

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Hassiba Ben Bouali - Chlef -
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie



Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de MASTER en Microbiologie
Option : Microbiologie

Thème

**Isolement et caractérisation de bactéries pathogènes
nosocomiales dans deux milieux hospitaliers**

Chlef et Batna

Présenté par : M^{lle} GRIBI Kahina

Soutenue le : 05 /06/2016

Devant le jury:

Président : Mr. El Hameur H .

Maître de conférences B

Promoteur : Mr. Sebaihia M.

Maître de conférences A

Examinatrice : M^{me} Nehal F.

Maître -assistante A

Année universitaire : 2015 - 2016

Remerciements

Avant tout je remercie Dieu le tout puissant pour le courage et la volonté qu'il m'a accordé pour mener à bien ce modeste travail.

*Je tiens à exprimer mes sincères remerciements, ma haute considération et mon profond respect à mon encadreur, Mr.**SEBAIHIA M.** Maître de Conférences A à l'université de Chlef, qui m'a guidé et encouragé au cours de ce travail, également pour sa gentillesse, sa disponibilité et sa patience.*

*Mes remerciements les plus respectueux à Mr.**EI HAMEUR H.** Maître de Conférences B à l'université de Chlef, de m'avoir fait l'honneur de présider le Jury.*

*Mes remerciements les plus respectueux à Mme **NEHAL F.** Maître assistante A à l'université de Chlef, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant d'examiner ce travail.*

*Je vous voudrais remercier M^{elle} **DJEBBAR A.**, pour l'honneur qu'elle m'a fait en dirigeant ce travail, pour sa gentillesse, ses aides et ses précieux conseils, tout au long de l'élaboration de ce modeste travail.*

*Je remercie également M^{elle} **NAAMOUN R.** pour son soutien, ses encouragements et sa gentillesse.*

Mes vifs remerciements s'adressent à tous mes enseignants qui ont participé à ma formation.

*Mes remerciements à l'équipe de l'Hôpital **SŒURS BEDJ** de Chlef pour leur aide et surtout pour leur gentillesse.*

*Mes plus vifs remerciements s'adressent au Médecin généraliste Dr. **GRIBI H.**, au Dr. Vétérinaire Mr. **BOUDJELTIA A.** et également au Dr. Vétérinaire Mr. **LAHSSEN**, pour leur coopération et leur disponibilité.*

*Mes remerciements les plus respectueux à Mr. le Professeur **ROUABHIA** au C.H.U. de Batna pour son aimable collaboration.*

*Je remercie également le doctorant **BOUDJLEL Y.** pour son aide précieuse dans la collection des échantillons.*

Enfin mes remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près et de loin.

Dédicace

Je dédie cet humble travail :

A mes très chers parents, que Dieu me les gardent et protègent.

A mes frères et sœurs.

A toute ma grande famille.

A mes chères amies.

A tous mes collègues de la promotion Microbiologie 2015/2016.

Je vous souhaite tous un avenir plein de succès, de bonheur et de santé.

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abbréviations

Introduction générale

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Généralités sur les infections nosocomiales.....	3
2. Prévalence des IN et dégâts en chiffres.....	3
3. Principales infections nosocomiales.....	5
4. Facteurs influençant les infections nosocomiales.....	5
5. Principaux agents responsables d'infections nosocomiales.....	6
5.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	7
5.1.1 Caractères généraux.....	7
5.1.2 Pouvoir pathogène.....	7
5.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
5.2.1Caractères généraux.....	8
5.2.2 Pouvoir pathogène.....	8
5.3 <i>Clostridium difficile</i>	9
5.3.1 Caractère généraux.....	9
5.3.2 Pouvoir pathogène.....	9
5.4 Les Entérobactéries.....	10
5.4.1 <i>Escherichia coli</i>	10
5.4.1.1 Caractères généraux.....	10
5.4.1.2 Pouvoir pathogène.....	11
5.4.2 <i>Proteus mirabilis</i>	11
5.4.2.1Caractères généraux.....	11
5.4.2.2 Pouvoir pathogène.....	11
5.4.3 <i>Klebsiella</i>	11
5.4.3.1Cractères généraux.....	11
5.4.4 <i>Enterobacter</i>	12
5.4.4.1 Caractères généraux.....	12
5.4.5 <i>Citrobacter</i>	12

Table des matières

5.4.5.1 Caractères généraux.....	12
5.4.5.2 Pouvoir pathogène.....	12
5.4.6 <i>Acinetobacter baumannii</i>	12
5.4.6.1 Caractères généraux.....	12
5.4.6.2 Pouvoir pathogène.....	13
6. Diagnostic des infections nosocomiales.....	13
7. La prévention des infections nosocomiales.....	13

Chapitre II : Mathériels et méthodes

1. Echantillonnage.....	14
2. Isolement et purification des souches bactériennes.....	15
3. Identification des bactéries.....	15
3.1 Etude macroscopique.....	16
3.2 Etude microscopique.....	16
3.3 Identification biochimique.....	16
3.4 Test de coagulase.....	16
4. Conservation des souches.....	16
5. Antibiogramme des souches isolées.....	17
6. Isolement de <i>C. difficile</i>	18
6.1 Prétraitement des selles par choc alcoolique.....	18
6.2 Culture et purification des souches de <i>C. difficile</i>	18
7. Bactériophage.....	19
7.1 Préparation des filtrats et des cultures bactériennes.....	19
7.2 Isolement des bactériophages par la méthode de dilution.....	19
7.3 Conservation de bactériophage.....	19
8. Extraction de l'ADN chromosomique et plasmidique.....	21
8.1 Extraction de l'ADN chromosomique des souches de <i>C. difficile</i>	21
8.2 Identification de <i>C. difficile</i> par PCR-duplex.....	21
8.3 Essai d'extraction d'ADN plasmidique à partir des souches isolées des surfaces de l'hôpital.....	22
9. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	23

Table des matières

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Isolement et identification des bactéries.....	24
1.1 <i>S.aureus</i>	24
1.2 <i>P. aeruginosa</i>	25
1.3 <i>Enterobactéries</i>	25
1.3.1 <i>E. cloacae</i>	25
2. Identification biochimique	27
3. Fréquence des souches isolées	28
4. Répartition des souches en fonction des services	29
5. Isolement du pathogène <i>C. difficile</i> agent des diarrhées post-antibiotiques.....	30
6. Profils de résistance aux antibiotiques.....	32
7. Isolement de bactériophage.....	33
8. Extraction de plasmides.....	35

Conclusions et perspectives

Références bibliographiques

Annexes

Liste des Abréviations

ADN : Acide DesoxyriboNucléique

ATM : Aztréonam

BET : Bromure d'Ethidium

BN : Bouillon Nutritif

°C : Degré Celsius

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

CAZ : Ceftazidime

CDC : The Center for Disease Control and prevention

C.H.U. : Centre Hospitalier Universitaire

CIP : Ciprofloxacine

CT : Colistine

CTX : Céfotaxime

CO₂ : Carbon Dioxyde

Co-trimoxazole : COT

dNTP : désoxyribonucléotides triphosphate

ECDC : European Center for Disease Prevention and Control

ERY : Erytromycine

GN : Gélose Nutritive

h : heure

H₂ : Hydrogène

IN : Infection Nosocomiale

MLST : Multilocus Séquence Typing

M : molaire

min : minute

ml : millilitre

mM : millimolaire

μM : micromètre

μl : Microlitre

N₂ : Azote

Pb : Paire de Base

PM : Poids Moléculaire

pH : Potentiel d'Hydrogène

OF : Ofloxacin

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OX : Oxacillin

RAPD : Random amplified Polymorphic DNA

PED : Pays En voie de Développement

R : Resistant

PCR : Polymerase Chain Reaction

RIF : Rifampicin

S : Sensible

S : Streptomycin

SCN : Staphylococcus à Coagulase Négative

TAE : Tris Acetate EDTA

TE : Tris-EDTA

TE : Tétracyclines

tr/min : Tours par minute

Tox A : Toxine A

Tox B : Toxine B

UHBC : Université Hassiba Ben Bouali de Chlef

UV : Ultra Violet

V : Volt

VA: Vancomycin

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
Tableau 1	Récapitulation des données relatives aux prélèvements.	15
Tableau 2	Liste des antibiotiques testés sur <i>P. aeruginosa</i> .	17
Tableau 3	Liste des antibiotiques testés sur les entérobactéries.	17
Tableau 4	Liste des antibiotiques testés sur les <i>Staphylocoques</i> .	18
Tableau 5	Amorces utilisées pour l'amplification du fragment du gène <i>tcdA</i> (toxine A) et <i>tcdB</i> (toxine B).	21
Tableau 6	Programme d'amplification utilisé.	22
Tableau 7	Caractères morphologiques et cultureux des souches isolées.	26
Tableau 8	Résultats de lecture des codes sur <i>API Web</i> .	28
Tableau 9	Représentation des résultats de l'antibiogramme des différentes souches testées.	32

Liste des figures

N°	Titre	Page
Figure 1	Les coûts annuels des IN aux USA .	4
Figure 2	Proportions des principales infections nosocomiales .	4
Figure 3	Éléments contribuant au développement d'une IN.	5
Figure 4	Principales bactéries impliquées dans les infections nosocomiales.	6
Figure 5	Facteurs de virulence de <i>S. aureus</i> .	7
Figure 6	Facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i> .	9
Figure 7	Principales voies de la transmission nosocomiale de <i>C.difficile</i> .	10
Figure 8	Protocole d'isolement de bactériophage par la méthode de dilution	20
Figure 9	Test de catalase <i>S. aureus</i> (+)	24
Figure 10	Résultat du test de coagulase (+)	24
Figure 11	Test catalase <i>P.aeruginosa</i> (+)	25
Figure 12	Test oxydase <i>P.aeruginosa</i> (+)	25
Figure 13	Identification biochimique des souches par le système <i>APIWeb</i>	27
Figure 14	Fréquence des souches identifiées à partir des prélèvements de surface	29
Figure 15	Répartition des souches en fonction des services	29
Figure 16	Répartition des souches isolées en fonction des services	30
Figure 17	Electrophorèse sur gel d'agarose des résultats de la PCR pour la Toxine A/B de <i>C. difficile</i>	31
Figure 18	Résultats du test d'antibiogramme pour quelques isolats	33
Figure 19	Plages de lyse de bactériophages sur un tapis de culture de la souche de <i>P. aeruginosa</i> (PC1)	34
Figure 20	Électrophorèse sur gel d'agarose des plasmides isolés à partir des souches de <i>P. aeruginosa</i> PC1 et PC2	35

Introduction

Introduction générale

Les infections nosocomiales sont un problème de santé mondial, tous les pays riches ou pauvres, sont concernés. Chaque jour, les infections nosocomiales causent des pertes humaines, la prolongation de l'hospitalisation des patients et l'augmentation du coût de traitement et de la prise en charge des patients. Ce phénomène est aggravé par l'émergence de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques dans les milieux de soins.

Les infections nosocomiales sont un fardeau important tant pour les patients que pour les autorités de la santé publique.

De nombreuses enquêtes de prévalence menées dans les hôpitaux de plusieurs pays du monde ont montré que le nombre d'infections nosocomiales est très élevé et alarmant. Une de ces études, coordonnée par le réseau NosoMed, et menée dans 27 hôpitaux de 5 pays (Algérie, Egypte, Italie, Maroc et Tunisie), a montré que la prévalence des infections nosocomiales dans la région méditerranéenne était de 10,5 % (Amazian *et al.* 2010).

La survenue d'une infection nécessite l'association de plusieurs facteurs liés au micro-organisme, à la voie de transmission (patient et personnel soignant) et à l'hôte susceptible (patient). De nombreuses études ont démontré l'importance de l'environnement hospitalier, particulièrement les surfaces, comme facteur de transmission des infections nosocomiales. Les surfaces peuvent être contaminées par les microorganismes issus du patient lui-même ou par le personnel soignant ou par les visiteurs.

La surveillance microbiologique de l'environnement hospitalier représente un des axes majeurs des stratégies de lutte contre les infections nosocomiales (Otter *et al.* 2013).

En Algérie très peu de données sur l'ampleur national des infections nosocomiales sont disponibles, à l'exception de quelques études locales, à l'échelle de certains établissements de soins. Malgré l'existence de textes réglementaires, les programmes de surveillances des infections nosocomiales ne sont pas structurés et coordonnés autour d'un programme national.

Introduction générale

Vu les insuffisances de données sur les infections nosocomiales dans notre pays, nous avons tenté par ce projet à contribuer à la compréhension de ce phénomène au niveau local à travers les objectifs spécifiques suivants :

- Isolement et caractérisation des bactéries responsables d'infections nosocomiales présentes sur les surfaces dans quelques services d'un hôpital à Chlef.
- Isolement et caractérisation de *Clostridium difficile*, un pathogène nosocomial, à partir de selles diarrhéiques de patients hospitalisés.
- Analyse des profils d'antibiorésistance des pathogènes isolées.
- Isolement de bactériophages lytiques et spécifiques aux bactéries responsables d'infections nosocomiales.

CHAPITRE I

Synthèse bibliographique

1. Généralités sur les infections nosocomiales

Le terme nosocomial, vient du grec « nosos » signifiant maladie et secondairement de « nosokomeone » qui signifie hôpital; il qualifie ce qui se rapporte à ce milieu, ce qui se contracte lors d'un séjour hospitalier (Margot et Chantal, 2009).

L'infection nosocomiale (IN), ou récemment appelée infection associée aux soins, est une maladie infectieuse (bactérienne, fongique, parasitaire, virale) qui survient au cours de la prise en charge d'un patient dans un hôpital ou autres établissements de soin, et elle n'était ni présente, ni en incubation au début de l'admission. Une IN peut affecter soit le patient soit le personnel soignant (Veyssier *et al.*, 1996).

2. Prévalence et conséquences des IN

Les IN constituent actuellement un problème majeur de santé publique, aucune institution ou pays n'est épargné. Sur la base de données dans de nombreux pays, le nombre d'IN est estimé en centaines de millions de patients chaque année à travers le monde, causant des pertes humaines, prolongation de l'hospitalisation des patients et augmentation du coût de traitement et de la prise en charge des patients. Les IN sont un fardeau important tant pour les patients que pour les autorités de la santé publique (Vaubourdolle, 2007).

