16	08	64	64	<01	16	170
<i>K. pneumoniae</i>	K.pn 17	work surfaces	256	08	16	08	64	64	<01	16	170
	K.pn 22	floor areas	256	16	16	32	64	64	<01	32	165
	K.pn 45	basket	512	04	16	16	128	32	<01	32	165:60
	K.pn 46	work surfaces	512	04	16	08	128	32	2	64	165:60:50:07
	K.pn 47	basket	1024	08	16	08	128	32	1	32	165:60:50:5.5
	K.pn 112	bed frames	1024	08	16	16	128	128	2	64	165:60:50:07
<i>E. coli</i>	E.co 02	work surfaces	256	04	08	08	256	128	1	64	125:60
	E.co 11	floor areas	256	04	08	16	128	64	2	32	125:60:50:05
	E.co 17	work surfaces	256	02	08	08	64	64	1	32	125:60:50:05
	E.co 19	floor areas	1024	02	08	04	64	64	1	16	125:60:50:05
	E.co 79	bed frames	1024	02	08	04	64	128	1	16	125:60:50:05
	E.co 92	work surfaces	1024	04	08	04	64	128	4	8	125:60:50:05
<i>E. coli</i> HK 225 (Recipient strain)	HK 225		2	2	<01	<01	4	4	<01	4	
<i>E. coli</i> HK 225 transconjugated with K. pn 47	225-K.pn 47		128	64	32	16	32	64	1	128	165
<i>E. coli</i> HK 225 transconjugated with E.co 79	E. coli HK 225-E.co 79		256	32	32	32	256	256	1	64	125

AMP: ampicillin, CAZ: ceftazidime, CXM: cefuroxime, CRO: ceftriaxone, CTX: cefotaxime, LEX: cephalixin, CIP: ciprofloxacin, IMP: imipenem, GEN: gentamicin

representative strains. In addition, these transconjugants co-expressed other antibiotic resistance markers such as aminoglycosides (gentamicin) and quinolons (ciprofloxacin).

## DISCUSSION

The widespread emergence of antibiotic resistance, particularly multidrug resistance, among bacterial pathogens has become one of the most serious challenges in clinical therapy (Levy and Marshall, 2004; WHO, 2004). Environments containing antibiotic residues exert selection pressure and contribute to the appearance of resistant bacteria (Agerso and Sandvang, 2005; Wittwer *et al.*, 2005). Hospitals serve a reservoir of various types of microorganisms; some may be multiple resistant to antibiotics (Dancer, 1999). Although hospital staff and patients are considered the most important source of nosocomial microorganisms. There is good evidence that infection transmission via hospital environment can occur. (Dacic *et al.*, 2005). The present study has, for the first time, revealed the prevalence and antibiotic-susceptibility pattern of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* isolated from hospital environments in Algeria, giving a first insight into the occurrence of these isolates in the country.

ESBL-producing organisms were detected using several combinations of cephalosporin disks with an augmentin disk. Of the four drugs tested, ceftazidime was found to be the best ESBL detector for *E. coli* and ceftriaxone for *K. pneumoniae* in combination with augmentin. Therefore, use of only one disk combination might fail to detect ESBL production resulting in under reporting of prevalence. Simultaneous use of four



cephalosporin disks is recommended in screening for ESBL-producing organisms.

The results of the Table 1 show that the prevalence of ESBL strains isolated from hospital environments reached 21.35%. Therefore it has been reported that the healthcare environment could be an important reservoir for Gram-negative bacteria during outbreaks, given their proven ability to survive on surfaces. Previous studies reported that contamination by drug-resistant bacteria may be found on several surfaces, including the floor, the bed frame, the furniture, the patients' clothes and the bed sheets (Lerner *et al.*, 2013). Numerous studies have identified risk factors for acquiring and being infected with ESBL-producing *Enterobacteriaceae* and most of them have focused on risk factors in health care but there are some important risk factors (ex. household contacts) in the community as well (Valverde *et al.*, 2008; Kaier *et al.*, 2009). Transmission of such bacteria usually occurs via the faecal-oral route, either directly or indirectly through hand contact with healthcare workers and it is facilitated by overcrowding.

In this study, work surfaces, toilet seats and incubators were associated with high rates of ESBL positivity detected strains 32.75%, 26.67% and 20.45% respectively. It is generally assumed that Gram negative micro-organisms require moist or damp sites for enhanced longevity. Recent reports suggest that *E. coli* and *Klebsiella* spp. may survive more than a year in dry surroundings, however *Serratia marcescens* for up to two months (Kramer *et al.*, 2006; Silva-Sanchez *et al.*, 2011).

As in Europe, reports in the literature have described outbreaks of ESBL-producing *K. pneumoniae* in South Africa (Cotton *et al.*, 2000). Unfortunately, few investigations have been conducted in sub-Saharan Africa and they have provided very little data (Aibinu *et al.*, 2003). A recent study has shown that 29% of Gram negative isolates from environmental sources, including tertiary hospital from Tanzania were positive for multiple classes of  $\beta$ -lactamase. The ESBL prevalence was 64% in *K. pneumoniae* but 24% in *E. coli* (Mashana *et al.*, 2009). While, in recent study conducted at an orphanage in Mali, Tande *et al.*, (2009) reported that 63% of the adults and 100% of the children were found to carry ESBL-producing *Enterobacteriaceae* (Tande *et al.*, 2009).

