

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قالمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques
Département : Écologie et Génie de l'Environnement
Spécialité/Option : Microbiologie appliquée

Intitulé

Isolement et identification des bactéries nosocomiales à partir des pailles

Présenté par :

Melle . Anfel Belhaine
Melle . Assala Khaled
Melle . Amel Metlaghi

Devant le membre du jury

Dr. Touati H.
Dr. Amri S.
Dr. Benhalima L.

Président
Encadrante
Examinatrice

Université de Guelma
Université de Guelma
Université de Guelma

Juin 2022

Nos remerciements vont en premier lieu aux membres du jury

Monsieur Touati H., docteur à l'université de 8 Mai 1945, pour l'honneur qu'il me fait de présider le jury.

Madame Benhalima L., docteur à l'université de 8 Mai 1945, pour l'honneur qu'elle nous fait d'examiner le mémoire.

Madame Sandra AMRI, docteur à l'université de 8 Mai 1945, d'avoir accepté de diriger ce mémoire. Qu'elle trouve ici, le témoignage de notre profonde reconnaissance et notre sincère gratitude.

Mille mercis ne suffisent pas pour exprimer notre grande gratitude à nos parents qui n'ont jamais cessés de nous soutenir, que ce travail soit le témoignage de notre profonde reconnaissance. Enfin, merci à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Dédicace

Je tiens à remercier en premier lieu Allah qui m'a donné la vie et la santé pour le parachèvement de ce modeste travail.

Je dédie ce travail :

A celui qui aurait été fier de moi, A l'homme de ma vie, à toi mon très cher père Brahim ·Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi ·A celle qui m'a donnée beaucoup d'amour et m'a entouré de tout son affection , la lumière de mes jours, la flamme de mon cœur, la source de mes efforts, ma vie et mon bonheur ma mère Nadjia que Dieu la garde.

Vos prières et vos bénédiction mes chers parents, m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études ·Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez, mon profond respect pour tous les efforts que vous avez fournis pour moi, j'espère qu'un jour je peux leur rendre un peu de ce qu'ils ont fait pour moi, que dieu leur prête bonheur et longue vie



*A mon adorable sœur : Sameh pour son soutien moral, son affection
et ses sacrifices ainsi que son mari Khelifa*

A mes chers frères : Hichem, Imed, Hamdi, Bilel et Aymen

A tous mes oncles, tantes et mes cousines surtout ma tante Akila

A mes neveux et mes

*nièce : Maroma, Sadjia, Hanine, Mohamed, Rami, Ayoub, Louay, Lyad, Anes, Nibras
Wassim et Yazen*

A mon binôme Amel et Anfel

A toutes mes chères amies surtout : Nour el Houda

A toute ma famille et mes camarades.

Assala

باسم الله الرحمن الرحيم

اللهم لك الحمد أن وفقْتيني لانجاز هذا العمل و أحطتني بكرم عطائك لأصل إلى ما أصبوا إليه
أهدي هذا النجاح إلى كل من

إلى أمي (الأسناذة نورة عنابي): قرة العين و بهجة الدنيا
إلى النبع الذي لا ينضب عطاءاً و إيماناً بي
إلى من ربّت فأحسنت التربية و النشأة
إلى من اهتمت و فاض فضلها علينا
ما كان هذا النجاح أن يكتمل إلا بوجودك و دعمك يا نورة البيت
أدامك الله لي شمساً تنير كل أيامي

إلى أبي (حسين): سند العمر و ذخيرة الدهر
إلى من شاب شعره لأعيش بكرامة
و جرحت أطراف أصابعه ليحقق متطلباتي
أدامك الله لي قمراً ينير دربي

إلى أختي (أريج): آخر العنقود ، ملح البيت و أولى بناتي
إلى من تحملت أزعاجي لها طوال خمس سنوات
نجمتي التي أتمنى لها نجاحاً باهراً يفوق ما حققته بكثير ان شاء الله

إلى أخي (لؤي برهان الدين): سندي و عضدي القويم
و إبني الثاني
إلى نسمة البيت و رجلها الثاني
أتمنى لك درباً مثمراً مكللاً بالنجاحات بعون الله

إلى كل أفراد أسرتي و بنات خالاتي خولة، سلمى، مريم، أمينة، نسبية، أسماء، أروى

**إلى صديقات الدرب ملاك و شيماء و رفيقات الجامعة اصالة و أمال و كل من شاركني مشوار
الدراسة في حياتي**

**إلى صديقاتي في العالم الأزرق (فيسبوك)
من كافة الدول العربية الشقيقة**

**إلى الصديقات اللواتي شاركنني عالم القراءة الالكترونية
كاتبات و قارئات
إلى أروع الصديقات المصمّمات دون استثناء بنات تصميماتي العزيزات**

و أختمها إلى كل من علمني حرفاً فأنار به بصيرتي و دربي

أنفال

Dédicace

Ma chère maman Houria :

*Qui m'a donnée la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour
mon bonheur et*

*ma réussite, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargnée
aucun effort pour me*

*rendre heureuse quoi que je fasse, je ne pourrais te rendre ce que tu as
fait pour moi. Soyez*

*fière de moi aujourd'hui et voyez à travers ce travail mon amour
sincère.*

Mon cher Papa Salah :

*L'homme le plus exceptionnel au monde, mon héros, le meilleur
papa qu'on puisse avoir, qui a été au près de moi durant toute ma vie
et mes années d'études, et qui à toujours veillé à ce que rien ne m'y
soit refuser.*

Mes belles adorables sœurs :

*Nour et Chourouk ;: je ne pourrais exprimer à travers ses lignes
tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers vous. Puisse
l'amour et fraternité nous unissent à jamais. Je vous souhaite la
réussite dans votre vie, avec tout le bonheur qu'il faut pour vous*

comblé. Merci pour votre précieuse aide à la réalisation de ce travail.

A mes chères tantes *Affaf, Nabila et Khadija* à qui j'exprime mes plus profonds sentiments d'amour.

A mes chères Mes tantes et oncles en témoignage de mes plus profondes amitiés.

A mon binôme *Aissala et Anfel*, je la remercie pour le courage qu'elles m'a donné et tous les moments qu'on a passé ensemble.

A notre encadreur *Mme. AMRI Sandra* merci énormément pour votre aide et votre prise en charge, on ne pourra jamais rendre

tout ce que vous avez fait pour nous encadrer et pour finir ce travail.

A tous ceux qui m'ont aidé de loin ou de près afin de réaliser ce travail.

A toute la famille *Metlaghi* sans exceptions.