Un rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), rapporte que 4,5% des patients nouvellement admis dans un hôpital, dans les pays industrialisés, seront touchés par une IN (WHO, 2011). L'European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) estime ainsi que 4 131 000 patients en Europe ont développé une IN en 2008, pour un total de 4 544 100 épisodes infectieux (Klevens *et al.*, 2002). Aux Etats Unis d'Amérique (USA), 1,7 million de patients ont été touchés en 2002. Dans les pays en voie de développement (PED), la prévalence des IN est plus élevée, et est de l'ordre de 10 à 15% des patients hospitalisés (figure 1 et 2) (WHO, 2011).

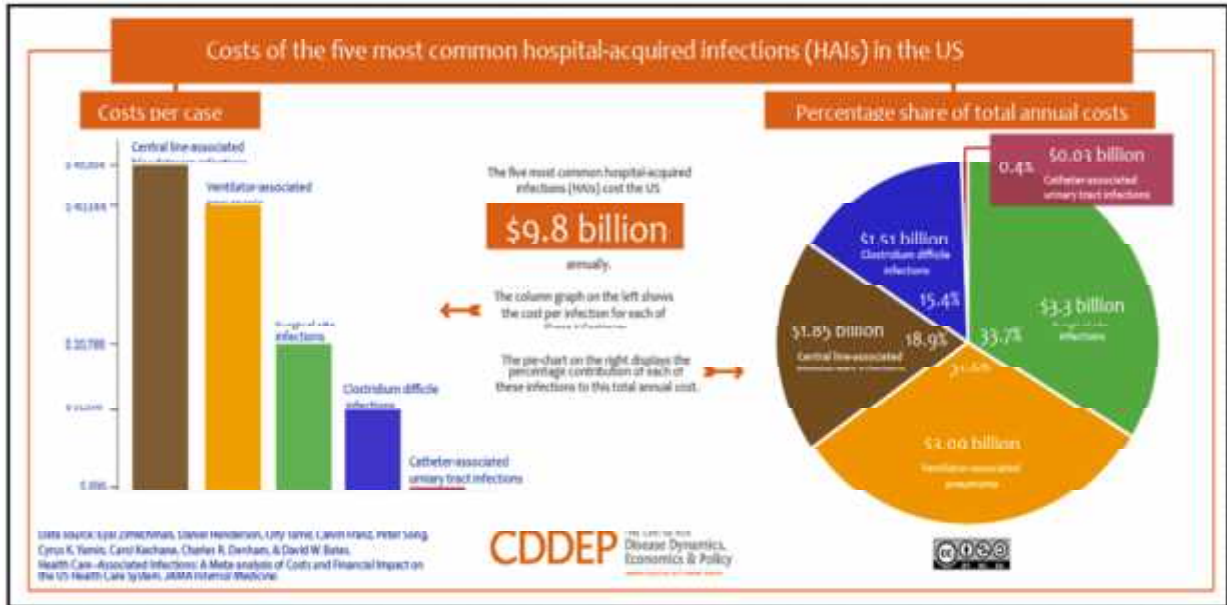


Figure 1 : Les coûts annuels des IN aux USA (source CDDEP, 2012)

Les enquêtes menées en Algérie ont estimé que la prévalence des IN est de 30,8% pour les infections urinaires, suivies par 26,9% dans les sites opératoires et 23,1% pour les pneumonies (Atif et al., 2006 ; Atif et al., 2010).

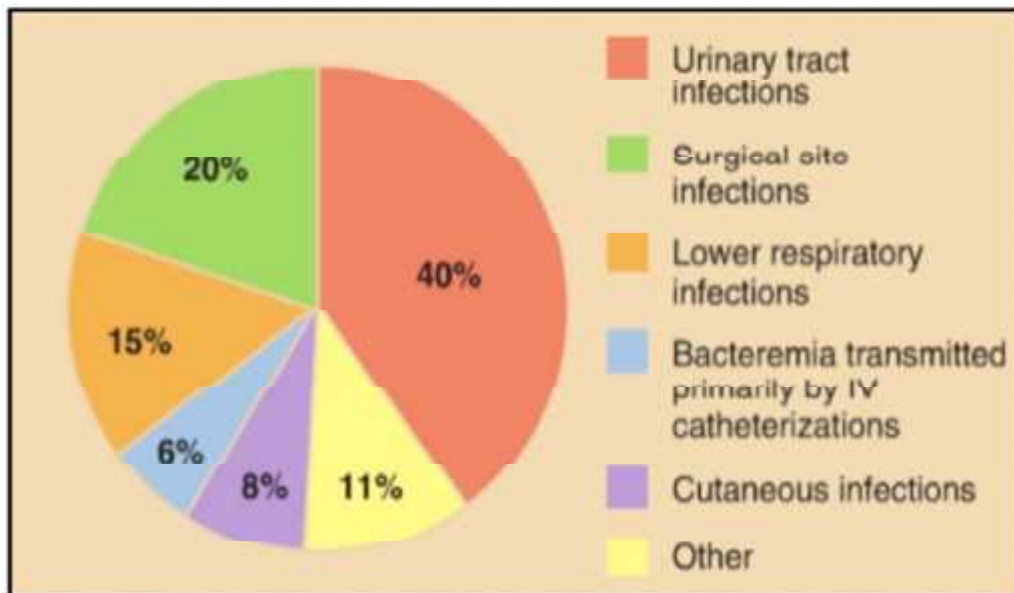


Figure 2 : Proportions des principales infections nosocomiales (source ECDC).

3. Principales infections nosocomiales

La contamination de l'environnement hospitalier varie d'une manière qualitative et quantitative d'un établissement à un autre, et au sein d'un même établissement, en fonction des services, des patients et des soins pratiqués. Les sites les plus fréquemment infectés sont les sites urinaires, opératoires, et pulmonaires (Figure 3).

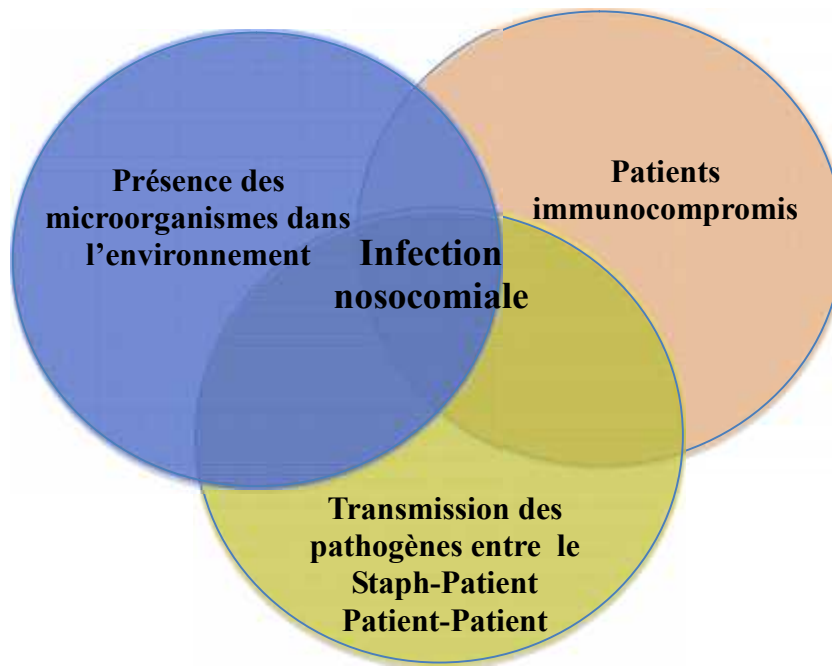


Figure 3 : Eléments contribuant au développement d'une IN.

4. Les facteurs influençant les infections nosocomiales

Le développement d'une IN dépend de trois éléments principaux, la présence des microorganismes pathogènes dans le milieu hospitalier, l'hôte susceptible (patient immunodéprimé) et le mode de transmission.

Les IN peuvent être d'origine endogène et exogène. Les infections endogènes sont causées par les microorganismes présents sur et dans le corps du patient. Les infections exogènes sont acquises à partir de l'environnement hospitalier, le personnel de l'hôpital, les instruments médicaux (Ellenberg, 2005 ; Ducel *et al.*, 2002).

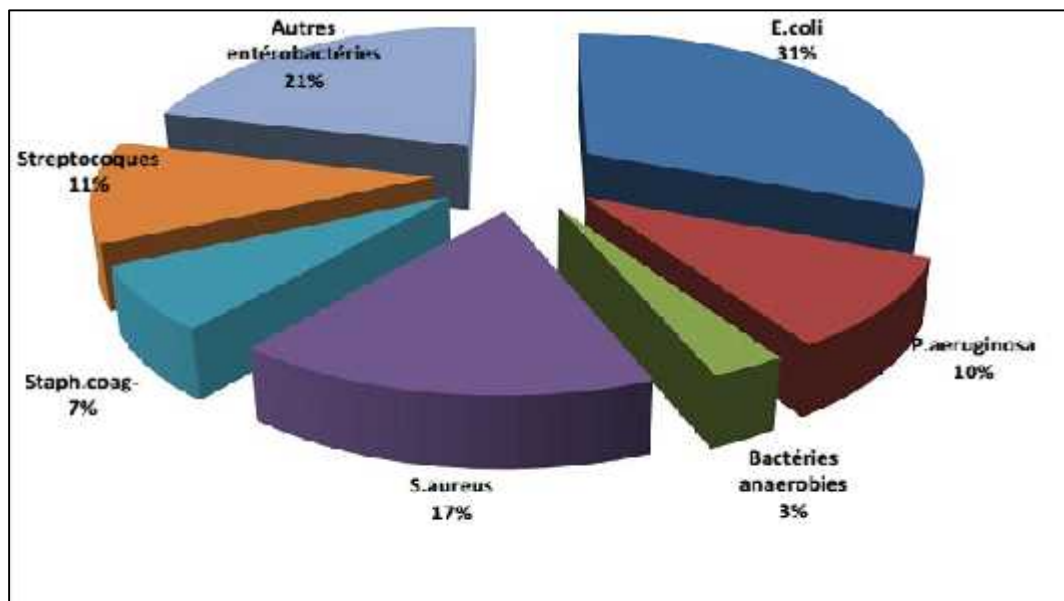
Bien qu'il est difficile de distinguer entre les sources d'infections endogènes et exogènes, plusieurs autres facteurs peuvent jouer un rôle majeur dans la survenue des IN tels que l'âge du malade, les pratiques thérapeutiques, l'infrastructure hospitalière, les vecteurs de

transmission (l'air et les insectes), les visiteurs et les aliments contaminés, etc... (Gassier, 2006).

5. Principaux agents responsables d'infection nosocomiale

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. Parmi ces microorganismes, les bactéries jouent un rôle potentiel dans les infections hospitalières (figure 4) (CTIN, 2002).

Parmi les bactéries à Gram négatif, la famille des *Enterobacteriaceae* est la plus représentée, et les genres *Pseudomonas* et *Acinetobacter* ont également un impact conséquent. Pour les bactéries à Gram positif, on retrouve les genres *Staphylococcus* et *Enterococcus* (Wolk et Dunne, 2011).



Figures 4 : Principales bactéries impliquées dans les infections nosocomiales
(Botterel et al., 2004).

5.1 *Staphylococcus aureus*

5.1.1 Caractères généraux

Les staphylocoques sont des bactéries commensales de la peau et des muqueuses de l'homme et de l'animal. L'homme est le principal réservoir naturel de *Staphylococcus*, il présente un portage sain, principalement au niveau des cavités nasales (Wylie *et al.*, 2005).

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif, isolés ou groupés en amas, immobiles, non sporulés, parfois encapsulés, à catalase positive et oxydase négative. La production d'une coagulase, d'un pigment caroténoïde jaune doré et la présence d'une protéine A de paroi caractérisent *S. aureus*. Les autres espèces sont regroupées sous le terme de staphylocoques à coagulase négative (SCN), dont le représentant principal est *S. epidermidis* (Mee-Marquet *et al.*, 2004).

5.1.2 Pouvoir pathogène

Le *S. aureus* est l'un des principaux pathogènes associés aux infections nosocomiales. Il est l'agent le plus fréquemment impliqué dans les bactériémies, responsable de nombreuses infections de site chirurgical et d'un nombre considérable de pneumonies nosocomiales (Marie-Claude, 2012). Les constituants de la paroi des staphylocoques, les substances enzymatiques et toxiques produites, hydrolysant différents constituants cellulaires contribuent à la pathogénie des staphylocoques (figure 5) (Arvidson , 2000).

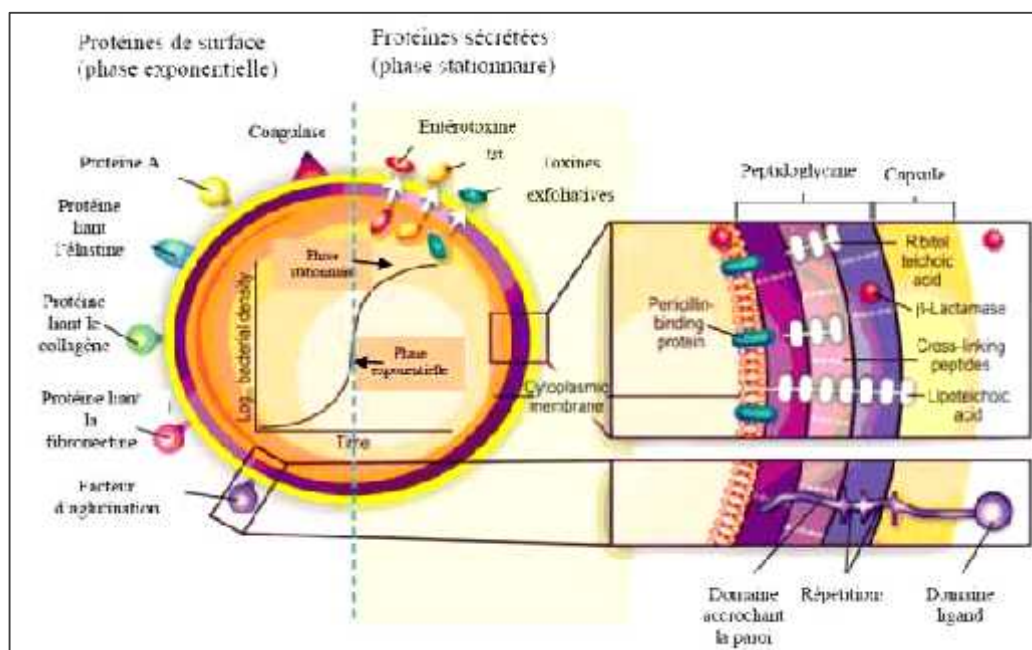


Figure 5 : Facteurs de virulence de *S. aureus* (Gordon *et al.*, 2008).