The overall data on ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in the countries of the Arab Maghreb Union are extremely worrisome and this

region might indeed be one of the major epicentres of the global ESBL pandemic. In a recent study, Elhani *et al.*, (2012) found that 15, 5 % of *E. coli* and 77, 3 % of *Providencia stuartii* isolates produced ESBLs. Moreover, data collected over three years in Morocco showed that the levels of ESBLs were 1.3% in *E. coli* and 5.5% in *K. pneumoniae* (Barguigua *et al.*, 2011). A recent investigation conducted in Libya showed that 20% of clinical urinary *E. coli* isolates from inpatients and 4% of such isolates from outpatients were ESBL producers (Ghenghesh *et al.*, 2013). In Algeria, Nedjai *et al.*, (2012) reported that the overall incidence of ESBL- *K.E.S* was 31.4% distributed as follows: 17.4% of *Klebsiella* spp., 7.2% *Enterobacter* spp. and 6.8% *Serratia marcescens*.

It remains unclear as to why the prevalence of ESBL production in *E. coli*, *S. marcescens* and *K. pneumoniae* isolates from work surfaces was higher than those seen in isolates from other sources. This may be attributable to clonal dissemination of particular ESBL-producing clones, although the confirmation of such supposition is beyond the scope of this study. Several articles have previously reported that the prevalence of ESBL production was higher in intensive care units than in general wards (Bindayna *et al.*, 2009; Messai *et al.*, 2008).

In this study, all plasmids from selected isolates carried genes encoding resistance to >2 classes of antibiotics including resistance to  $\beta$ -lactams and aminoglycosides. This result is also consistent with previous studies that multiple drug resistance genes were carried on a single plasmid (Carattoli, 2009; Meradi *et al.*, 2011), which could be important vectors for dissemination of multidrug resistance by the horizontal transfer through natural mechanisms such as conjugation or transformation (Davies and Davies, 2010; Livermore *et al.*, 2007). Therefore, plasmids can also carry important genes playing an essential role in mobilization, acquisition and assembly of foreign resistance genes between bacteria existing in hospitals, communities and the environment. On the basis of their MICs the phenotype of resistance could be assigned to CTX (MIC for CAZ greater than the MIC for CTX) and CAZ (MIC for CTX greater than the MIC for CAZ) (Bedenic *et al.*, 2001).

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant of the « Ministry of Higher Education » of Algeria (Project: G02920090008). We gratefully acknowledge the

physicians and nursing staff of intensive care units (Tebessa hospitals') for their help in the collection of samples.