A ma promotion et tous qui connaisse *Amel*

Amel

Table des matières

Page

Résumé en français

Résumé en anglais

Résumé en arabe

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 01

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1. Définition l'infection nosocomiale 02

I.2. Historique 02

I.3. Épidémiologie 03

I.4. Chaîne épidémiologique 04

I.4.1. Origine des infections nosocomiales..... 04

I.4.1.1 Flore saprophyte du malade lui-même 04

I.4.1.2. Personnel soignant..... 04

I.4.1.3. Environnement 04

I.4.2. Transmission des infections nosocomiales 04

I.4.2.1. Transmission par l'air contaminé 05

I.4.2.2. Transmission par contact 05

I.4.2.3. Transmission du matériel médical 05

I.4.2.4. Transmission par les draps et la literie 05

I.4.3. Hôte réceptif 05

I.5. Types d'infection nosocomiale 06

I.5.1. Infection urinaires 06

I.5.2. Pneumopathies nosocomiale 06

I.5.3. Infection du bloc opératoire 07

I.5.4. Bactériémies nosocomiales 08

I.5.5. Autres infections nosocomiales 08

I.6. Mode de transmission 08

I.6.1. Auto- infection 08

I.6.2. Hétéro-infection	09
I.6.3. Xéno-infection	09
I.6.4. Exo- infection	10
I.6.5. Patient réceptif	10
I.7. Facteurs favorisant les infections nosocomiales	10
I.7.1. Facteurs liés aux agents microbiens	10
I.7.2. Facteurs liés aux patients	10
I.7.3. Facteurs environnementaux	11
I.8. Agents responsables des infections nosocomiales	11
I.8.1. Champignons et parasites	11
I.8.2. Virus	11
I.8.3. Bactéries	12
I.8.3.1. Bactéries symbiotiques	12
I.8.3.2. Bactéries pathogènes	12
I.9. Prévention des infections nosocomiales	13
I.9.1. Antisepsie	13
I.9.2. Asepsie	13
I.9.3. Choix de l'antibiotique	13
I.10. Principes généraux de prévention pour les hôpitaux	13
I.10.1. Bâtiments	13
I.10.2. Personnel	13
I.10.3. Déchet	14

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1. Isolement de la flore bactérienne	15
II.2. Purification de la flore bactérienne	16
II.3. Identification de la flore bactérienne.....	16
II.3.1. Examen macroscopique	16
II.3.2. Examen microscopique	16
II.3.3. Recherche de l'oxydase	17
II.3. 4. Recherche de la catalase	17
II.3.5. Identification biochimique par la galerie classique	18
II.3.5.1. Recherche du nitrate réductase.....	18
II.3.5.2. Utilisation du citrate comme seule source de carbone.....	18

II.3.5.3. Production de l'acétoïne	18
II.3.5.4. Mise en évidence de la voie des fermentations des acides mixtes	19
II.3.5.5. Dégradation du mannitol	19
II.3.5.6. Production de l'uréase	20
II.3.5.7. Production d'indole	20
II.3.5.8. Production du tryptophane désaminase (TDA)	21
II.3.5.9. Production de la β -galactosidase.....	21
II.3.5.10. Fermentation des sucres avec ou sans gaz et production d'H ₂ S	21
II.3.5.11. Production de pyocyanine et pyoverdine	22
II.3.5.12. Identification	22
II.3.6. Identification biochimique par la galerie miniaturisée.....	22
II.3.6.1. Galerie biochimique miniaturisé API 20E	23
II.3.6.2. Galerie biochimique miniaturisé API 20 NE.....	24
II.3.6.3. Lecture et interprétation des résultats	24
II.4. Conservation des souches bactériennes	24

Chapitre III : Résultats et discussions

III.1. Examens macroscopiques et microscopiques.....	25
III.2. Recherche de l'oxydase et la catalase.....	28
III.3. Identification biochimique par la galerie classique.....	30
III.4. Identification biochimique par la galerie miniaturisée.....	34
III.5 Production de Pyocyanine et Pyoverdine	36

Conclusion et perspectives.....	39
--	-----------

Références bibliographiques.....	40
---	-----------

Annexes

Résumés

Résumé : Notre travail avait pour but, d'isoler et d'identifier les bactéries responsables des infections nosocomiales à partir des paillasse de la salle de réception d'une polyclinique (Wilaya d' Annaba). Les résultats obtenus ont indiqué que la présence d'une microflore variante : *Entérobacter cloaceae*, *Serratia fonticola*, *Enterobacter aerogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas uteola* composé principalement de bactéries à Gram négatives. Toute fois, aucune bactérie à Gram positives n'a pu être isolée.

Mots clés : Infections nosocomiales, Bactérie, isolement et Identification.

Abstract : Our work was aimed at isolating and identifying the bacteria responsible for nosocomial infections from the benches of the reception room of a polyclinic (Wilaya d'Annaba). The results obtained indicated that the presence of a variant microflora: *Entérobacter cloaceae*, *Serratia fonticola*, *Enterobacter aerogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas uteola* composed mainly of Gram-negative bacteria. However, no Gram-positive bacteria could be isolated.

Keywords : Nosocomial infections, Bacteria, Isolation and Identification.

ملخص : كان عملنا يهدف إلى عزل وتحديد البكتيريا المسؤولة عن عدوى المستشفيات من غرفة الاستقبال في العيادة المتعددة الخدمات (ولاية عنابة). أشارت النتائج التي تم الحصول عليها إلى وجود بكتيريا متغيرة: *Entérobacter cloaceae*, *Serratia fonticola*, *Enterobacter aerogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas uteola* تتكون بشكل أساسي من بكتيريا سلبية الغرام. ومع ذلك، لا يمكن عزل أي بكتيريا إيجابية الجرام.

الكلمات المفتاحية : عدوى المستشفيات، البكتيريا، غرفة الاستقبال ، العزل والتعرف.

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Infection nosocomiales les plus fréquents.....	06
02	Transmission de l'infection nosocomiale.....	09
03	Aspect macroscopique et microscopique des colonies bactériennes.....	28
04	Photos présent des testes de l'oxydase et la catalase.....	29
05	Identification biochimique de l'espèce <i>Enterobacter cloacae</i> (E1).....	30
06	Identification biochimique de l'espèce <i>Entérobacter cloacae</i> (E2).....	30
07	Identification biochimique de l'espèce <i>Serratiafonticola</i> (E3).....	30
08	Identification biochimique de l'espèce <i>Pseudomonas luteola</i> (P1).....	31
09	Identification biochimique de l'espèce <i>Enterobacter cloacae</i> (K1).....	31
10	Identification biochimique de l'espèce <i>Aeromonas hydrophila</i> (K2).....	31
11	Identification biochimique de l'espèce <i>Enterobacter aerogenes</i> (K12_1).....	32
12	Identification biochimique de l'espèce <i>Aeromonas hydrophila</i> (K12_2).....	32
13	Profil biochimique de l'espèce <i>Enterobacter cloacae</i> (E1).....	34
14	Profil biochimique de l'espèce <i>Enterobacter cloacae</i> (E2).....	34
15	Profil biochimique de l'espèce <i>Serratia fonticola</i> (E3).....	34
16	Profil biochimique de l'espèce <i>Pseudomonas luteola</i> (P1).....	35
17	Profil biochimique de l'espèce <i>Enterobacter cloacae</i> (K1).....	35
18	Profil biochimique de l'espèce <i>Aeromonas hydrophila</i> (K2).....	35
19	Profil biochimique de l'espèce <i>Enterobacter aerogenes</i> (K12_1).....	35
20	Profil biochimique de l'espèce <i>Aeromonas hydrophila</i> (K12_2).....	36
21	Photo présente des milieu King A et King B	36