5.2 *Pseudomonas aeruginosa*

5.2.1 Caractères généraux

P. aeruginosa se présente comme un fin bacille fin à Gram négatif de (0.5x3µm), asporulé et acapsulé, mobile grâce à une ciliature polaire, il possède souvent des granulations plus fortement colorées (Hafiane et Ravaoarino, 2008). Un milieu sélectif, contenant du cétrimide, est utilisé pour l'isolement de *P.aeruginosa* à partir de prélèvement polymicrobiens (Avril et al.,1992).

P. aeruginosa est une bactérie chimio-organotrophe, réduisant les nitrates en nitrites, elle possède deux pigments caractéristiques : la pyoverdine et la pyocyanine et est caractérisée par sa résistance aux antiseptiques et aux antibiotiques (Avril et al.,1992).

P. aeruginosa est ubiquitaire dans l'environnement et peut être commensale du tube digestif. Dans l'environnement, elle est trouvée dans le sol, dans l'eau, à la surface des plantes et des animaux. En milieu hospitalier, *P. aeruginosa* est parfois retrouvée dans les solutions aseptiques et sur les instruments tels que les cathéters, les sondes, ou encore dans les canalisations, les lavabos (Wolfgang, Kulasekara et al. 2003).

5.2.2 Pouvoir pathogène

P. aeruginosa est doté d'un véritable arsenal de facteurs de virulence qui sont, soit directement associés à sa cellule (flagelle, pilli, lipopolysaccharide, alginate), soit excrétés dans le milieu extracellulaire (exotoxines, exoprotéases, hémolysines et chromophores) (figure 6) (Richard, 2005).

P. aeruginosa est reconnue comme un pathogène nosocomial majeur chez les patients immuno-compromis ou affaiblis (Mandell, 2005 ; Mesaros et al., 2007). Elle est à l'origine de 16 % des cas de pneumonies hospitalières et de 12 % des infections urinaires nosocomiales (Berthelot et al., 2005 ; Adjidé et al., 2006).

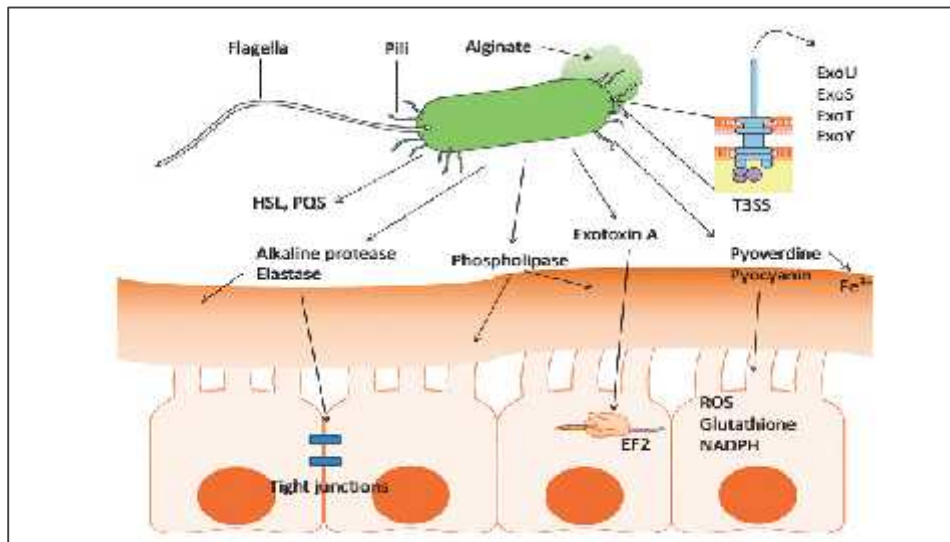


Figure 6 : Facteurs de virulence de *P. aeruginosa* (Gellatly et Hancock, 2013).

5.3 *Clostridium difficile*

5.4.1 Caractères généraux

C. difficile est un bacille à Gram positif, de taille variable (0,5 à 1,9 µm de diamètre et de 3,0 à 16,9 µm de long), anaérobie, encapsulé, mobile grâce à une ciliature péritriche, il possède des spores ovales et subterminales leur permettant de persister dans l'environnement pendant de longues périodes, retrouvé dans l'environnement ainsi que dans l'intestin de l'homme et de l'animal (Hatheway, 1990 ; Brazier et Borriello, 2000).

Sur la gélose à base du sang, les colonies de *C. difficile* sont plates de 3 à 5 mm, blanches à grises, non hémolytiques, et de contour irrégulier. Elles présentent un aspect de verre brisé et une odeur caractéristique de crottin de cheval (Aktories et Wilkins, 2000).

5.4.2 Pouvoir pathogène

C. difficile est la principale bactérie responsable de 15 à 25% des diarrhées post-antibiotiques et de plus de 95 % des cas de colites pseudo-membraneuses. L'antibiothérapie déséquilibre le microbiote intestinal de barrière en diminuant sa diversité permettant à *C. difficile* de s'implanter et de se multiplier. Les souches toxigènes produisent deux toxines (A et B) entraînant des lésions intestinales (figure 7) (Deneve, 2009).

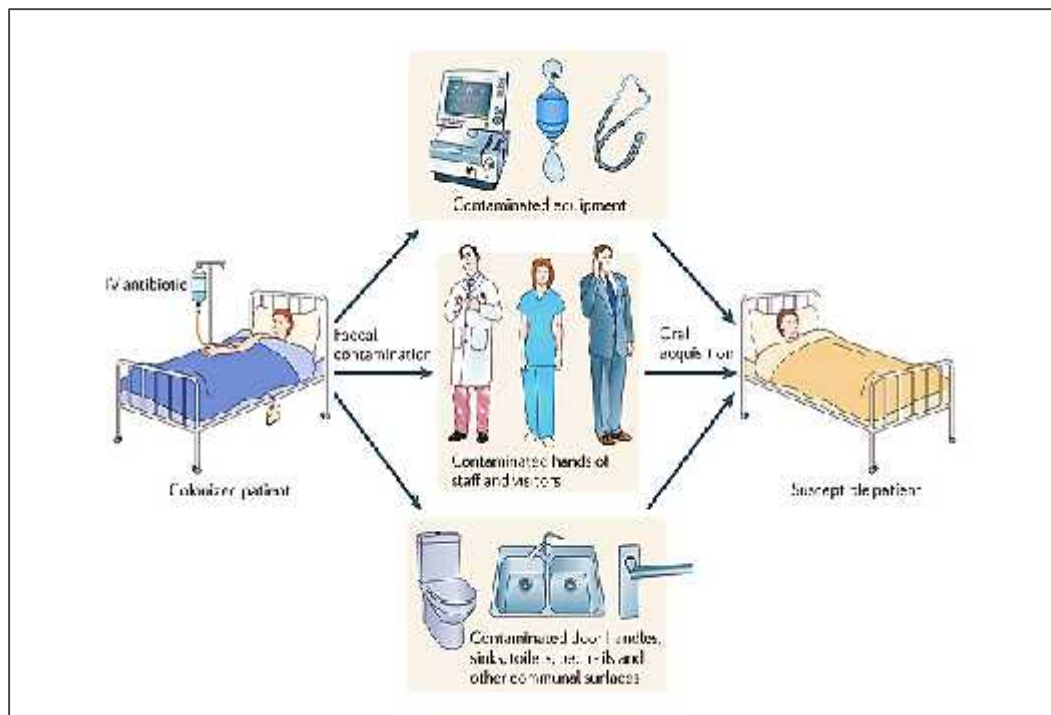


Figure 7 : Principales voies de la transmission nosocomiale de *C.difficile*
(Arias et Murray , 2012).

5.4 Les entérobactéries

Les entérobactéries sont définies par un ensemble de caractères généraux communs. Ce sont des bacilles à Gram négatif, dont les dimensions varient de 6 µm de long et 0,3 à 1 µm de large mobiles avec ciliature péritriche ou immobiles, aérobies-anaérobies facultatifs (Nauciel et Vildé, 2005).

Elles se retrouvent partout dans le sol, l'eau, et surtout dans l'intestin de l'homme et des animaux. Leur abondance dans l'intestin, leur mobilité, la rapidité de leur multiplication, l'acquisition fréquente de mécanismes de résistance aux antibiotiques expliquent qu'elles soient les bactéries les plus souvent impliquées en pathologie infectieuse humaine surtout en milieu hospitalier (Verhaegen, 2004).

5.4.1 *Escherichia coli*

5.4.1.1 Caractères généraux

E. coli est une bactérie normalement présente parmi la microflore digestive de l'homme et des animaux à sang chaud. Mais certaines souches d'*E.coli* sont pathogènes car elles ont acquis des facteurs de virulence (Verhaegen,2004)

5.4.1.2 Pouvoir pathogène

E. coli provoque 40 à 50% des IN (Verhaegen,2004). Les souches pathogènes d'*E. coli* sont responsables d'infections intestinales et extra-intestinales, et sont classées dans des variétés selon leur facteur de pathogénicité. Parmi les principaux facteurs de virulence d'*E. coli* on distingue : la capsule polysaccharidique, les adhésines qui permettent l'adhésion à des globules rouges et aux cellules épithéliales (Nauciel, 2000).

5.4.2 *Proteus mirabilis*

5.4.2.1 Caractères généraux

P.mirabilis est l'espèce la plus fréquemment isolée de prélèvements cliniques. Après *E. coli*, elle est la bactérie la plus souvent isolée des urines et elle est à l'origine aussi d'IN (Mahrouki et al., 2009). Ce sont des 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 milieu gélosé, *P.mirabilis* et *P.vulgaris* peuvent envahir la surface du milieu en formant des ondes concentriques (Berche et al.,1988 ; Avril et al., 2000).

5.4.2.2 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).

5.4.3 *Klebsiella*

5.4.3.1 Caractères généraux

Ce sont des bacilles à Gram négatifs entourés d'une capsule mais il ya un cas exceptionnel environ 60% de *Klebsiella pneumoniae* et 18% de *Klebsiella oxytoca* sont dépourvues de capsule sont présentes dans le tube digestif (Euzéby, 2004). Les *Klebsiella* sont des germes opportunistes chez les malades fragilisés (Delarras, 2007) qui peuvent impliquer dans d'IN généralement les infections urinaires, les pneumopathies et les septicémies (Sougakoff et Trystam, 2003).

5.4.4 *Enterobacter*

5.4.5.1 Caractères généraux

Les *Enterobacter* sont des bacilles à Gram négatifs, anaérobies facultatives généralement mobiles (Delarras, 2007). Les espèces du genre *Enterobacter*, en particulier *E. cloacae* et *E. aerogenes*, sont des pathogènes responsables d'infections nosocomiales diverses, y compris la bactériémie, les infections des voies respiratoires et urinaires, l'endocardite, les infections intraabdominales et ophtalmiques, l'arthrite septique et les ostéomyélites (Fraser et al., 2010).

5.4.5 *Citrobacter*

5.4.5.1 Caractères généraux

Les *Citrobacter* sont des bactéries commensales du tube digestif de l'homme et des animaux, mais aussi saprophytes de l'environnement (sol, eaux usées, aliments). Ce sont des 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).

5.4.5.2 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 (Brenner et al., 2005).

5.4.6 *Acinetobacter baumannii*

5.4.6.1 Caractères généraux

A. baumannii est un coccobacille à Gram négatif, non fermentant, aérobie stricte, asporulé, parfois capsulé, immobile, possède une catalase positive et dépourvu d'oxydase. C'est une bactérie ubiquitaire, pouvant isolée à partir du sol, de l'eau, des animaux et de l'homme et capable d'utiliser une grande variété de substrats comme source d'énergie (Giamarellou et al., 2008).

5.4.6.2 Pouvoir pathogène

A. baumannii s'est imposé comme un pathogène hospitalier, responsable de nombreuses infections nosocomiales (septicémies, méningites, suppurations diverses, infections urinaires, pneumopathie), causant de réelles difficultés thérapeutiques du fait de sa capacité à développer plusieurs mécanismes de résistance à de nombreux antibiotiques (Baron et al, 1995).

6. Diagnostic des infections nosocomiales

Le diagnostic des IN repose sur des critères cliniques, radiologiques, biologiques et microbiologiques. Les trois premiers critères manquent bien souvent de spécificité et/ou de sensibilité. L'examen microbiologique permet d'identifier les pathogènes responsables des infections, et de déterminer leur sensibilité aux antibiotiques. Cela permet de choisir le traitement adapté à chaque patient. Avec l'apparition de plus en plus de souches multi-résistantes, la surveillance et le diagnostic rapide de ces pathogènes sont des éléments primordiaux.

Actuellement, les techniques de la biologie moléculaire comme la PCR (polymerase Chain Reaction); RAPD (Random amplified Polymorphic DNA); MLST (Multilocus Séquence Typing), ont l'avantage d'être rapides, très sensibles et très spécifiques pour la détection des pathogènes nosocomiaux (Weinstein, 2011).

7. Prévention des infections nosocomiales

L'hygiène hospitalière est une discipline médicale qui a comme objectif la lutte contre les infections nosocomiales. Elle repose sur des recommandations établies en ce qui concerne : les professionnels, les actes de soins, les dispositifs médicaux, les aspects hôteliers et logistiques (circuits, entretien, travaux, linge, déchets...) (Reed, 2009). Le risque de contamination nosocomiale, aux centres de santé reste notablement élevé. Donc le protocole d'hygiène et d'asepsie doit être une démarche systématique que toute personne doit appliquer quotidiennement (Reed, 2009).

La prévention de la transmission nosocomiale de *C.difficile* repose sur l'utilisation rationnelle d'antibiotiques, un diagnostic rapide, un traitement précoce des patients, la mise en place d'un isolement septique (les précautions de contact) des patients infectés, Celui-ci s'accompagne d'une sensibilisation du personnel soignant et des malades sur les risques de transmission manuportée de *C. difficile* (Barbut et al., 2004).

CHAPITRE II

Matériels et méthodes

Chapitre II : Matériels et méthodes

Cette étude a été entretenue dans un Hôpital à la Wilaya de Chlef (Hôpital sœurs Bedj) afin d'étudier les principales bactéries présentes dans cet environnement hospitalier. D'autre part, un essai d'isolement du pathogène nosocomial anaérobie : *C.difficile* a été lancé en parallèle dans un autre Centre Hospitalo-Universitaire à la Wilaya de Batna, dans lequel des prélèvements de selles à partir des patients hospitalisés sous traitement antibiotiques ont été collectés. Les principaux objectifs de notre travail étaient :

- Isolement des bactéries pathogènes à partir des surfaces de l'hôpital.
- Identification biochimique de ces bactéries.
- Evaluation de l'antibiorésistance des souches d'intérêt isolées.
- Caractérisation moléculaire de quelques bactéries nosocomiales isolées.
- Isolement et caractérisation de bactériophages spécifiques à effet bactéricide.