## REFERENCES

- Abraham, E.P. 1977.  $\beta$ -lactam antibiotics and related substances. *Jpn. J. Antibiot.* 30: 1-26.
- Agerso, Y. and Sandvang, D. 2005. Class 1 integrons and tetracycline resistance genes in *Alcaligenes*, *Arthrobacter* and *Pseudomonas* spp. isolated from pigsties and manured soil. *Applied. Environ. Microbiol.* 71: 7941-7947.
- Aibinu, I.E., Ohaegbulam, V.C., Adenipekun, E.A., Ogunsola, F.T., Odugbemi T.O and Mee, B.J. 2003. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase enzymes in clinical isolates of *Enterobacter* species from Lagos, Nigeria. *J. Clin. Microbiol.* 41(5) : 2197-21200.
- Barguigua, A., El Otmani, F., Talmi, M., Bourjilat, F., Haouzane, F., Zerouali, K. and Timinouni, M. 2011. Characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from the community in Morocco. *J. Med. Microbiol.* 60: 1344-1352.
- Bedenic, B., Randegger, C., Boras, A. and Hachler, H. 2001. Comparison of five different methods for detection of SHV extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *J. Chemother.* 13: 24-33.
- Bindayna, K.M., Senokc, A.C. and Jamsheer, A.E. 2009. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Bahrain. *J. Infect. Public Health.* 2: 129-135.
- Bradford, P.A. 2001. Extended spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clini. Microbiol. Rev.* 14: 933-951.
- Bush, K. 2009. The Importance of  $\beta$ -Lactamases to the Development of New  $\beta$ -Lactams. In: *Antimicrobial Drug Resistance*, Mayers, D.L. (Ed). Humana Press, USA. Pp. 135-144.
- Carattoli, A. 2009. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 53: 2227-2238.
- CA-SFM, 2012. Comité de l'antibiogramme de la société Française de microbiologie [Antimicrobial committee of the French society of microbiology]. [http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/CASFM/CASFM\\_2012.pdf](http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/CASFM/CASFM_2012.pdf)
- Cotton, M.F., Wasserman, E., Pieper, C.H., Theron, D.C and Van Tubbergh, D. 2000. Invasive disease due to extended spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal unit: The possible role of cockroaches. *J. Hosp. Infect.* 44: 13-17.
- Dacic, I., Morrison, D., Vukovic, D., Savic, B., Shittu, A. 2005. Isolation and molecular characterization of *Staphylococcus sciuri* in the hospital environment. *J. Clin. Microbiol.* 43: 2782-2785.
- Dancer, S.J. 1999. Mopping up hospital infection. *J. Hosp. Infect.* 43: 85-100.
- Davies, J. and Davies, D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74: 417-433.
- Elhani, D., Elhani, I. and Aouni, M. 2012. Resistance in Gram negative bacteria: What is the current situation? *La Tunisie Medicale.* 90: 680-685.
- Ghenghesh, K.S., Rahouma, A., Tawil, K., Zorgani, A and Franka, E. 2013. Antimicrobial resistance in Libya: 1970-2011. *Libyan. J. Med.* 8:1-8.
- Huovinen, P., Huovinen, S and Jacoby, G.A. 1988. Sequence of PSE-2  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 32:134-136.
- Jarlier, V., Nicolas, M.H., Fournier, G and Philippon, A. 1988. Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* 10: 867-878.
- Kado, C.I. and Liu, S.T. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145: 1365-1373.
- Kaier, K., Frank, U., Hagist, C., Conrad, A and Meyer, E. 2009. The impact of antimicrobial drug consumption and alcohol-based hand rub use on the emergence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing strains: A time-series analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* 63: 609-614.
- Khan, A.S., Dancer, S.J. and Humphreys, H. 2012. Priorities in the prevention and control of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* in hospitals. *J. Hosp. Infect.* 82: 85-93.
- Kramer, A., Schwebke, I. and Kampf, G. 2006. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC. Infect. Dis.* 6:130-136
- Lerner, A., Adler, A., Abu-Hanna, J., Meitus, I., Navon-Venezia, S and Carmeli Y. 2013. Environmental contamination by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 51: 177-181.
- Levy, S.B and Marshall B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. *Nat. Med.* 10: S122-S129.
- Livermore, D.M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P. and Rossolini, G.M. 2007. CTX-M: Changing the face of ESBLs in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* 59 : 165-174.
- Mashana, S.E., Kamugisha E., Mirambo, M., Chakraborty, T. and Lyamuya, E.F. 2009. Prevalence of multiresistant Gram-negative organisms in a tertiary hospital in Mwanza, Tanzania. *BMC. Res. Notes.* 2: 49-55.
- Meradi, L., Djahoudi, A., Abdi, A., Bouchakour, M., Perrier Gros Claude, J.D. and Timinouni, M. 2011. Qnr and aac (6')-Ib-cr types quinolone resistance among *Enterobacteriaceae* isolated in Annaba, Algeria. *Pathol. Biol.* 59: e73-e78.
- Messai, Y., Ibadene, H., Benhassine, T., Alouache, S. and Tazir, M. 2008. Prevalence and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella*

- pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Pathol. Biol.* 56: 319-325.
- Miller, H.J. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 466p.
- Minarini, L.A.R., Gales, A.C., Palazzo, I.C.V and Darini, A.L.C. 2007. Prevalence of community-occurring extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Brazil. *Curr. Microbiol.* 54: 335-341.
- Nedjai, S., Barguigua, A., Djahmi, N., Jamali, L., Zerouali, K., Dekhil, M and Timinouni, M. 2012. Prevalence and characterization of extended spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella-Eenterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. *Medecine et Maladies Infectieuses.* 42: 20-29.
- Reddy, P., Malczynski, M., Obias, A., Reiner, S. and Jin, N. 2007. Screening for extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae among high-risk patients and rates of subsequent bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* 45: 846-852.
- Rupp, M.E. and Fey, P.D. 2003. Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae: Considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs.* 63: 353-365.
- Silva-Sanchez, J., Garza-Ramos, J.U., Reyna-Flores, F., Sanchez-Perez, A and Rojas-Moreno, T. 2011. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae causing nosocomial infections in Mexico. A retrospective and multicenter study. *Arch. Med. Res.* 42: 156-162.
- Tande, D., Jallot, N., Bougoudogo, F., Montagnon, T., Gouriou, S and Sizun, J. 2009. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in a Malian orphanage. *Emerg. Infect. Dis.* 15: 472-480.
- Valverde, A., Grill, F., Coque, T.M., Pintado, V., Baquero, F., Canton, R and Cobo, J. 2008. High rate of intestinal colonization with extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing organisms in household contacts of infected community patients. *J. Clin. Microbiol.* 46 : 2796-2799.
- WHO. 2004. World Health Organization report on infectious diseases 2000: Overcoming antibiotic resistance. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Wittwer, M., Keller, J., Wassenaar, T.M., Stephan, R., Howald, D., Regula, G and Bissig-Choisat, B. 2005. Genetic diversity and antibiotic resistance patterns in a *Campylobacter* population isolated from poultry farms in Switzerland. *Applied. Environ. Microbiol.* 71: 2840-2847.
-