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Bactéries responsables des infections nosocomiales.....	12
02	Aspect macroscopique et microscopique des colonies bactériennes.....	25
03	Identification de l'oxydase et de la catalase des souches isolées.....	28
04	Résultats des testes biochimique classique des souches isolées.....	33
05	Résultat de l'identification biochimique des souches isolées par l'API 20 E.....	37
06	Résultat de l'identification biochimique des souches isolées par l'API 20 NE.....	37

Introduction

Introduction

L'infection hospitalière ou nosocomiale est un problème majeur de santé publique de par sa fréquence et son impact sur l'Homme et l'économie. Elle se définit comme une infection acquise dans un établissement de santé et ses manifestations cliniques apparaissent généralement 48 heures après l'hospitalisation (Zeroual, 2012). Dans les hôpitaux, le risque d'infection a toujours été présent et a augmenté au fur et à mesure de l'évolution des pratiques de prise en charge des patients. De plus, les hospitalisations des patients ont changé, en particulier dans la prise en charge des personnes les plus à risque d'infection, telles que les patients immunodéprimés, les patients en chirurgie majeure, les patients souffrant de nombreuses pathologies graves et les patients polytraumatisés en réanimation (Samou, 2005). Selon l'Organisation Mondiale de la santé (OMS), plus de 1,4 millions de personnes dans le monde souffrent de complications infectieuses induites par les soins. Dans certains pays en développement, la proportion des malades hospitalisés atteints dépasse 25 %, tandis que dans les établissements modernes des pays dits développés, seule 5 à 10 % des patients admis dans les services de soins aigus contractent une infection liée aux soins (World Health Organization, 2005). De nombreux travaux ont rapporté le rôle important que joue l'environnement hospitalier dans le développement des infections nosocomiales. L'environnement hospitalier est le réservoir le plus important des microorganismes résistants. La présence de plus de 5 UFC/cm² sur une surface qui pourrait rentrer en contact avec les mains, indique qu'il pourrait y avoir un risque accru d'infection pour le patient (Dancer, 2004).

En Algérie et dans la plupart des pays Maghrébins, il n'existe aucun système de mesure qui permet d'objectiver l'importance du risque dans les hôpitaux, les infections nosocomiales restent ainsi un problème méconnu et non perçu comme une priorité (Kernan et al., 2013). De ce fait, l'objectif de notre travail est : l'isolement et l'identification des germes responsables des infections nosocomiales dans le service du milieu hospitalier de la wilaya d'Annaba. Notre travail sera organisé en 3 chapitres. Le premier est purement théorique rassemble d'une part des généralités sur les infections nosocomiales et les principaux agents responsables de ces infections. Le second, chapitre décrira le matériel et les méthodes adoptées pour réaliser ce travail, le troisième chapitre, mentionne les différents résultats obtenus au cours de notre étude avec une discussion qui regroupera l'ensemble des résultats obtenus. Enfin ce manuscrit sera clôturé par une conclusion et des perspectives pour l'ensemble du travail.

Chapitre I

Synthèse bibliographiques

I.1. Définition de l'infection nosocomiale

Etymologiquement, nosocomial vient de grec « nosos », qui signifie maladie, et « komien », qui signifie guérir. Puis du latin « nosocomium » qui signifie maladie hôpital. (Brucker et Bouvet, 1998). Les infections nosocomiales (IN) sont aussi appelées infections hospitalières, ce sont des infections acquises pendant un séjour à l'hôpital et qui n'étaient pas présentes au moment de l'admission du patient. Les infections survenant plus de 48 heures après l'admission sont habituellement considérées comme nosocomiales. L'évolution des pratiques médicales a entraîné une diminution de la durée des séjours à l'hôpital et une augmentation des soins ambulatoires. Il a été proposé d'englober dans le concept d'infection nosocomiale les infections survenant chez les patients recevant un traitement dans un établissement de santé quel qu'il soit. Les infections contractées par le personnel ou les visiteurs de l'hôpital ou autre établissement de santé peuvent aussi être considérées comme des infections nosocomiales (Ducel *et al.*, 2002).

I.2. Historique

La première définition de l'infection nosocomiale a été donnée par la circulaire du ministère de la santé N° 263 du 13 octobre 1988 relative à l'organisation de la surveillance et de la prévention des infections nosocomiales. Cette circulaire est remplacée par une autre circulaire du ministère de l'emploi et de la solidarité du 29 décembre 2000 qui en application de la loi du 1^{er} juillet 1998 relative au renforcement de la surveillance sanitaire et du contrôle de la santé et de la sécurité des produits à usage humain, impose au public et les établissements de santé privés sont tenus d'organiser en leur sein la lutte contre les infections nosocomiales et autres maladies iatrogènes et le décret du 6 décembre 1999 qui organise les moyens de lutte mis en œuvre par la commission hospitalière de lutte contre les infections de chaque établissement. Selon leurs avis, les infections nosocomiales sont des infections dans les établissements de santé. Le comité technique nationale des infections nosocomiales (CTIN), devenu comité technique nationale des infections nosocomiales et des infections liées aux soins (CTINILS) a élaboré une nouvelle définition en Mai 2007, estimant que la définition de 1999 n'était pas satisfaisante en raison de la multiplication des parcours de soins et des acteurs de l'offre de soins, la diversification des structures et des systèmes de soins [1]. Dans la dispensation des soins, de la diversification des structures et des systèmes de soins, et de la survenue parfois tardive de l'infection après une chirurgie, en particulier avec prothèses implantées. On voit ainsi apparaître la notion d'infection associée aux soins (IAS) qui est définie comme suit : une infection est dite associée aux soins si elle survient au

cours ou au décours d'une prise en charge (diagnostique, thérapeutique, palliative, préventive ou éducative) d'un patient, et si elle n'était ni présente ni en incubation au début de la prise en charge. Lorsque l'état infectieux au début de la prise en charge n'est pas connu précisément, un délai d'au moins 48 heures ou un délai supérieur à la période d'incubation est couramment accepté pour définir une IAS. Toutefois, il est recommandé d'apprécier dans chaque cas la plausibilité de l'association entre la prise en charge et l'infection. Pour les infections du site opératoire, on considère habituellement comme associées aux soins les infections survenant dans les 30 jours suivant l'intervention ou, s'il y a mise en place d'un implant, d'une prothèse ou d'un matériel prothétique dans l'année qui suit l'intervention. Toutefois, et quel que soit le délai de survenue, il est recommandé d'apprécier dans chaque cas la plausibilité de l'association entre l'intervention et l'infection, notamment en prenant en compte le type de germe en cause (Thierry, 2016).