Ce travail a été réalisé à l'Université de Hassiba Ben Bouali de Chlef, au niveau du laboratoire de Microbiologie Moléculaire de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Les prélèvements ont été effectués du mois de Décembre 2016 jusqu'au mois de Mai 2016.

NB: Les compositions des milieux de culture et solutions utilisés dans ce travail sont présentées dans le tableau (Annexe 1). A moins autrement indiqué, tous ces milieux et solutions ont été stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 15 min .

1. Échantillonnage

Dans ce travail, des prélèvements de surface par écouvillonnage (53) , ainsi que des prélèvements de selles humaines (en pot de coproculture stérile) ont été récoltés (37) et transportés immédiatement au laboratoire pour l'analyse. Le tableau 2 récapitule le nombre, la source et le type des prélèvements.

Tableau 1 : Récapitulation des données relatives aux prélèvements.

<i>Nature de prélèvement</i>	<i>Etablissement hospitalier</i>	<i>Source</i>		<i>Total</i>
<i>Selles humaines *</i>	<i>CHU de Batna</i>	<i>Sujets hospitaliers</i>		<i>37</i>
		<i>Services</i>	<i>N°</i>	
<i>Prélèvements de surface * (écouvillonnage)</i>	<i>Sœurs Bedj de Chlef</i>	<i>Cardiologie</i>	<i>13</i>	<i>53</i>
		<i>Urologie</i>	<i>14</i>	
		<i>Réanimation</i>	<i>03</i>	
		<i>Bloc opératoire</i>	<i>23</i>	

N° : Nombre de prélèvements.

* : Les échantillons de selles humaines reçus sont accompagnés d'une fiche de renseignements (**Annexe 2**).

* : Les prélèvements de surfaces ont été effectués à partir de divers sites de l'environnement hospitalier (les lits, tables de soins, tables opératoires, sols, laves-mains et des dispositifs médicaux (respirateurs, appareil d'anesthésie).

2. Isolement et purification des souches bactériennes

L'isolement des souches bactériennes a été effectué sur quatre milieux de culture à savoir la gélose Mac Conkey, gélose Chapman, gélose au Cétrimide, gélose Bile Esculine Azide. Les boîtes ont été ensuite incubées pendant 24 h à 37°C. La purification des souches obtenues est effectuée par un repiquage successif sur les mêmes milieux de culture.

3. Identification des bactéries

L'identification des souches purifiées est réalisée en suivant une procédure de plusieurs étapes successives, basée sur la recherche et la détermination d'un certain nombre de caractères morphologiques (coloration de Gram), physiologiques (catalase et oxydase, coagulase) et biochimiques (galeries *Api 20 E*, *Api 20NE*, *Api Staph* et *Api Strep*, BioMérieux, France).

3.1 Etude macroscopique

Cette étude est basée sur l'observation macroscopique des colonies directe à l'œil nu ou par une loupe binoculaire. Elle permet de décrire la taille, l'aspect, la couleur, la consistance, le contour, l'opacité, et la forme des colonies (Denis et *al.*, 2007).

3.2 Etude microscopique

Ce test a pour but de déterminer le type de la paroi bactérienne à Gram positif ou Gram négatif après coloration de Gram (Denis et *al.*, 2007).

3.3 Identification biochimique

Après la détermination présumptive de la présence et /ou absence de l'enzyme catalase et oxydase de chaque souche, une cascade de tests biochimiques est réalisée par les galeries *API* spécial pour chaque genre bactérien.

Le système *API* est une version miniaturisée et standardisée pour l'identification des bactéries, comportant 20 tests biochimiques qui se présentent sous forme déshydratée, et qui sont inoculés avec une suspension bactérienne à densité convenable. Les réactions produites pendant la période d'incubation sont mises en évidence par les virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture des codes obtenues est faite à l'aide du logiciel d'identification (*API web*).

3.4 Test de la coagulase

Pour les souches du genre Staphylocoque la recherche de l'enzyme coagulase est recommandée afin de déterminer l'espèce *S. aureus* pathogènes qui sont capable de provoquer la coagulation du plasma sanguin. La détection de la coagulase s'effectue en introduisant des colonies isolées de *Staphylococcus* dans un microtube stérile contenant 0.5 ml de plasma de lapin. Le mélange est ensuite incubé à 37°C et examiné après 4 h puis 24 h. Un test positif se traduit par la formation d'un coagulum (Joffin et Leyral, 2001).

4. Conservation des souches

Les souches pures sont conservées à 4 °C dans des tubes de gélose profonde. Un millilitre d'une culture de 18-24h des bactéries purifiées est mélangé avec 1 ml de gélose nutritive molle. Bien homogénéisée au vortex puis conservées à 4 pendant une période ne dépassant pas les 3 mois.

5. Antibiogramme des souches isolées

Ce test permet de mettre en évidence la résistance des bactéries vis à vis aux différents antibiotiques. C'est un test très important durant le diagnostic des infections et aussi durant les études épidémiologiques. L'antibiogramme des souches isolées a été effectué par la méthode de diffusion sur milieu gélosé Mueller-Hinton à partir des disques d'antibiotiques selon les normes préconisées par le comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2013). La lecture se fait en mesurant avec précision les différents diamètres des zones d'inhibition. Les souches ont été classées en catégorie sensible (S) ou résistante (R) selon les valeurs interprétative de l'antibiogramme. Les antibiotiques testés pour chaque bactérie sont listés aux tableaux 2, 3, 4.

Tableau 2 : Liste des antibiotiques testés sur *P. aeruginosa*

Famille	Antibiotique	Symbole	Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)	
				R	S
Béta-lactamines	Aztréonam	ATM	30	< 19	≥ 27
	Ceftazidime	CAZ	30	<19	≥ 19
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	CIP	5	<22	≥ 25
Polypeptides	Colistine	CT	10	-	-
Rifamycines	Rifampicine	RIF	30	<14	≥ 19

Tableau 3 : Liste des antibiotiques testés sur les entérobactéries

Famille	Antibiotique	Symbole	Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)	
				R	S
Béta-lactamines	Céfotaxime	CTX	30	< 23	≥ 26
Quinolones	Ofloxacine	OF	5	< 22	≥ 25
Tétracyclines	Tétracyclines	TE	30	< 17	≥ 19
Polypeptides	Colistine	CT	50	< 15	≥ 15
Sulfamides-Triméthoprime	Co-trimoxazole	COT	25	< 13	≥ 16

Tableau 4 : Liste des antibiotiques testés sur les *Staphylocoques*

Famille	Antibiotique	Symbole	Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)	
				R	S
Béta-lactamines	Oxacilline	OX	5	< 20	≥20
Quinolones	Ofloxacin	OF	5	< 20	≥ 22
Aminosides	Streptomycine	S	10	< 13	≥ 15
Macrolides	Erytromycine	ERY	15	< 19	≥ 22
Glycopeptides	Vancomycine	V	30	-	≥ 17

6. Isolement de *C. difficile*

C.difficile est un pathogène nosocomial redoutable, responsable de 15-30% des diarrhées associées aux antibiotiques (Mylonakis *et al.*, 2001). La recherche de ce pathogène anaérobie opportuniste s'avère importante surtout chez patient hospitalisés. La recherche du germe est effectuée selon différentes étapes, détaillées ci-après.

6.1 Prétraitement des selles par choc alcoolique

Un millilitre (ml) d'éthanol absolu est ajouté à un gramme de selles. Le mélange est homogénéisé par vortex. Le mix est ensuite laissé à température ambiante pendant une heure, ce qui permet d'éliminer toutes les bactéries de la flore fécale en sélectionnant exclusivement les spores (Borriello et Honour, 1981 ;Tenover, 2011). Le mélange est centrifugé à 13000 tr/min pendant 10 minutes. Le surnageant (l'éthanol) est éliminé et le culot est laissé sécher à température ambiante pendant 15 minutes, puis resuspendu dans 500 µl d'eau physiologique stérile.

6.2 Culture et purification des souches de *C. difficile*

Dix microlitres (10µl) de la suspension de spores obtenues précédemment, estensemencée sur gélose Columbia additionnée de 0,1% du taurocholate de sodium et 5% de sang de mouton. L'incubation est faite à 37°C pendant 48 heures en anaérobiose (10% H₂, 10% CO₂ et 80% N₂). La purification des colonies bactériennes est réalisée par un repiquage successif

sur le même milieu (Arroyo et *al.*, 2005) et subissent directement une étape d'extraction d'ADN par choc thermique (voir méthode au titre **II. 8.1**).

7. Bactériophage

7.1 Préparation des filtrats et des cultures bactériennes

L'isolement de bactériophages a été effectué à partir d'échantillons d'eaux usées d'une station d'épuration des eaux usées (Office National d'Assainissement 'ONA') à Chlef, et est ensuite sélectionné selon sa capacité lytique et sa spécificité vis à vis les bactéries hôtes. La préparation de bactériophages est faite en plusieurs étapes. Brièvement, les souches bactériennes de *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *S. aureus*, *E. cloacae* sont cultivées dans 5 ml du bouillon nutritif, incubées sous agitation à 37°C pendant une nuit. L'eau usée a été filtrée dans un filtre Millipore (0,22 µm, Merck) afin d'éliminer les débris cellulaires et de récupérer les bactériophages. La suspension phagique est ainsi conservée à 4°C (Beaudoin et *al.*, 2007 ; Sundar, 2009).

7.2 Isolement des bactériophages par la méthode de dilution

L'isolement des bactériophages est réalisé par la technique de dilutions décimales en série selon la méthode décrite par Santos, 2009. Des dilutions décimales du filtrat de bactériophage de 10^{-1} jusqu'au 10^{-12} ont été préparées (Figure 8). Brièvement, dans une microplaque de titration, 90 µl de tampon de phage est introduite dans chaque puits, ensuite 10 µl du filtrat de phage est ajouté pour obtenir une dilution de 10^0 . A partir de laquelle 10 µl est transférée dans le puits qui suit. 50 µl de culture bactérienne jeune est mélangée avec 50 µl de la dilution du bactériophage dans 3ml de GN molle et versée directement sur des boîtes de GN préalablement coulées. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h (Pollack et *al.*, 2012).

Après incubation les bactériophages sont reconnues suite à la présence des plaques de lyse sur le tapis bactériens. Selon la taille, la morphologie et l'apparence de la plaque le bactériophage d'intérêt est sélectionné. Une étape de purification est ensuite réalisée par le repiquage successive de la plaque phagique (Fortier et Moineau, 2009).

7.3 Conservation de bactériophage

La couche supérieure de GN semi- molle contenant les plaques de lyse est rincée avec 3 ml de tampon de phage, grattée à l'aide d'un râteau stérile, puis transférée dans un tube

stérile. Quelques gouttes de chloroforme sont ajoutées et le mélange est ensuite conservé à 4°C (Fortier et Moineau, 2009).

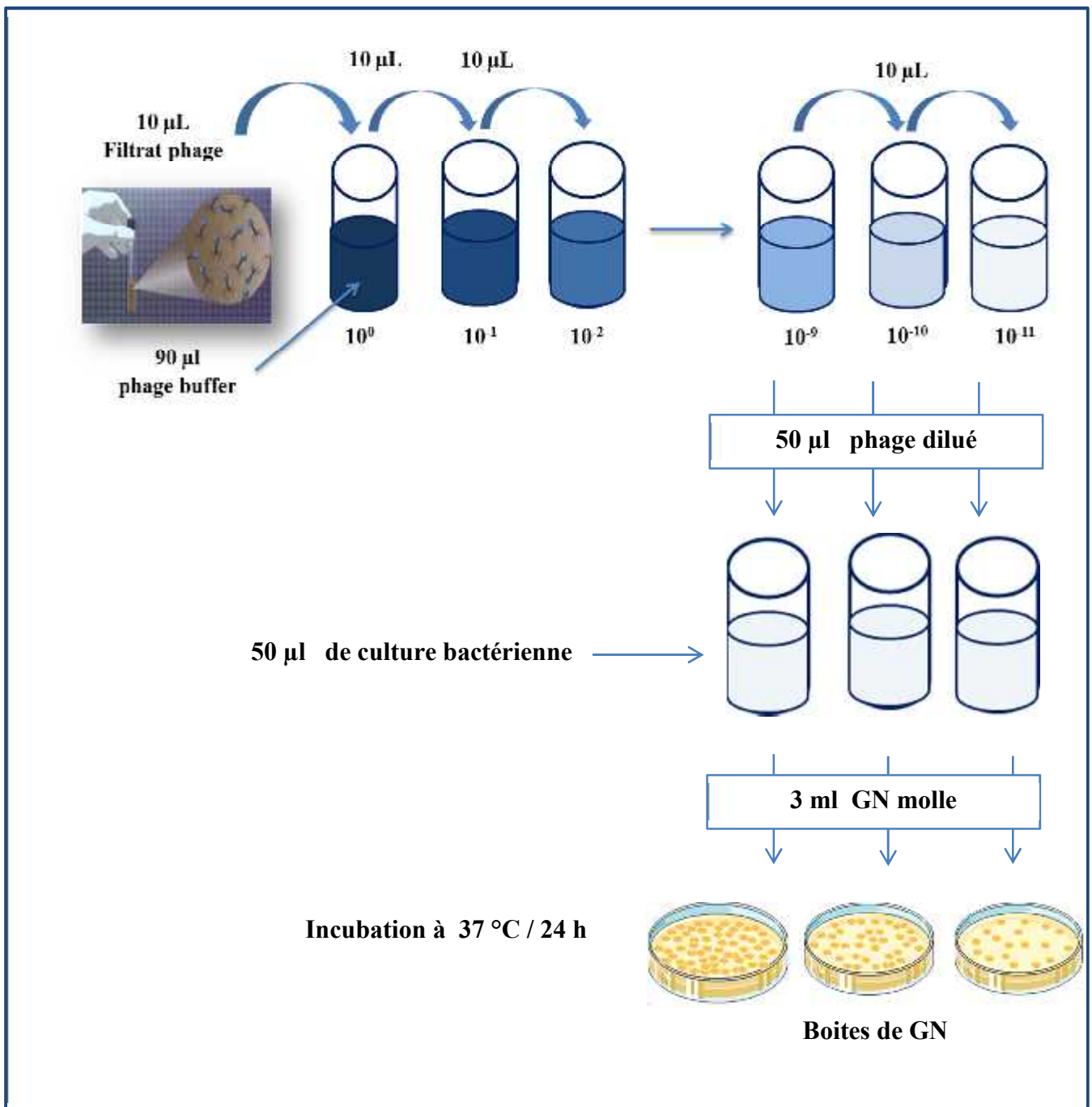


Figure 8 : Protocol d'isolement de bactériophage par la méthode de dilution

8. Extraction de l'ADN chromosomique et plasmidique

8.1 Extraction de l'ADN chromosomique des souches de *C. difficile*

L'extraction de l'ADN chromosomique des souches suspectes de *C. difficile* a été faite par la méthode du choc thermique. A partir d'une culture jeune, quelques colonies pures sont resuspendues dans 500 µl de l'eau distillée stérile et chauffées à 95°C pendant 10 min, puis transférées directement dans la glace à -20°C pendant 10 min. Cette étape d'alternation (chaleur et froid) est répétée une à deux fois jusqu'à la lyse des cellules bactériennes et la libération de l'ADN. La suspension est ensuite centrifugée à 13 000 tr/min pendant 10 min. Le surnageant contenant l'ADN est retenu et le culot L'ADN génomique ainsi obtenu a été conservé à -20°C.