I.3. Épidémiologie

Les infections nosocomiales sont un problème de santé publique préoccupant, la prévalence de l'IN dans le monde entier varie entre 1 et 20 % et l'incidence globale de 5 à 10 % avec une variation aussi d'un pays à l'autre. Une étude sur la prévalence des IN menée sous l'égide de l'organisation mondiale de la santé (OMS) dans 55 hôpitaux de 14 pays dans 4 continents a révélé qu'en moyenne 8,7 % des patients hospitalisés avaient acquis une IN. En France, elle est estimée entre 6 et 7 % atteignant 20 % dans les services de réanimation, les services les plus touchés sont ceux de réanimation, d'hématologie, de chirurgie et brûlés. Les 5 principaux sites d'infections nosocomiales représentent 70 % de l'ensemble des IN avec par ordre d'importance, les infections urinaires (35 %), les pneumopathies (12 %), les infections du site opératoire (11 %), les bactériémies (6 %) et les infections par cathéter (4 %). Les principaux micro-organismes responsables sont l'*Escherichia coli* (21 %), *Staphylococcus aureus* (16 %), *Pseudomonas aeruginosa* (11 %), *Enterococcus sp* (8 %) et ces quatre espèces représentent 56 % des micro-organismes retrouvés dans les infections nosocomiales (Sumba, 2012).

Une étude multicentrique a été menée dans 27 hôpitaux en Algérie, en Égypte, en Italie, au Maroc et en Tunisie pour évaluer la prévalence et les caractéristiques des infections nosocomiales. La population étudiée 4634 patients était relativement jeune, avec un âge moyen de 41,1 ans. Le taux d'infection nosocomiale était de 10,5 %, il était plus élevé dans les centres non universitaires et les hôpitaux de taille moyenne. Globalement, les infections urinaires sont les plus fréquentes. La prévalence était particulièrement élevée en pédiatrie (11,3 %). Les bactéries les plus fréquemment isolées étaient *Escherichia coli* (17,2 %),

Staphylococcus aureus (12,5 %), *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* (9,2 %). Au jour de l'enquête, 40,7 % des patients recevaient des antibiotiques, et près de la moitié d'entre eux avaient des indications empiriques. L'incidence des infections nosocomiales était significativement associée à la ventilation mécanique, à une hospitalisation de 8 jours ou plus, aux cathéters centraux ou périphériques, aux cathéters urinaires, au diabète et à l'âge ([Amazian et al., 2010](#)).

I.4. Chaîne épidémiologique

Les infections nosocomiales obéissent à la même description épidémiologique que toute pathologie infectieuse communautaire. Leur chaîne épidémiologique comporte donc trois maillons : l'origine des germes, la transmission de la maladie et l'hôte réceptif.

I.4.1. Origine des infections nosocomiales

I.4.1.1 Flore saprophyte du malade lui-même

Elle subit au cours des premiers jours de l'hospitalisation des modifications qualitatives. Les bacilles à Gram négatif et plus accessoirement les levures (*Candida*) remplacent les cocci à Gram positif. Ces flores saprophytes modifiées colonisent les sites préférentiels chez le malade entraînant une infection de l'appareil urinaire, des plaies opératoires, ou du parenchyme pulmonaire ([Samou Fosto, 2005](#)).

I.4.1.2. Personnel soignant

La contamination peut se faire par le biais du personnel soignant. Il peut être le facteur décisif de la propagation de l'infection, les personnes elles-mêmes peuvent être porteuses d'infection cutanées légère aux staphylocoques ou des infections des voies respiratoires du à la propagation de virus ([Sanogo, 2007](#)).

I.4.1.3. Environnement

Il est moins déterminant dans le cadre de programme de prophylaxie que les deux précédentes origines. Il peut être contaminé par le personnel ou par le patient. Il comprend les divers appareillages d'assistance respiratoire et de monitoring par voie intravasculaire, les lavabos, les instruments, les liquides et les tubulures, la nourriture et l'air ambiant ([Zeroual, 2012](#)).

I.4.2. Transmission des infections nosocomiales

On distingue quatre principaux modes de transmission de l'agent infectieux.

I.4.2.1. Transmission par l'air contaminé

En respirant, en parlant, en toussant, on libère toutes les particules de sécrétion qui se propage sur des distances considérables. Dans une salle d'opération ou une chambre d'hôpital, l'air peut également ramasser les squames sur la peau d'un patient. Ces particules peuvent se déposer sur les plaies chirurgicales ou contaminer le matériel médical (Figarella *et al.*, 2007).

I.4.2.2. Transmission par contact

Les micro-organismes peuvent être transmis aux patients hospitalisés par tout contact avec des personnes et/ou des objets présents dans l'espace hospitalier. Les mains sont la principale cause de transmission microbienne, les bactéries de la flore cutanée peuvent contaminer le patient. Ces flores éphémères sont les plus dangereuses, mais faciles à nettoyer (Figarella *et al.*, 2007).

I.4.2.3. Transmission du matériel médical

Le matériel médical utilisé pour les soins, la chirurgie ou l'exploration est stérilisé. Des défauts de stérilisation peuvent se produire anormalement, de sorte que des matériaux mal stérilisés peuvent être une source de contamination pour le patient (Figarella *et al.*, 2007).

I.4.2.4. Transmission par les draps et la literie

Les germes des draps et de la literie des patients peuvent se propager aux blouses et aux mains des soignants pendant les soins. Cela peut les propager à d'autres patients (Figarella *et al.*, 2007).

I.4.3. Hôte réceptif

Les personnes sensibles aux micro-organismes pathogènes, leurs système immunitaire affaibli ou absent manque d'anticorps nécessaires pour combattre infection ou récepteurs cellulaires adapté à la procuration [2]. C'est un sujet appartenant préférentiellement à des groupes de patients particulièrement réceptif vis-à-vis du risque infectieux. Divers facteurs influent sur la réceptivité de l'hôte à l'infection (Oumar Cissé, 2014) :

- Inoculum : plus il est grand, plus probable est l'apparition d'une infection clinique.
- Diversité des germes : il est connu que moins il y a des germes de la même espèce, plus grand est leur pouvoir infectieux.
- Caractéristiques des germes : le degré de virulence et de résistance des germes aux antibiotiques influent sur la gravité de l'infection.