8.2 Identification de *C. difficile* par PCR-duplex

Afin de confirmer les souches de *C. difficile* obtenues une PCR-duplex a été réalisée ; en utilisant deux paires d'amorces, *A13* et *A14*, et la *B518* et *B519* (tableau 5), permettant d'amplifier un fragment du gène de la toxine A (*tcdA*) avec une taille attendue de 149 paires de bases (pb) et un fragment du gène de la toxine B (*tcdB*) avec une taille attendue de 294 pb.

Tableau 5: Amorces utilisées pour l'amplification du fragment du gène *tcdA* (toxine A) et *tcdB* (toxine B) (Monot *et al.*,2013).

Gène cible	Séquences des amorces		Taille de fragment
<i>tcd A</i>	<i>F13</i>	TAATAAAAATACTGCCCTCGACAAA	149 pb
	<i>R14</i>	ATAAATTGCATGTTGCTTCATAACT	
<i>tcd B</i>	<i>F518</i>	TCCAAGTTACGCTCAATTATTAGTA	294 pb
	<i>R519</i>	TCCCCAAGATGAAGTAATGA	

La réaction d'amplification a été effectuée dans un mix de 25 µl par tube contenant 3µl d'ADN chromosomique, 0.5 µl de chaque amorce (50 µM), 0.5 µl dNTPsMix (10mM), 2.5 µl de tampon (10 X), 0,25 µl de Taq polymérase. Le volume est complète à 25 µl par l'ajout de 18.75 µl d'H₂O Ultrapure. Le programme d'amplification est présenté dans le tableau 6 ci-après :

Tableau 6 : Programme d'amplification utilisé

Nombre de Cycles	Étape	Température (°C)	Durée
	Dénaturation initiale	95°	10 min
x 35	Dénaturation	95	1 min
	Hybridation	59	30 sec
	Elongation	72	1 min
	Elongation finale	72	7 min

8.3 Essai d'extraction d'ADN plasmidique à partir des souches isolées des surfaces de l'hôpital.

Les plasmides sont des molécules d'ADN circulaire double brin extrachromosomique possédant leur propre origine de répllication. Ils se répliquent de façon indépendante dans les bactéries hôtes et donc se transmettent d'une manière stable et régulière à la descendance au cours de la division cellulaire. Ils sont de tailles variables, peut arriver jusqu'à 300 kb et codent des gènes conférant aux cellules hôtes des avantages sélectifs entre autre, la résistance aux antibiotiques, la fertilité, utilisation d'un substrat énergétique. Les plasmides peuvent être extraits des bactéries indépendamment du chromosome bactérien par les techniques de préparation d'ADN plasmidique.

Dans ce travail, 04 isolats de *P. aeruginosa* (PC1, PC2), *P. fluorescens* (PU1), *E. cloacae* (MC7) ont été soumises à l'extraction d'ADN plasmidique par la méthode de la lyse alcaline autrement appelée la minipréparation d'ADN plasmidique (Birnboim,1983). L'extraction d'ADN plasmidique a été effectuée en trois étapes principales: **1)** Préparation des la précultures bactériennes, **2)** Lyse des bactéries et extraction de l'ADN plasmidique, **3)** Purification et précipitation de l'ADN plasmidique.

Solutions utilisées :

Solution I : Tris-HCl (pH 8.0) à 50 mM et de l'EDTA (pH 8.0) à 10 mM.

Solution II : NaOH à 0.2M et de SDS 1%

Solution II : Acétate de potassium (3M) pH 5.5

L'extraction a été faite selon les étapes suivantes :

- Des cultures de nuit de 5 ml en bouillon nutritif incubées à 37°C ont été réalisées pour les souches à tester. Les cultures ont ensuite été centrifugées à 13 000 tr/min pendant 10 min ; le surnageant a été jeté et les cellules ont été resuspendues dans 300µl de **solution I**.
- Dans ce mélange , 300µl de la **solution II** (fraîchement préparée) ont été ajoutées et mélangées délicatement puis incubées à température pendant 5 minutes ; à cette étape la solution devient très visqueuse ;
- 300 µl de la **solution III** (froide ont été ajoutées, puis les tubes ont été mélangés immédiatement par inversion (un caillot blanc d'ADN chromosomique / protéine / SDS doit être formé) ;
- Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube après une centrifugation à 13000 tr/min pendant 10 minutes. Puis 650 µl ml d'isopropanol a été ajouté pour précipiter l'ADN ;
- Pour récupérer l'ADN précipité, le mélange a été centrifugé à 13 000 tr/min pendant 15 min ; le surnageant a été éliminé et le culot a été ensuite rincé avec 700 µl d'éthanol à 70%.
- Après une centrifugation de 15 min à 13000 tr/min. L'éthanol a été décanté puis le culot d'ADN séché à température ambiante pendant 10 min. Enfin , le culot d'ADN plasmidique a été resuspendu dans 50 µl de tampon TE (Tris-EDTA) et les produits d'extraction ont été ensuite conservés à 4°C.

9. Electrophorèse sur gel d'agarose

La révélation des produits d'amplification, ainsi que ceux de l'extraction plasmidique a été effectuée par migration à 80V pendant 1h sur un gel d'agarose à 2 % coloré avec BET. L'ADN est visualisé ensuite sous UV (Sambrook et Russel, 2001).

CHAPITRE III

Résultats et discussion

Résultats et discussion

Durant la période entre Décembre et Mai 2016, 53 prélèvements de surface ont été effectués à partir de différents services (cardiologie, urologie, réanimation et bloc opératoire) de l'hôpital des Sœurs Bedj de 240 lits.

1. Isolement et identification des bactéries

Les prélèvements ont été ensemencés sur différents milieux d'isolement. Les colonies qui possèdent les caractéristiques culturelles et morphologiques, permettant de suspecter leur appartenance à un groupe bactérien, sont retenues et subissent d'autres tests d'identification, à savoir un examen microscopique après coloration de Gram et des tests d'identifications biochimiques (catalase, oxydase et galerie *API*).

L'analyse des prélèvements, sur la base de caractères cultureux, morphologiques et biochimiques, a permis d'identifier 92 isolats appartenant à 5 genres différents, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Citobacter* et *Burkholderia* (figure 13 et tableau 7).

1. 1. *S.aureus*

Au total, 25 souches de *Staphylococcus* (28%) ont été isolées. Sur milieu Chapman, les colonies de *S. aureus* apparaissent de couleur jaune à mannitol positif. La coloration de Gram met en évidence des cocci sphériques, en grappe de raisin, en paires, colorés en violet. *S. aureus* est oxydase négative, catalase et coagulase positive (figure 9, 10). Les souches à coagulase négative: suspectes autres espèces de Staphylocoques.



Figure 9 : Test de catalase *S. aureus* (+)



Figure 10: Résultat du test de coagulase (+)

1.2 *P. aeruginosa*

Sur la gélose au cétrimide, les colonies apparaissent vertes à bords réguliers, de 1 à 2 mm de diamètre dégageant une odeur du jasmin caractéristique de *P. aeruginosa*. L'observation microscopique a montré des fins bacilles à Gram négatif colorés en rose. *P. aeruginosa* possède une oxydase et une catalase positive (figure 11 et 12). L'identification bactérienne réalisée à l'aide des galeries API 20NE nous a permis de mettre en évidence les principaux caractères biochimiques des souches *P. aeruginosa*.



Figure 11: Test catalase *P.aeruginosa* (+)



Figure 12: Test oxydase *P.aeruginosa* (+)

1.3 Entérobactéries

1.3.1 *E. cloacae*

Selon les caractères morphologiques et culturels, *E. cloacae* est cocobacille à Gram négatif. Sur milieu MacConkey, les colonies se présentent sous forme de colonies roses, à catalase positive et oxydase négative.

Tableau 7 : Caractères morphologiques et culturaux des souches isolées



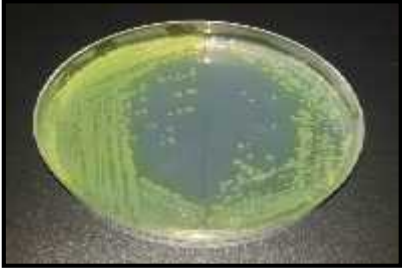


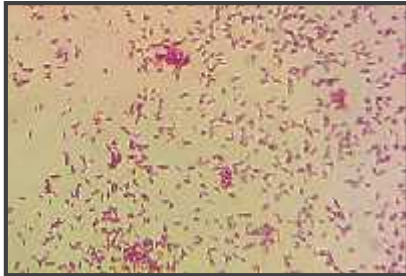



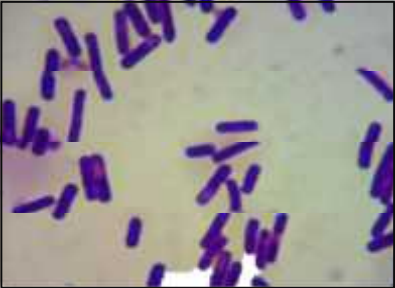
Isolement	Coloration de Gram	Souche
		<p><i>S.aureus</i></p>
		<p><i>P. aeruginosa</i></p>
		<p><i>C. freundii</i></p>
		<p><i>E. cloacae</i></p>
		<p><i>C. difficile</i></p>

Tableau 8 : Résultats de lecture des codes sur API Web

	N°	Code	Espèce		N° de souche	Code	Espèce
Api 20 Stph	S C 1	6635112	<i>S.xylosus</i>	Api 20 E	M C 6	3304573	<i>E.cloacae</i>
	S C 2	6776557	<i>S.xylosus</i>		M C 7	3305573	<i>E.cloacae</i>
	S C 6	7736177	<i>S.aureus</i>		M BO 2	2204002	<i>P.luteola</i>
	S U 1	6736151	<i>S.aureus</i>		M BO 3	3705773	<i>E.cloacae</i>
	S U 2	6716150	<i>S.aureus</i>		M BO 5	3606572	<i>C.freundii</i>
	S C 3	6736157	<i>S.aureus</i>		M BO 7	3301000	<i>P.luteola</i>
	S C 4	6736157	<i>S.aureus</i>		M BO 8	1204572	<i>C.freundii</i>
	SBO3	6736155	<i>S.aureus</i>		M BO 9	1004573	<i>C.freundii</i>
	S BO 5	6736155	<i>S.aureus</i>		M BO 16	1200477	<i>B. cepacia</i>
	S BO 7	7777727	<i>S.xylosus</i>		M BO 19	1205004	<i>B.cepacia</i>
	S BO 8	6735750	<i>S.lentus</i>		-	-	-
S BO13	7736155	<i>S.aureus</i>	-	-	-		
Api 20 NE	P C 1	1354455	<i>P.aeruginosa</i>	Api 20 NE	P BO 3	1154755	<i>P.aeruginosa</i>
	P C2	1354575	<i>P.aeruginosa</i>		P BO 4	1154575	<i>P.aeruginosa</i>
	P U1	1346557	<i>P.fluorescens</i>		P BO 5	1154575	<i>P.aeruginosa</i>
	P BO 1	1767753	<i>P.luteola</i>		M BO 8	1354575	<i>P.aeruginosa</i>
	P BO 2	0567743	<i>P.luteola</i>		V		
				M BO 12	1354571	<i>P.aeruginosa</i>	

3. Fréquence des souches isolées

La fréquence des différentes espèces bactériennes en fonction du nombre des prélèvements de surface effectués à partir de l'environnement hospitalier de l'Hôpital des Sœurs Badj est démontrée dans la (figure 14). Dans un ordre décroissant les fréquences étaient les suivantes : Staphylocoques spp (27%), *Pseudomonas spp* (15%), *E.cloacae* et *C.freundii* (4%), *B.cepacia* (2%) et une fraction de (48%) reste non identifiée.

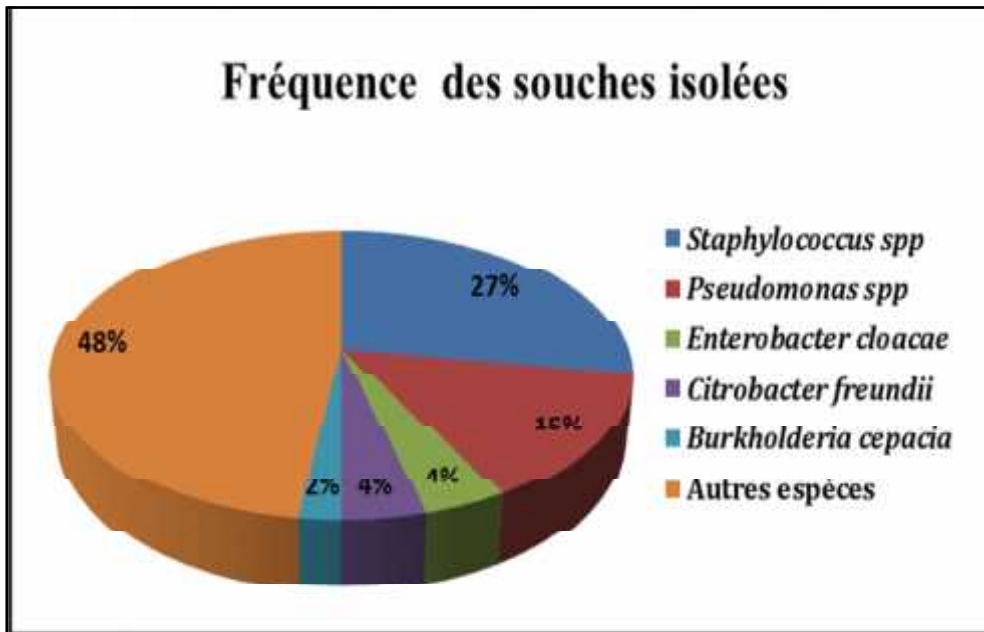


Figure 14 : Fréquence des souches identifiées à partir des prélèvements de surface.

4. Répartition des souches en fonction des services

La répartition des souches en fonction des services (figure 15) a montré que les fréquences d'isolement au niveau des services étaient comme suit : Bloc opératoire (2.83), cardiologie (1,62), réanimation (0.67), urologie (0.29).

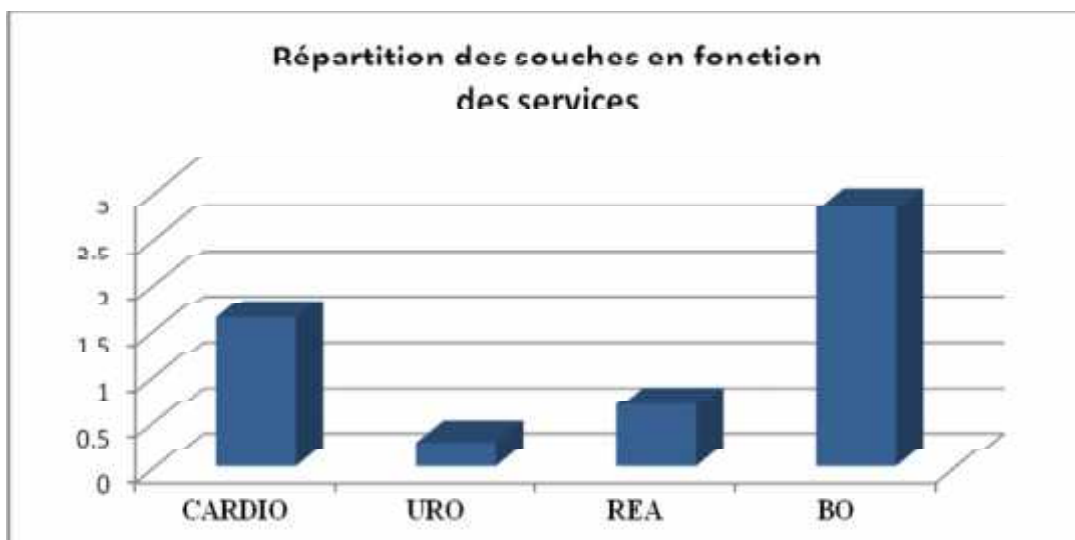


Figure 15: Répartition des souches en fonction des services

La répartition des souches en fonction des services et aussi illustrée dans la figure 16, qui présente le plan des différents services de l'Hôpital des Sœurs Bedj à

partir desquels les prélèvements de surfaces ont été effectués, en démontrant la distribution des souches isolées.

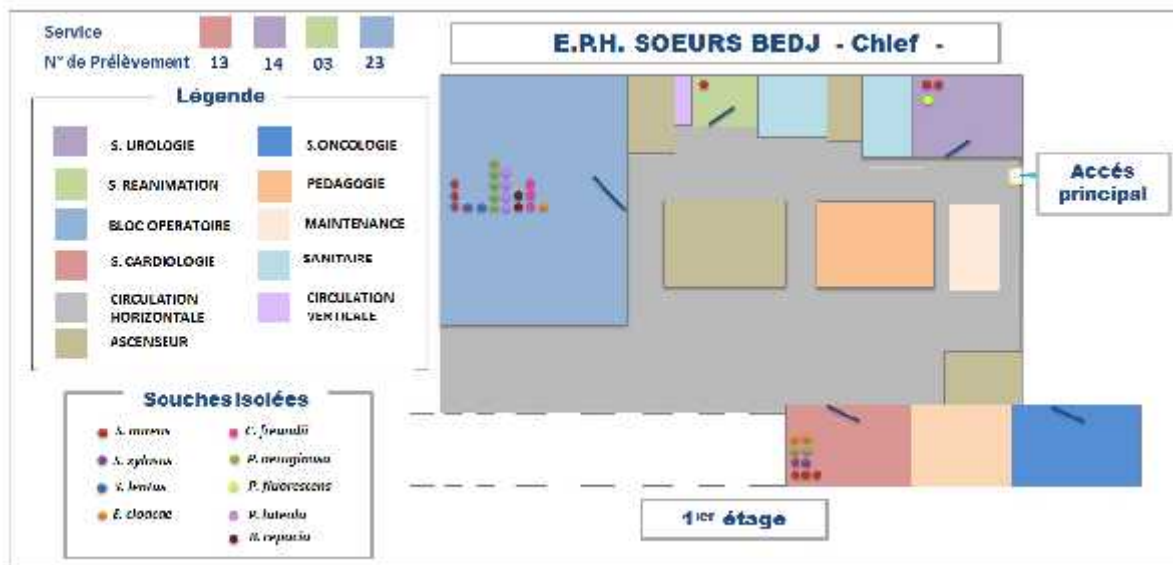


Figure 16 : Répartition des souches isolées en fonction des services

5. Isolement du pathogène *C. difficile* agent des diarrhées post-antibiotiques

En parallèle de l'isolement des pathogènes nosocomiaux à partir des prélèvements de surface à l'Hôpital Sœurs Bedj de Chlef, nous avons effectué une autre étude afin d'isoler uniquement *C. difficile* à partir de selles diarrhéiques de patients hospitalisés au niveau du CHU de Batna.

Durant la période entre Décembre 2016 à Mai 2016, 37 échantillons de selles ont été collectés à partir des patients hospitalisés au CHU de Batna. Les échantillons de selles ont subi un traitement à l'éthanol afin d'éliminer la plupart des bactéries présentes dans les selles, tout en sélectionnant les spores seulement. Les spores ont étéensemencées sur le milieu Columbia enrichi à 5% de sang de mouton et 0,1% d'acide taurocholic (Gerding *et al.*, 1995).

Parmi les 37 échantillons, 8 souches suspectes de *C. difficile* ont été identifiées sur la base de caractères cultureux. Les colonies de *C. difficile* possèdent une morphologie typique: elles apparaissent blanches à grises, à contours irréguliers et non hémolytiques sur gélose au sang, avec un aspect en verre vitré et une odeur caractéristique du crottin de cheval (Brazier et

Borriello, 2000 ; Delmée ,2001). La coloration de Gram mis en évidence des bacilles gram positif avec la présence des spores subterminales.

Ces souches suspectes de *C. difficile* ont subit une identification moléculaire par l'amplification des gènes codants pour la toxine A et B de *C. difficile*.

Les résultats de la PCR (figure 17) montrent qu'une seule souche est positive par PCR, suite à la présence d'un amplicon de 149 pb correspondant à la taille attendue de l'amplification du gène de la toxine A, et absence de l'amplicon correspondant à la toxine B, ce qui permet de dire que cette souche est **ToxA+** et **ToxB-**. Cette souche provient d'un patient masculin âgé de 29 ans, hospitalisé au CHU de Batna pendant 30 jours, à cause d'une diarrhée persistante.

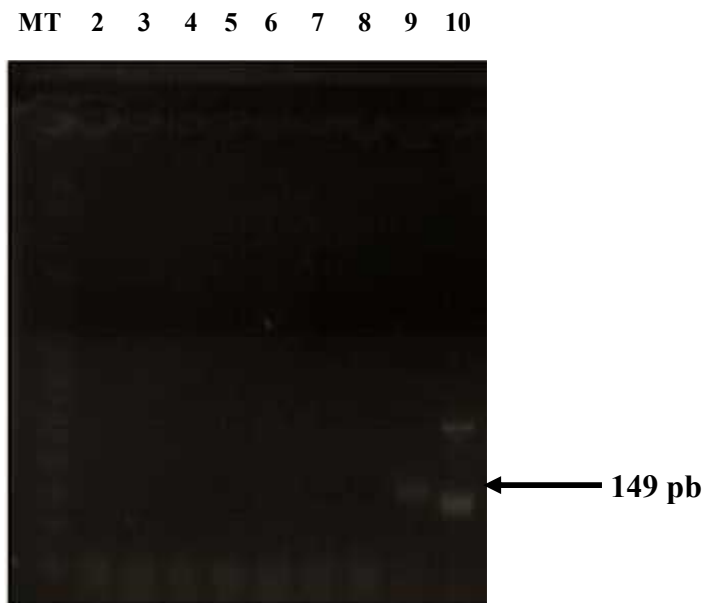


Figure 17 : Electrophorèse sur gel d'agarose des résultats de la PCR pour la Toxine A/B de *C. difficile*. **Puit1 :** Marqueur de taille 50pb (Sigma), **puit2:** Y18, **puit3 :** Y21, **puit4:** Y22, **puit5:** Y23, **puit6:** Y24, **puit7 :** Y28, **puit8:** Y30, **puit9 :** Y35, **puit10 :** souche de référence CD 630.

Il est bien établi que les infections liées à *C. difficile* acquises aux niveaux hospitaliers est de l'ordre de (15-30%) (Mylonakis *et al.*, 2001). Nos résultats préliminaires nous ont permis de constater que le portage de *C. difficile* chez les personnes hospitalisées testées est de (2,70 %), ce qui reste toujours inférieur aux pourcentages rapportés dans les diverses études effectuées dans les hôpitaux Européen (Mylonakis *et al.*, 2001). Cependant, il se peut que ce pourcentage obtenu dans cette étude ne reflète pas réellement la fréquence du portage parmi les personnes hospitalisées et ceci est principalement, au faible nombre de prélèvements effectués d'une

part et le déficit en milieux de culture appropriés pour recouvrir les souches de *C. difficile* connue par leur forte exigences nutritionnelles d'autre part.

6. Profils de résistance aux antibiotiques

Quelques espèces bactériennes isolées dans cette étude ont été testées pour leurs sensibilités à quelques antibiotiques. Les antibiotiques testés ont été choisis selon les normes et les recommandations préconisées par la CA-FSA. Les résultats sont rapportés dans le tableau 9 et la figure 18.

Tableau 9 : Représentation des résultats de l'antibiogramme des différentes souches testées

Souches de <i>S. aureus</i>	Antibiotiques				
	OX	OF	ERY	S	VA
S U1	S	S	S	S	S
S C3	S	S	S	S	R
S BO 13	S	S	S	S	R

Souches de <i>P. aeruginosa</i>	Antibiotiques				
	ATM	CIP	CAZ	RIF	CT
PC1	R	S	S	R	-
P BO 1	R	S	S	R	-
P BO 3	R	S	S	R	-

Souches de <i>E. cloacae</i>	Antibiotiques				
	CTX	TE	OF	CT	COT
MBO3	S	S	S	R	S
MC6	S	S	S	R	S
MC7	S	S	S	R	S

Souche de <i>C. freundii</i>	Antibiotiques				
	CTX	TE	OF	CT	COT
MBO9	S	S	S	S	S

S: Sensible, **R** : Résistance.

Les souches de *S. aureus* présentent une sensibilité à l'Oxacilline, Ofloxacin, Erytromycine, Streptomycine et la vancomycine à l'exception des isolats SC3 et SBO13 (pour la vancomycine). Concernant les souches de *P. aeruginosa* une résistance à l'Aztréonam et à la Rifampicine a été bien démontrée, et ont présentait une sensibilité à la Cefotaxime et la Ciprofloxacine. La souche de *C. freundii* a montré une sensibilité à tous les antibiotiques testés alors que la souche d'*E. cloacae*, s'est révélée sensible aux : Céfotaxime, Ofloxacin, Tétracycline, et Cotrimoxazole, mis à part la colistine, à laquelle tous les isolats étaient résistants.

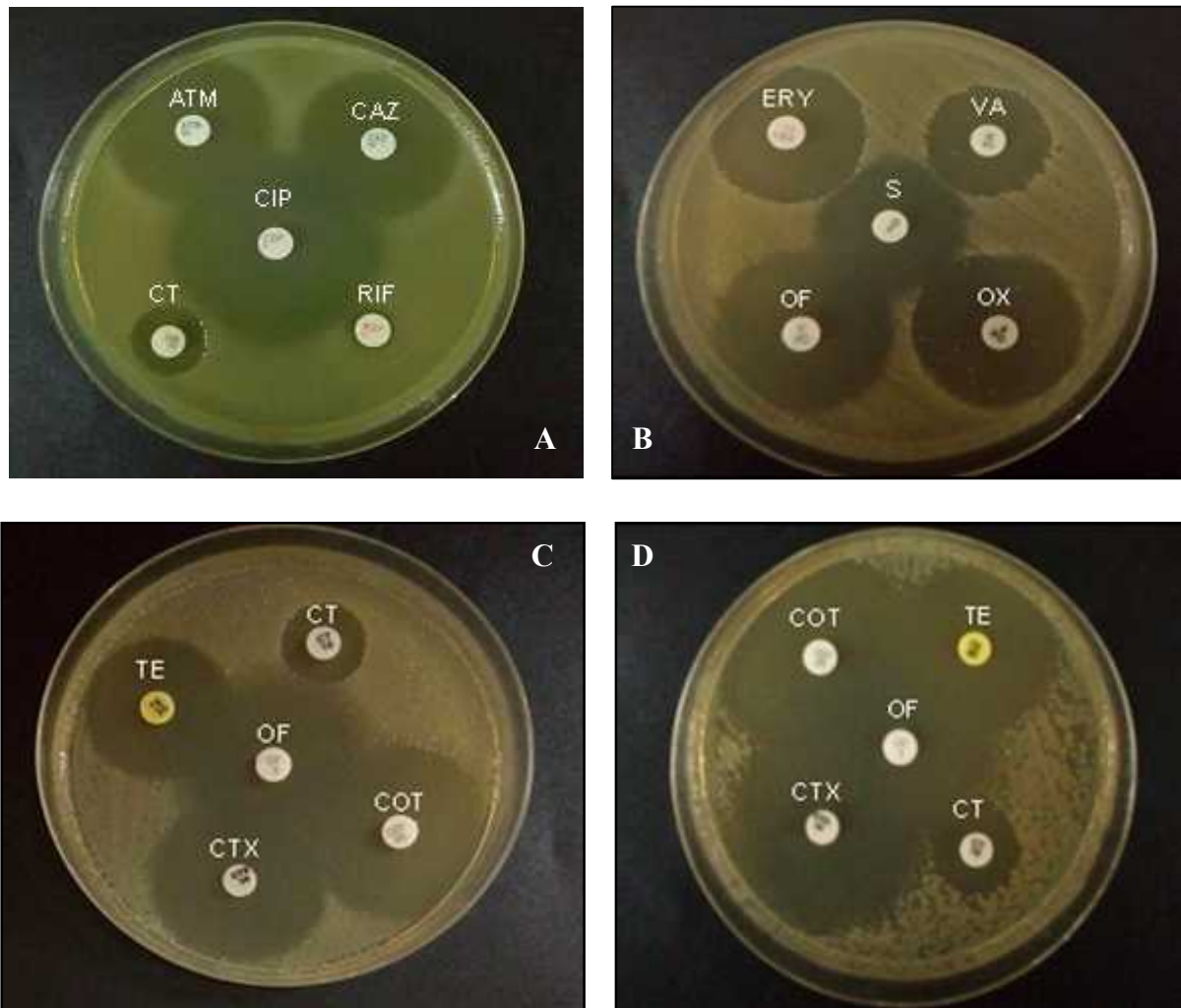


Figure 18 : Résultats du test d'antibiogramme pour quelques isolats

(A) *P.aeruginosa* **(B)** *S.aureus* **(C)** *E.cloacae* **(D)** *C.freundi*

ATM:Aztréonam, **CAZ:** Ceftazidime; **CIP:** Ciprofloxacine; **RIF:**Rifampicine ; **CT:** Colistine **CTX:** Céfotaxime; **OF:**Ofloxacine; **TE:** Tétracycline; **COT:** Cotrimoxazole; **OX:** Oxacilline; **S:**Streptomycine; **ERY:** Erythromcine; **V :** Vancomycine.