- Sensibilité du malade : les facteurs influençant la sensibilité du malade sont nombreux, il s'agit de l'état immunologique, le type de maladie sous-jacente, les effets des procédés de diagnostic et de traitement.

I.5. Types d'infection nosocomiale

I.5.1. Infection urinaires

Ce sont les infections nosocomiales les plus courantes (**Fig.01**), 80 % des infections sont liées à un sondage vésical à demeure. Les infections urinaires sont associées à une plus faible morbidité que les autres infections nosocomiales, mais peuvent dans certains cas provoquer une bactériémie potentiellement mortelle. Ces infections sont habituellement définies selon des critères microbiologiques : uroculture quantitative positive ($\geq 10^5$ micro-organismes/ml). Les bactéries responsables proviennent de la flore intestinale du patient, normale comme *Escherichia coli* ou acquise à l'hôpital comme *Klebsiella* multirésistantes (**Ducel et al., 2002**).

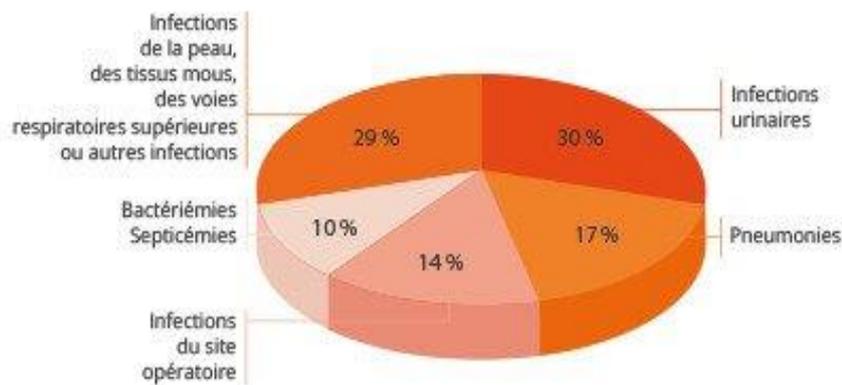


Figure 1 : Infections nosocomiales les plus fréquents [3].

I.5.2. Pneumopathies nosocomiale

Les pneumopathies nosocomiales s'observent chez plusieurs catégories de patients, principalement les patients sous ventilation artificielle dans les unités de soins intensifs, où leur taux atteint 3 % par jour. La pneumopathie associée à la ventilation assistée possède un taux de létalité élevé, bien que le risque attribuable soit difficile à déterminer du fait de l'importance des co-morbidités. Les microorganismes colonisent l'estomac, les voies respiratoires supérieures et les bronches, et provoquent une infection pulmonaire, ils sont souvent endogènes (appareil digestif ou rhinopharynx) mais peuvent être exogènes, souvent à partir d'un appareil respiratoire contaminé. La définition de la pneumopathie peut reposer

sur des critères cliniques et radiologiques faciles à établir mais non spécifiques : opacités radiologiques et progressives au niveau du parenchyme pulmonaire, expectorations purulentes et fièvre d'apparition récente. Le diagnostic est plus spécifique lorsqu'on peut obtenir des échantillons microbiologiques quantitatifs par bronchoscopie spécialisée et protégée. Parmi les facteurs de risque connus figurent le type et la durée de la ventilation, la qualité des soins respiratoires, la gravité de l'état du patient et les antécédents d'antibiothérapie. A part les pneumopathies associées à la ventilation, les patients atteints de convulsions ou dont le niveau de conscience est altéré sont exposés au risque d'infection nosocomiale même en l'absence d'intubation. Les bronchiolites virales sont fréquentes dans les services de pédiatrie, la grippe et les pneumopathies par surinfection bactérienne peuvent toucher les établissements pour personnes âgées. Chez les patients gravement immunodéprimés, une pneumopathie à *Legionella spp.* et à *Aspergillus* peut survenir. Dans les pays à forte prévalence de la tuberculose et en particulier de ses souches résistantes, la transmission dans les établissements de santé peut constituer un grave problème (Ducel *et al.*, 2002).

1.5.3. Infection du bloc opératoire

Les infections du bloc opératoire sont également fréquentes, leur incidence va de 0,5 à 15 % selon le type d'intervention et l'état général du patient. Il s'agit d'un problème important qui limite le bénéfice potentiel des interventions chirurgicales. L'impact sur les coûts hospitaliers et la durée du séjour postopératoire est considérable. La définition de ces infections est essentiellement clinique, écoulement purulent autour de la plaie ou du site d'insertion du drain, ou cellulite extensive à partir de la plaie. Les infections de la plaie opératoire et les infections profondes des organes ou des espaces sont identifiées séparément. L'infection est en général acquise pendant l'intervention elle-même, avec une origine soit exogène (air, matériel médical, chirurgiens et autres soignants), soit endogène (flore cutanée ou flore présente sur le site opératoire ou, dans de rares cas, sang utilisé en préopératoire). Les micro-organismes infectieux sont divers, et dépendent du type et de la localisation de l'intervention et des anti-infectieux reçus par le patient. Le principal facteur de risque est l'étendue de la contamination préopératoire, elle-même conditionnée par la durée de l'intervention et l'état général du patient. Les autres facteurs en jeu sont la qualité de la technique chirurgicale, la présence de corps étrangers, la virulence des micro-organismes, la présence d'une infection concomitante sur un autre site, la pratique du rasage préopératoire et l'expérience de l'équipe chirurgicale (Ducel *et al.*, 2002).

I.5.4. Bactériémies nosocomiales

Les bactériémies ne représentent qu'une faible proportion des infections nosocomiales (5 %) mais possèdent un taux de létalité élevé, plus de 50 % pour certains micro-organismes. Leur incidence est en augmentation, en particulier pour certains micro-organismes comme *Staphylococcus* et *Candida spp.* L'infection peut se développer au point d'insertion cutané d'un dispositif intravasculaire ou sur le trajet sous-cutané d'un cathéter (infection du tunnel). Les micro-organismes qui colonisent le cathéter à l'intérieur du vaisseau peuvent provoquer une bactériémie sans infection externe visible. L'infection prend sa source dans la flore cutanée résiduelle ou temporaire. Les principaux facteurs de risque sont la durée du cathétérisme, le niveau d'asepsie lors de l'insertion, et les soins continus une fois le cathéter en place (Ducel *et al.*, 2002). Le diagnostic est établi lorsqu'au moins une hémoculture positive prélevée présente une fièvre avec ou sans symptômes cliniques, à l'exception des micro-organismes suivants : *Staphylocoques*, *Corynebacterium spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Microcoque*, *Alcaligenes Xanthomonas*, *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas* autre que *Pseudomonas aeruginosa* (Haddadi, 2013).

I.5.5. Autres infections nosocomiales

Les infections décrites plus haut sont les quatre types les plus fréquents et les plus importants d'infections nosocomiales, mais il existe de nombreux autres sites potentiels d'infection, par exemple, infections de la peau et des tissus mous, les plaies ouvertes (ulcères, brûlures, escarres) favorisent la colonisation bactérienne et peuvent conduire à une infection généralisée. La gastro-entérite est l'infection nosocomiale la plus fréquente chez l'enfant, avec un rotavirus comme principal agent pathogène. Dans les pays développés, *Clostridium* est la cause principale des gastro-entérites nosocomiales chez l'adulte. Sinusites, autres infections de la sphère ORL, infections de l'œil et de la conjonctive. Endométrite et autres infections de l'appareil génital après l'accouchement (John et Spicer, 2002).

I.6. Mode de transmission

I.6.1. Auto- infection

C'est lorsque le patient est infecté par sa propre bactérie *in situ* ou par l'environnement immédiat (Fig.02). Les infections sont généralement causées par des bactéries saprophytes, qui sont après une antibiothérapie répétée ou un traitement immunosuppresseur. Cette complication des infections respiratoires associées aux escarres et leur impact sur le drainage. Les voies respiratoires peuvent s'auto-infecter. Enfin, certains patients immunodéprimés peuvent être dus à une bactériémie intestinale héberger. Ces infections strictement endogènes sont aussi des auto-infections (Samou Fasto, 2005).

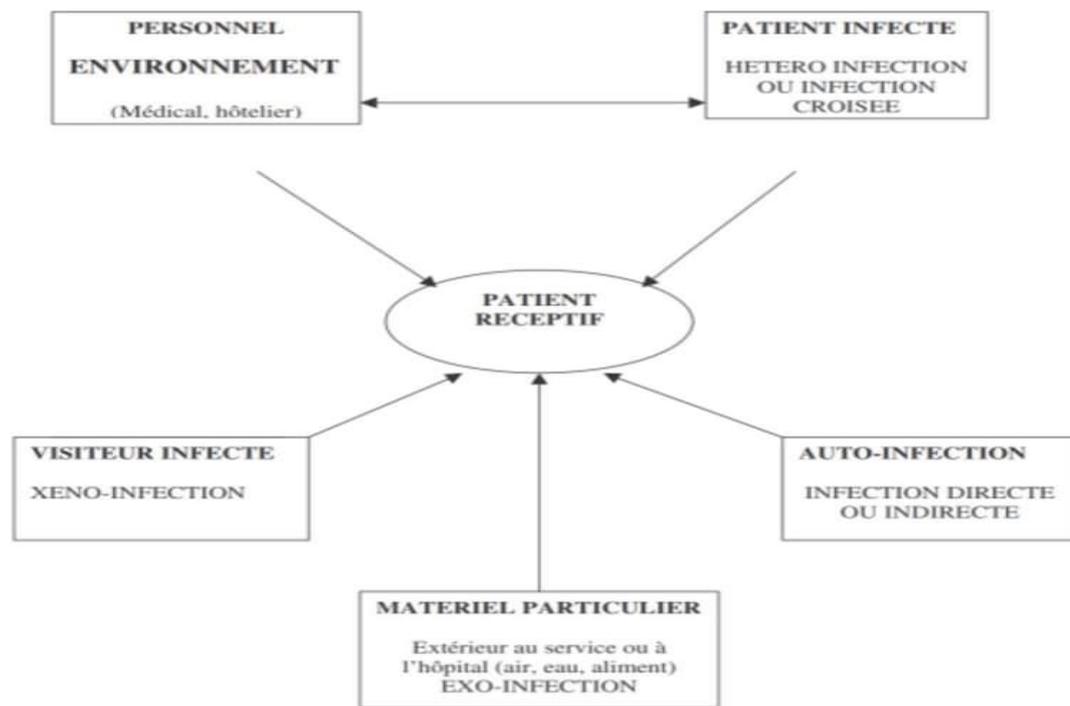


Figure 2 : Transmission de l'infection nosocomiale (Samou Fasto, 2005).

I.6.2. Hétéro-infection

Lorsqu'un agent infectieux est transmis d'un patient à un autre, on parle d'infection xénogénique. Elle provoque ce qu'on appelle une infection croisée ou une infection hétérologue. La source de l'infection est rarement propagée par contact direct ou par voie aérienne. Les vecteurs les plus courants sont les mains du personnel soignant et/ou leurs outils de travail. On parle d'infection manuelle de l'équipement d'exploration ou d'allaitement pour la propagation ou l'infection. C'est le modèle contamination majeure lors de nombreuses épidémies (Samou Fasto, 2005).

I.6.3. Xéno-infection

Ce sont les infections qui sévissent sous forme endémique ou épidémique population non hospitalisée. Les agents pathogènes infectieux sont importés dans les hôpitaux par les patients, les ambulanciers paramédicaux ou les visiteurs qui en sont atteints ou qui sont en période d'incubation. Ils se propagent par voie aérienne, par contact direct ou indirect, et se retrouvent dans les hôpitaux. Des victimes particulièrement réceptives et des conditions de transmission commodes, lorsque les maladies infectieuses sont le seul motif d'hospitalisation, des mesures d'isolement immédiates peuvent être pris. Mais dans certains cas, l'infection n'a rien à voir avec la cause d'hospitalisation (Samou Fasto, 2005).

I.6.4. Exo- infection

Cette infection est liée à des dysfonctionnements techniques (désinfection inefficace, filtre à air/eau stérile sont contaminée), matériels à usage paramédical ou à domicile, les personnes malades ; elles sont susceptibles d'être contaminées et peuvent donc entraîner une infection souvent répandu dans les hôpitaux ([Samou Fasto, 2005](#)).

I.6.5. Patient réceptif

Certaines pathologies entraînent une immunosuppression légère : les patients à risque sont : brûlés, patients alités avec escarres étendues, polytraumatisés et porteurs dispositifs invasifs (aides respiratoires, cathéters urinaires, cathéters divers), les personnes âgées, en particulier les bébés prématurés, ils sont ainsi exposés à infection à l'hôpital ([Samou Fasto, 2005](#)).

I.7. Facteurs favorisant les infections nosocomiales

Les facteurs favorisant les infections nosocomiales peuvent être résumées comme suit :

I.7.1. Facteurs liés aux agents microbiens

Pendant l'hospitalisation, les patients sont exposés à divers agents microbiens, le contact avec les microbes ne signifie pas nécessairement que les patients développeront une maladie cliniquement, car d'autres facteurs influencent la nature et la fréquence des infections nosocomiales. La probabilité qu'une exposition cause une maladie dépend en partie des caractéristiques du micro-organisme, notamment leur résistance aux médicaments anti-infectieux, leur virulence, la quantité de l'inoculum. Aujourd'hui, la plupart des infections nosocomiales sont causées par des micro-organismes sont fréquents dans la population générale, ou ils ne produisent pas de maladie ou sont plus léger que les patients hospitalisés ([Komedjina, 2019](#)).