7. Isolement de bactériophage

Face à l'augmentation du phénomène de multirésistance et l'absence de développement de nouveaux antibiotiques, la phagothérapie qui consiste en l'utilisation de bactériophages comme moyen de traitement naturel contre les infections nosocomiales est en train de devenir une alternative thérapeutique efficace à l'antibiothérapie (Wittebole *et al.* 2014). Les bactériophages comportent certains avantages par rapport aux antibiotiques :

- Ils sont présents partout dans la nature.

- Ils sont relativement facile à isoler et leur production est simple, rapide et peu coûteuse.
- Ils sont très spécifiques envers les espèces bactériennes.

Pour cette raison, nous avons effectué cette partie expérimentale afin d'isoler des bactériophages spécifiques aux bactéries responsables d'IN.

Les eaux usées sont les réservoirs principaux d'un grand nombre de bactéries et par conséquent il y a de fortes chances qu'elles contiennent des bactériophages spécifiques aux différentes bactéries. Ainsi, nous avons collecté des échantillons des eaux usées à partir de la station d'épuration de Chlef pour isoler des bactériophages actifs contre les bactéries isolées dans cette étude.

Nous avons utilisé la technique de la double couche d'agar pour effectuer le test de l'activité lytique des bactériophages.

L'activité lytique de notre préparation de bactériophage a été testée sur la base de formation de zones de lyse (plaques) sur des tapis de cultures bactériennes en boîtes de Pétri contenant 4 espèces bactériennes isolées dans cette étude, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *E. cloacae*.

Il est clair à partir de la figure 19 que notre préparation de bactériophage montre la présence d'un grand nombre de plaques, et donc la présence d'un bactériophage avec une activité lytique contre *P. aeruginosa*. Ces résultats sont prometteuses, sachant que les bactériophages spécifiques à *Pseudomonas* ont été utilisés comme moyen thérapeutique en Europe de l'est (Deresinski, 2009).



Figure 19 : Plages de lyse de bactériophages sur un tapis de culture de la souche de *P. aeruginosa* (PCI)

8. Extraction de plasmides

Certaines résistances aux antibiotiques apparaissent principalement par acquisition d'éléments génétiques mobiles tels que les plasmides, les transposons et les intégrons,

Dans ce contexte nous avons exploré la présence de plasmides dans les souches isolées dans cette étude. Les plasmides ont été isolés par la méthode de la lyse alcaline à partir des souches de *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *E. cloacae*. La figure 20 montre que les trois bactéries testées contiennent au moins un plasmide.

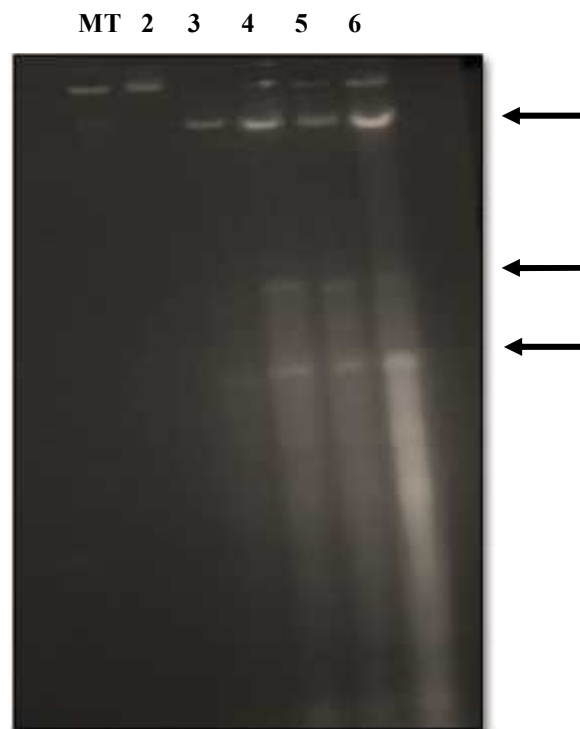


Figure 20: Électrophorèse sur gel d'agarose des plasmides isolés à partir des souches de *P. aeruginosa* PC1 et PC2 (**puits 3 et 4**), *P. fluorescens* PU1 (**puits 5**) et *E. cloacae* MC7 (**puits 6**). **Puits 1** : marqueur de taille 50 pb (Sigma), **puits 2** : *C. freundii* (MBO9).

Conclusion

Conclusion générale

Les infections nosocomiales sont en constante augmentation, avec un coût important, que ce soit financier ou humain, et constituent une préoccupation majeure pour le secteur de la sante publique.

De nombreuses études ont démontré l'importance des surfaces dans les établissements de santé comme facteur de transmission des infections nosocomiales.

Dans ce travail réalisé sur une période de six mois, nous avons tenté d'identifier et de caractériser les bactéries pathogènes présentes sur les surfaces dans quelques services d'un hôpital à Chlef. Pour cela nous avons réalisé 53 prélèvements de surface, qui ont été ensemencés sur milieux sélectifs et/ou différentiels, les bactéries ont été ensuite identifiées par une série des tests biochimiques et moléculaires. Nous avons ainsi isoler 92 isolats appartenant à cinq genres bactériens différents, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Citobacter* et *Burkholderia*.

La répartition des bactéries par service a montré leurs prédominances dans le bloc opératoire, suivit par les services de cardiologie, de réanimation, et enfin de l'urologie.

Les germes les plus fréquemment isolés sont par ordre décroissant: *S. aureus* (27%), *Pseudomonas* (15%), suivies par *E. cloaceae* et *C. freundii* avec 4% chacune. Finalement *B. cepacia* avec une proportion de 2%. Il faut signaler a ce point que 48% des isolats n'ont pas pu être identifiés par les tests microbiologiques et biochimiques à notre disposition durant la période de cette étude.

D'autre part, le test d'antibiorésistance a révélé que 2 isolats de *S. aureus* sont résistants à la vancomycine. Ce constat est préoccupant car la vancomycine est le traitement de choix contre les *S. aureus* résistant à la methicilline (SARM).

Bien qu'on ne peut pas dire que cette étude soit représentative de la situation générale, vu qu'elle est limitée à quelques services au sein d'un seul hôpital, néanmoins les résultats montrent que l'environnement hospitalier étudié est largement contaminé par les bactéries les plus fréquemment incriminées dans les infections nosocomiales, et démontrent l'importance de la mise en œuvre de contrôles microbiologiques périodiques des environnements hospitaliers afin de repérer toute contamination, et de mener des actions préventives dans le cadre des stratégies de lutte contre les infections nosocomiales.

Conclusion générale

En perspective, il est envisagé d'élargir l'échantillonnage d'une manière quantitative et qualitative, ainsi que sur le plan temporel et spatial, afin de mieux évaluer l'ampleur de la prévalence des microorganismes nosocomiaux dans nos hôpitaux.

Un autre axe de cette étude s'est orienté vers l'isolement de bactériophages lytiques contre les pathogènes nosocomiaux. Cet effort s'est soldé par l'isolement d'un bactériophage lytique spécifique à *P. aeruginosa*. Cette initiative peut être élargie à d'autres bactériophages spécifiques à d'autres pathogènes nosocomiaux, avec comme objectif à long terme, l'utilisation de ces bactériophages comme moyen de lutte biologique, efficace et peu coûteux, contre les bactéries responsables d'infections nosocomiales.

Dans ce contexte, il serait intéressant d'évaluer l'activité antibactérienne des bactériophages *in situ*, par pulvérisation ou lavage des surfaces hospitalières avec des préparations de bactériophages et de déterminer leurs effets sur la charge microbienne.

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

- Adjidé C-C., Biendob M., Rousseaub F., Hamdad-Daoudib F., Thomasb D., Lauransb G. *et al.* 2006. *Escherichia coli* producteurs de bêtalactamases à spectre étendu : de nouvelles menaces nosocomiales. *Pathologie Biologie*; 54 :510–517.
- Aktories K. and Wilkins T. D. 2000. *Clostridium difficile*. Springer. Berlin.146p.
- Aktories K. and Wilkins T.D 2000. Microbiology, Epidemiology and Diagnosis of *Clostridium Difficile* Infection. Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer. Berlin. 250: 1-33.
- Amazian K., Rossello J., Castella A., Sekkat S., Terzaki S., Dhidah L. *et al.* 2010. Prevalence of nosocomial infections in 27 hospitals in the Mediterranean region. *East Mediterraeen Health Journal*, 16: 1070-1078.
- Arias C.A. ,Murray B.E. 2012.The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance .*Nature Reviews Microbiology*;10(4): 266–278.
- Arroyo L. G., Rousseau J., Willey B. M., Low D. E., Staempfli H., McGeer A., WeeseJ.S. 2005. Use of a selective enrichment broth to recover *Clostridium difficile* from stool swabs stored under different conditions. *Journal of Clinical Microbiology*; 43: 5341-5343.
- Arvidson S., Fischetti VA., Novick RP., Ferretti JJ., Potrnoy DA., Rood JI. 2000. Extracellular enzymes in Gram-positive pathogens. American Society for Microbiology, Washington, D.C.; p 379–85.
- Atif M.L., Bezzaoucha A., Mesbah S., Djellato S., Boubechou N., Bellouni R. 2006. Evolution of nosocomial infection prevalence in an Algeria university hospital (2001 to 2005). *Médecine et Maladies Infectieuses* ; 36: 423-8
- Atif M.L., Sadaoui F., Bezzaoucha A., Kaddache C.A., Boukari R., Djelato S., *et al.* 2009.Reduction of nosocomial pneumonia using surveillance and targeted interventions in an Algerian neonatal intensive care unit. *Infection Control and Hospital Epidemiology*; 30: 712-3
- Avril J.L, Dabernat H., Denis F., Monteil H .1992. Bactériologie Clinique. 2^{ème} édition. Ellipses. Paris. p149-151.
- Avril J.L., Dabernat H., Denis F., Monteil H. 2000. Bactériologie clinique. 3^{ème} édition. Ellipses. Paris. 602 p.

Références Bibliographiques

- Barbut, F., Lalande V., Petit J. C. 2004. Epidémiologie et prévention des infections digestives à *Clostridium difficile*. *Rev Franç Lab*.368:27-34.
- Baron E-J, Pfaller M, Tenover F-C, Yolken R-H, Murray P-R. 1995. Manual of clinical microbiology Graveniz, AV. *Acinetobacter baumannii*, *Alcagenes*, *Moraxella*, and other non-fermentative bacteria. In: Manual of clinical microbiology. Washington DC: American Society for Microbiology. p 520.
- Beaudoin R. N., DeCesaro D. R., Durkee D. L., Barbaro S. E. 2007. Isolation of a Bacteriophage From Sewage Sludge and characterization of its bacterial host cell. *Rivier academic journal*; 3(1), 1-8.
- Berche P., Gaillard J.L., Simonet M. 1988. Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. 1^{ère} édition. Flammarion. Paris. 660p.
- Berthelot P., Grattard F., Mallaval F.O., Ros A., Lucht F., Pozzetto B. 2005. Epidemiology of nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *Pathology Biology*; 53(6): 341-8.
- Birnboim, H. C., 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods in Enzymology*; 100: 243-255.
- Borriello S. P. and Honour P., (1981). Simplified procedure for the routine isolation of *Clostridium difficile* from faeces. *Journal of Clinical Pathology*; 34(10), 1124–1127.
- Botterel F., Faibis F., Chevalier C., Delisse C., Fiacre A., Dubois A., Demachy M.C. 2004. Intérêts et limites de la surveillance des infections nosocomiales à partir du laboratoire de microbiologie : expérience du CHG de Meaux. *Pathologie Biologie*; 52: 469-473.
- Brazier J. S., and Borriello, S.P. 2000. Microbiology, Epidemiology and Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology* ; Vol. 250: 1-33.
- Brenner DJ, Farmer JJ, Noel R, Krieg JT. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, (The Proteobacteria), Part B (The Gammaproteobacteria), 2^{ème} Edition vol. 2. SpringerVerlag, New York ; p 1106.
- CA-SFM. 2013. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

Références Bibliographiques

- Delarras, C. 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Lavoisier, Paris. 476 p.
- Denève C., Janoir C., Poilane I., Fantinato C., Collignon A. 2009. New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 33: 24-8.
- Denis F., Ploy M-C., Martin C., et al. 2007. Bactériologie médicale. 2^{ème} Edition. Ellipses. Paris. 573p.
- Doran T I. 1999. The role of *Citrobacter* in clinical disease of children: Review. *Clinical Infectious Diseases*; 28(2): 384-394.
- Duce G., Fabry J., Nicolle L. 2002. Prevention of Hospital-acquired infections: a practical guide. 2nd edition. Geneva, Switzerland : World Health Organization. 64 p.
- Deresinski S., 2009. Bacteriophage Therapy: Exploiting Smaller Fleas. *Clinical Infectious Diseases*. 48:1096–1101
- Ellenberg E. 2005. Analyse terminologique des définitions données à l'infection nosocomiale et proposition d'une définition. *La revue de médecine interne* ; Vol. 26. pp. 572–577.
- Euzéby J.P. 2004. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. Klebsiella. France. Sur le lien : <http://www.infotheque.info/cache/93/www.bacterio.cict.fr/bacdico/taxons2004.html>.
- Fortier L. C. and Moineau S. 2009. Phage production and maintenance of stocks, including the expected stock lifetime in: M.R.J. Bacteriophages: Methods and Protocols, Isolation, Characterization and Interactions. *Humana Press*; vol. 501. pp. 203–219.
- Fraser S. I., Arnett M. et Sinave C.P. 2010. *Enterobacter* infections. eMedicine specialties. infectious diseases. bacterial infections. contributor information and disclosures.
- Gassier J, Le Neures K., Peruzza E. 2006. Guide aide-soignant. Masson. Paris. p 424-425-431.
- Gellatly S.L. and Hancock R.E.W. 2013. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*; 67: 159-173.
- Gerding D. N., Johnson S., et al. 1995. *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. *Infectious Control Hospital Epidemiology*; 16(8): 459-77.