I.7.2. Facteurs liés aux patients

Parmi les importants facteurs personnels qui entrent en jeu dans l'acquisition de l'infection figurent l'âge, l'état immunitaire, les maladies sous-jacentes et les interventions diagnostiques et thérapeutiques. Aux extrêmes de la vie, chez le nourrisson et la personne âgée, la résistance aux infections est amoindrie. Les patients atteints de maladies chroniques telles que tumeurs malignes, leucémie, diabète, insuffisance rénale ou syndrome d'immunodéficience acquise, sont plus vulnérables aux infections opportunistes. Celles-ci sont dues à des agents normalement inoffensifs, comme ceux qui font partie de la flore bactérienne humaine normale, mais qui peuvent devenir pathogènes lorsque les défenses immunitaires sont affaiblies. Les médicaments immunosuppresseurs ou l'irradiation peuvent

abaisser la résistance aux infections. Les lésions de la peau ou des muqueuses permettent aux micro-organismes d'échapper aux mécanismes naturels de défense. La malnutrition constitue également un risque (Komedjina, 2019).

I.7.3. Facteurs environnementaux

Les établissements de santé constituent un environnement dans lequel se trouvent rassemblées des personnes infectées et des personnes chez lesquelles le risque d'infection est accru. Les patients atteints d'infections ou porteurs de micro-organismes pathogènes, lorsqu'ils sont hospitalisés, sont des sources potentielles d'infection pour les autres patients et pour le personnel. Ceux qui contractent une infection à l'hôpital constituent à leur tour une source d'infection. Les hôpitaux surpeuplés, les fréquents transferts de patients d'un service à l'autre et la concentration, dans un même secteur, de patients hautement vulnérables à l'infection tels que les nouveau-nés, les brûlés ou les patients en unités de soins intensifs, sont des facteurs qui contribuent tous au développement d'infections nosocomiales. Les germes présents dans la flore microbienne peuvent contaminer des objets, des dispositifs médicaux et des substances qui entrent ensuite en contact avec des sites anatomiques vulnérables. De plus, de nouvelles infections associées à des bactéries, par exemple des bactéries véhiculées par l'eau et/ou à des virus ou des parasites sont régulièrement identifiées (Komedjina, 2019).

I.8. Agents responsables des infections nosocomiales

Les infections nosocomiales impliquent tous les types de sources d'infection, les origines bactériennes la plus courante, occasionnellement fongique, virale ou parasite (Assous *et al.*, 1999).

I.8.1. Champignons et parasites

De nombreux champignons comme *Candida albicans*, *Aspergillus*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptosporidium* et parasites comme *Giardia*, sont des agents pathogènes opportunistes des infections, causées par une antibiothérapie prolongée et une immunosuppression sévère (Komedjina, 2019).

I.8.2. Virus

De nombreux virus ont le potentiel de se propager dans les hôpitaux, en particulier ceux de l'hépatite B et C par transfusion sanguine, dialyse, injections et endoscopie. Les virus respiratoire syncytial, *Rotavirus* et Entérovirus sont transmis par voie orale. D'autres virus tels que le cytomégalovirus, VIH, Ebola, la grippe, le virus de l'herpès et le virus varicelle-zona sont également contagieux (Komedjina, 2019).

I.8.3. Bactéries

I.8.3.1. Bactéries symbiotiques

Ces bactéries sont présentes dans la flore normale chez les sujets sains ([Tableau.01](#)). Elles jouent un rôle protecteur important, certaines bactéries symbiotiques peuvent causer des infections nosocomiales si le système de défense immunitaire de l'organisme hôte est affaibli. Par exemple : *Staphylococcus* provoque une infection du cathéter vasculaire, *Escherichia coli* est la cause la plus fréquente des infections des voies urinaires ([Ducel et al., 2002](#)).

I.8.3.2. Bactéries pathogènes

Les bactéries pathogènes ont une virulence élevée et provoquent une infection, quel que soit le statut immunitaire. Par exemple : les bactéries anaérobies à Gram positif tel que *Clostridium* provoquent la gangrène. Les bactéries à Gram positif tel que *Staphylococcus aureus* colonisent la peau et nez du personnel hospitalier et des patients, elles provoquent diverses infections pulmonaires, os, cœur et sang et deviennent souvent résistants aux antibiotiques. Aussi le Streptocoque β -hémolytique un agent pathogène important. Aussi les bactéries à Gram négatif tel que *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Serratia marcescens* peut coloniser certaines parties de l'hôte, est causé une infection grave. Les micro-organismes à Gram négatif tels que *Pseudomonas* est souvent isolé dans l'eau et les zones humides. Ils peuvent coloniser le tube digestif des patients hospitalisés ([Ducel et al., 2002](#)).

Tableau 01 : Bactéries responsables des infections nosocomiales ([Figarella et al., 2007](#)).

Bactérie responsable	Localisation	Réservoir	Transmission	Fréquence
<i>Staphylococcus aureus</i>	Plaies, peau, sang	Peau, nez	Mains, air ambiant, cathéters	10 %
<i>Staphylococcus coagulase</i>	cathéters, sang	Peau, nez	Mains, air ambiant, cathéters	02 %
<i>Entérocoques</i>	Urines, Plaies	intestin	Mains, sondes urinaires	09 %
<i>Escherichia coli</i>	Urines, sang	intestin	Mains, sondes urinaires	19 %
<i>Klebsiella</i>	Appareil respiratoire	intestin	Mains, liquides	08 %
<i>Entérobacter</i>	Plaies	intestin	Mains, liquides	04 %
<i>Proteus</i>	Urines	intestin	Mains, liquides	07 %
<i>Pseudomonas</i>	Urines, sang, plaies, appareil respiratoire	Milieus humides	Materiel medical, mains	09 %

I.9.Prévention des infections nosocomiales

I.9.1. Antiseptie

C'est l'ensemble des méthodes et moyens destinés à prévenir l'infection en détruisant ou en inhibant la croissance des micro-organismes sur les tissus vivants ou les objets inanimés en utilisant des procédés physiques ou chimiques. Les antiseptiques sont des substances chimiques permettant d'inhiber ou de tuer les microorganismes des tissus vivants. Les mycobactéries et les spores résistent à la plupart des antiseptiques. Les principaux antiseptiques sont : l'alcool éthylique, l'iode, le peroxyde d'oxygène (Dembele, 2020).

I.9.2. Asepsie

L'asepsie est l'absence de tout germe microbien de tout élément susceptible de produire la putréfaction ou l'infection. Elle est aussi définie comme l'ensemble des moyens visant à empêcher la contamination d'objet, de substance, d'organisme ou de locaux. La réalisation de l'asepsie nécessite un travail d'équipe et comporte la décontamination, la désinfection et la stérilisation (Diakite, 2008).