Références Bibliographiques

- Giamarellou H., Antoniadou A. et Kanellakopoulou K. 2008. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health?. *International Journal Antimicrobial Agent* ; 32 :106-119.
- Gordon L., Cloeckert A., Doublet B., Schwarz S., Bouju-Albert A., Ganiere J. P., et al. 2008. Complete sequence of the florcing mltiresistance plasmid pAB5S9 from fresh water *Aeromonas bestiarum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapie*; 62:65-71.
- Hafiane M. R. 2008. Différentes méthodes de typage des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées des patients atteints de mucoviscidose Various typing methods of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients, *Médecine et maladies infectieuses* ;38(5) : 238-247.
- Hatheway C. L. 1990. Toxigenic Clostridia. *Clinical Microbiology Reviews*; 3:66-98.
- Holmes B, Aucken HM, Collier L, Balows A, Sussman M. 1998. *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* and other members of the Enterobacteriaceae. In (Eds.), *Microbiology and Microbial infections: Systematic Bacteriology* 9ème édition. London : Arnold. pp. 999-1033.
- Joffin JN., Leyral G. 2001. *Microbiologie technique : Dictionnaire des techniques*. Bordeaux : CRDP d'Aquitaine, 320p.
- Mahrouki S., Ben-Achour N., Chouchani C., Ben-moussa M. et Belhadj O. 2009. Identification of plasmid-encoded extended spectrum B-lactamases produced by a clinical strain of *Proteus mirabilis*.
- Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. 2005. *Pseudomonas aeruginosa*. Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier. Canada. p2587- 2615.
- Margot P., Chantal G. 2009. Les infections nosocomiales - Agir ensemble pour des milieux cliniques sains et sécuritaires. La gestion des risques 1^{ère} partie ; p : 1-19.
- Marie-Claude M. 2012. Infection nosocomiale à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline chez un patient adulte hospitalisé. *Pharmactuel* ; 46 (1) : 23.
- Mee-Marquet N.V., Blanchard M., Domelier A.S., Quentin R. 2004. Survey Study Group of the Relais d'Hygiène du Centre : Virulence and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from various origins. *Pathologie Biologie*; 52: 579-583.

Références Bibliographiques

- Mesaros N., Nordmann P., Plésiat P., Roussel-Delvallez M., Van Eldere J., Glupczynski Y., Van Bambeke, F. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: résistance et options thérapeutiques à l'aube du deuxième millénaire. *Antibiotiques* ; 9(3), 189-198.
- Monot M. 2013. Etude génomique des souches hautement pathogènes de *Clostridium difficile*. Thèse de Doctorat.
- Mylonakis E., Edward T., Ryan M.D., Stephen B., Calderwood M.D. 2001. *Clostridium difficile*–Associated Diarrhea A Review . *Archives of Internal Medicine*; 161(4),525-533.
- Mylonakis E., Ryan E. T., et al. 2001. *Clostridium difficile*-Associated diarrhea: A review. *Archives of Internal Medicine*; 161(4): 525-33.
- Nauciel C., Vildé J.L. 2000. Bactériologie Médicale. Masson. Paris. p5-15-47-128-148.
- Nauciel C. et Vildé J.L. 2005. Bactériologie clinique : connaissances et pratique. 2^{ème} édition. Masson. Paris. p.259 .
- Pollack R.A., Findlay L., Mondschein W. et Modesto R. 2012. Laboratory Exercises in Microbiology. 4th ed .. John Wiley & Sons. USA . p 273.
- Reed D ., Kemmerly, Sandra A., 2009. Infection Control and Prevention: A Review of Hospital-Acquired Infections and the Economic Implications. Ochsner J. Spring; 9(1): 27–31.
- Richard k. 2005. Génomique fonctionnelle in vivo de l'oxydoréductase PA 3498 chez *Pseudomonas aeruginosa*. Maitrise en microbiologie-immunologie.
- Sambrook J., Russel D.W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Vol 1. CSHL PRESS. New York .2344p.
- Santos S.B., Carvalho C. M., Sillankorva S., Nicolau A., Ferreira E .C. , Azeredo J. 2009. The use of antibiotics to improve phage detection and enumeration by the double-layer agar technique), *BMC Microbiology*; 9,148.
- Sougakoff w., Trystram d. 2003. Résistances aux β -lactamines. Université pierre et marie curie. Faculté de médecine pitié-salpêtrière. p 31-46.
- Sundar M.M., Nagananda G.S., Das A., 2009. Isolation of host-specific bacteriophages from sewage against human pathogens. *Asian Journal of biotechnology*., 1(4):163-170.

Références Bibliographiques

- Tenover F.C., Baron E.J., Peterson L.R., Persing D.H.2011. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection can molecular amplification methods move us out of uncertainty. *Journal of Molecular Diagnostics*;13(6),573-82.
- Vaubourdolle M. 2007. Infectiologie. Collection le moniteur internat. Wolterskluwer. 1328 p.
- Verhaegen J. 2004. Les entérobactéries. Bactériologie. Elsevier. Le lien : www.kuleuven.be/vesaliusonline/UNIKEN%20KONGO.doc.
- Veysier P., Domart Y. 1996. Infections nosocomiales. Masson. Paris. p 1-63-71-79-82.
- Weinstein M.P. and Doern G.V.2011. A Critical Appraisal of the Role of the Clinical Microbiology Laboratory in the Diagnosis of Bloodstream Infections. *Journal of Clinical Microbiology*; 49(9): 26-29.
- Wittebole X., Roock S.D. and Opal S.M. 2014. A Historical Overview of Bacteriophage Therapy as an Alternative to Antibiotics for the Treatment of Bacterial Pathogens. *Virulence*; 5:226-235.
- Wolfgang M. C., Kulasekara B. R., *et al.* 2003. Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*; 100(14): 8484-8489.
- Wolk D.M., Dunne W.M. 2011. New Technologies in Clinical Microbiology. *Journal of Clinical Microbiology* ; 49: 62-67.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2011. Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide: a systematic review of the literature. Geneva, World Health Organization.
- Wylie J. L. and Nowicki D. L. 2005. Molecular Epidemiology of Community and Health Care-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Manitoba, Canada. *Journal of Clinical Microbiology*; 43: 2830–2836.

Annexes

Annexes

Annexe 1

<i>Milieux de culture utilisés</i>		
<i>Milieu de culture</i>	<i>Ingrédients</i>	<i>Quantité</i>
Bouillon nutritif	Extrait de viande	1 g
	Extrait de levure	1 g
	Peptone	5 g
	Eau distillée	1000 ml
	pH = 7,2	
Gélose nutritive	Extrait de viande	1 g
	Extrait de levure	1 g
	Peptone	5 g
	Agar - Agar	15 g
	Eau distillée	1000 ml
	pH = 7,2	
Gélose nutritive molle	Extrait de viande	1 g
	Extrait de levure	1 g
	Peptone	5 g
	Agar - Agar	7.5g
	Eau distillée	1000 ml
	pH = 7,2	
Gélose Mac conkey	Peptone de gélatine	17 g
	Peptone de caséine	1.5g
	Peptone de tissus d'animaux	1.5 g
	Sels biliaires	1.5 g
	Lactose	10 g
	Chlorure de sodium	5 g
	Violet de crystal	0.001 g
	Agar –Agar	13.5 g
	Eau distillée stérile	1000 ml
	pH =7,1 ± 0,2	

Annexes

Gélose Chapman	Extrait de viande (bovin ou porcin)	1 g
	Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin)	10 g
	Chlorure de sodium	75 g
	Mannitol	10 g
	Agar –Agar	15 g
	Rouge de phénol	0,025g
pH=7,6		
Gélose au cétrimide	Peptone de gelatine	20 g
	Cétrimide	0,3g
	Chlorure de magnésium	1,4 g
	Sulfate de potassium	10 g
	Agar	13,6 g
	Eau distillée	1000 ml
pH = 7,2 ± 0,2		
Gélose Bile Esculine Azide	Peptone	17g
	Peptone pepsique de viande	3 g
	Extrait de levure	5 g
	Esculine	1g
	Citrate de sodium	1g
	Citrate de fer ammoniacal	0,5 g
	Bile de bœuf déshydratée	10,0 g
	Azide de sodium	0,25 g
	Chlorure de sodium	5,0 g
	Agar- Agar	13 g
	Eau distillée	1000 ml
pH = 7,1 ± 0,2		
Gélose Mueller-Hinton	Infusion de viande de boeuf	300 g
	Peptone de caséine	17.5 g
	Amidon de mai	1.5 g
	Agar-Agar	17 g
	Eau distillée	1000 ml
pH= 7.4		

Annexes

<i>Composition des solutions utilisées</i>		
<i>Ingrédients</i>	<i>Quantité</i>	<i>Concentration finale</i>
<i>100mM CaCl₂ (100ml)</i>		
CaCl ₂	1.47 g	100 mM
H ₂ O	100 mL	
<i>TAE 50X 1L</i>		
Trizma base	242 g	2 M
500 mM EDTA	100 mL	50 mM
Glacial acetic acid	57.1 mL	1 M
<i>1M Tris pH =7.5 1L</i>		
Trizma base	121.1g	1M
H ₂ O	1L	
<i>1M Tris-Hcl 1L</i>		
Tris-Cl	157.60 g	1M
H ₂ O	1 L	
<i>1 M MgSO₄ stock 1L</i>		
MgSO ₄ (anhydrous)	120.36 g	1 M
H ₂ O	To 1 L	
<i>Tampon phage 1L</i>		
1 MTris stock (pH 7.5)	10 mL	10 mM
1 M MgSO ₄ stock	10 mL	10 mM
NaCl	4 g	68 mM
H ₂ O	970 mL	-

Annexes

100 mM CaCl ₂ stock	10 ml	-
<i>Sodium acétate 100ml</i>		
Sodium acetate trihydrate	40.8 g	-
H ₂ O	100 mL	
Acid Acetic Glacial	To pH 5.2	
<i>TE (10mM Tris-Hcl, 1mM EDTA)1L</i>		
H ₂ O	988 mL	-
1M <i>Tris-HCl</i> stock (pH 7.5)	10 mL	10 mM
500 mM EDTA stock (pH 8.0)	2 mL	1 mM
<i>Eau physiologique</i>		
9g NaCl	1000 ml H ₂ O	-
<i>Solution I</i>		
Tris-HCl (pH 8.0)	-	50mM
EDTA (pH 8.0)	-	10 mM.
<i>Solution II</i>		
NaOH	-	0.2M
SDS 1%	-	-
<i>Solution I</i>		
Acétate de potassium pH 5.5	-	3M

Annexes

Annexe 2 : Fiche de renseignements

Fiche de renseignements

Informations générales sur le patient :

Sexe : Homme Femme

Age : Enfant Adulte

Date du prélèvement :

Historique médical du patient :

Patient interne* Patient externe

* Si le patient est interne remplir les informations suivantes :

Date d'admission :

Raison(s) d'admission:

Début de la diarrhée :

Antibiotiques pris au cours d'hospitalisation :

Durée de prise d'antibiotiques :

Voie de prise de l'antibiothérapie : Orale IV

Réponse à la thérapie :

Autres pathologie(s) traitée(s) :

Hospitalisation(s) ultérieure(s) : Oui* Non

(*)Raison(s) d'admission :

(*)Fréquence des diarrhées :

Diagnostic histologique (Coloscopie) :

Médecin traitant :

Résumé

Les infections nosocomiales sont un problème commun dans les hôpitaux à travers le monde, et sont un problème majeur de santé publique. Les infections nosocomiales contribuent d'une manière significative à la mortalité, morbidité et la prolongation de la durée d'hospitalisation, ainsi qu'à l'augmentation du coût de traitement et la prise en charge des patients.

L'objectif principal de cette étude était d'isoler et de caractériser des bactéries responsables d'infections nosocomiales à partir des surfaces dans quelques services d'un hôpital à Chlef.

On a identifié, par des méthodes microbiologiques et biochimiques, 92 isolats appartenant à cinq genres bactériens : *Staphylococcus* (28%), *Pseudomonas* (15%), *Enterobacter* (4%), *Citobacter* (4%), *Burkholderia* (2%), et 48% non encore identifiées.

La répartition des bactéries par service a montré une prédominance dans le bloc opératoire, suivie par les services de cardiologie, de réanimation, et enfin d'urologie.

Mots clés : Infections nosocomiales, *Staphylococcus aureus*, antibiorésistance, vancomycin, bactériophage

Summary

Nosocomial infections are a common problem in the hospitals throughout the world and a major problem for the public health. They contribute significantly to mortality, morbidity and prolonged hospitals stays of patients, and also increase the cost of hospitalization.

The main objective of this study was to isolate and characterise nosocomial pathogens from few services in a hospital at Chlef.

We have identified, by microbiological and biochemical methods, 92 isolates belonging to five bacterial genera *Staphylococcus* (28%), *Pseudomonas* (15%), *Enterobacter* (4%), *Citobacter* (4%). and *Burkholderia* (2%), and 48% not yet identified.

The distribution of these bacteria by services showed dominance in the operating service, followed by cardiology, and reanimation, and finally urology.

keywords: nosocomial infections, *Staphylococcus aureus*, antibioresistance, vancomycin, bactériophage