I.9.3. Choix de l'antibiotique

L'antibiotique sélectionné doit être actif sur les bactéries les plus fréquemment responsables d'infections du site opératoire. De manière générale, des antibiotiques bien tolérés et peu coûteux seront choisis. Lors de situations particulières ou d'allergie, une consultation d'infectiologie pour le choix d'une prophylaxie antibiotique péri-opératoire individualisée est recommandée (Dembele, 2020).

I.10.Principes généraux de prévention pour les hôpitaux

I.10.1. Bâtiments

Ils doivent être dans les normes par leurs surfaces, leurs aérations. Ils doivent être nettoyés matin et soir avec des désinfectants à la serpillière sans balayage préalable. Le sol de la salle d'opération est nettoyé après chaque intervention avec de l'eau de javel diluée, l'ensemble du bloc est lavé avec une solution désinfectante à la fin de chaque semaine. (Dembele, 2015).

I.10.2. Personnel

Il faut insister sur la formation et l'éducation du personnel socio-sanitaire dans le respect strict des règles d'hygiène et de fonctionnement des services. Il est important d'établir des mises à jour concernant les effets indésirables liés à l'hospitalisation. Les

principes de l'hygiène des mains permettent de diminuer la flore bactérienne présente sur les mains (Dembele, 2015).

I.10.3. Déchet

A l'hôpital, les circuits propres et sales doivent être clairement individualisés et distincts. Tous les objets piquants et tranchants doivent être jetés dans des conteneurs spéciaux. Les déchets d'activité de soins à risque infectieux sont éliminés dans des récipients spéciaux et suivent une filière spécifique de ramassage et de transport visant à une incinération ou à un enfouissement. L'emballage, le ramassage, le transport et les modalités d'incinération font l'objet d'une réglementation très précise (Samou Fasto, 2005).

Chapitre II

Matériel et Méthodes

Les manipulations ont été réalisées au niveau du laboratoire de microbiologie de l'université de Guelma. L'ensemble des milieux de cultures, réactifs, instrument et appareillages seront cités au fur et à mesure de leurs utilisations.

II.1. Isolement de la flore bactérienne

Les prélèvements ont été faits par passage direct d'écouvillons stériles imbibés d'un bouillon nutritif sur les poignets des chaises de la salle de réception d'une polyclinique (Wilaya d' Annaba). Les écouvillons sont étiquetés puis transporté au laboratoire de microbiologie de l'université. Pour étudier les bactéries, il est indispensable d'isoler et d'en faire une culture pure, nous avons fait un enrichissement à partir des écouvillons dans un bouillon nutritif, l'incubation a été faite à 37 °C pendant 24 heures. Cinq milieux de culture ont été utilisés pour l'isolement de la flore bactérienne (Larpent, 1997) :

- **Gélose Mac Conkey** : C'est un milieu sélectif pour l'isolement des Entérobactéries, elle permet l'élimination de la flore secondaire grâce à l'action de deux inhibiteurs : le cristal violet (inhibiteur de la flore à Gram positive) et les sels biliaires (sélection des Entérobactéries).
- **Gélose Hektoen** : C'est un milieu de choix pour l'isolement des Entérobactéries pathogènes, ce milieu permet une première orientation quant à l'identification de l'espèce isolée sur la base de l'attaque de trois glucides : lactose, salicine, saccharose. Une différenciation supplémentaire (présence de thiosulfate et de citrate de fer dans le milieu) qui se traduit par des colonies à centre noir dû à la formation de sulfate de fer.
- **Gélose nutritive** : C'est un milieu largement utilisé pour la culture des microorganismes peu exigeants, elle est recommandée dans de nombreuses méthodes standardisées d'analyses des aliments, des laitages, de l'eau et d'autres produits.
- **Gélose Cétrimide** : C'est un milieu largement utilisé pour l'isolement et l'identification présomptive de *Pseudomonas aeruginosa*. Le cétrimide est un ammonium quaternaire qui inhibe la croissance de la plupart des autres espèces bactériennes, l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* colore ce milieu en bleu-vert par production de pyocyanine.
- **Gélose Chapman** : c'est un milieu caractérisé par une forte concentration de chlorure de sodium, ce qui permet de sélectionner les microorganismes halophiles parmi lesquels figurent les *Staphylococcus*, mais aussi les *Micrococcus*, les *Enterococcus* et certains *Bacillus* et levures. Les souches de *Staphylococcus* forment des colonies entourées d'un halo jaune dû à l'utilisation du mannitol.

Remarque 1: L'objectif principal de cette étude été l'isolement et l'identification des germes responsables des infections nosocomiales et de déterminer les mesure préventif pris

par l'équipe soignante. Malheureusement, notre travailler n'a pas été achevé à cause de l'émergence du Corona virus et la période de confinement entre Janvier et Février 2022. Les souches bactériennes ont été apportées sur gélose inclinée.

Remarque 2 : A l'exception de la gélose Chapman, tous les milieux de culture ont indiqué une croissance bactérienne.

II.2. Purification de la flore bactérienne

Après incubation nous avons effectué la purification, qui consiste à effectuer des repiquages successifs jusqu'à l'obtention de colonies pures bien distinctes et homogènes. La purification des souches sur milieu gélosé a été faite selon la méthode des stries ([Joffin et Leyral, 2006](#)).

II.3. Identification de la flore bactérienne

Après incubation nous avons effectué l'identification des espèces bactérienne, les étapes de l'identification sont comme suit :

II.3.1.Examen macroscopique

Pour les examens macroscopiques des bactéries, l'observation des colonies a été faite à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe binoculaire, chaque espèce bactérienne développe une colonie de taille, de forme, de couleur et de consistance caractéristique ([Singleton, 1999](#)). L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé, pour chaque colonie distincte nous avons noté les caractéristiques suivantes : la taille, l'aspect de la surface et la couleur ([Rouaiguia, 2014](#)).

II.3.2. Examen microscopique

La coloration de Gram permet de déterminer deux grands groupes bactériens (Gram positif et Gram négatif), elle nous permet aussi de reconnaître la morphologie et le mode de regroupement de bactéries, les étapes de la méthode sont comme suivant ([Joffin et Leyral, 2006](#)).

- **Préparation du frottis bactérien :** Prélever la colonie bactérienne à identifier et l'étaler sur une goutte d'eau physiologique puis le fixer par simple passage sur la flamme du bec bensen.
- **Coloration au Violet de Gentiane:** Chaque frottis fixé est coloré pendant une minute au Violet de Gentiane puis laver à l'eau courante.
- **Mordantage :** Traiter durant une minute la lame par une solution de Lugol, puis laver à l'eau courante.
- **Décoloration :** Faire couler l'éthanol durant 10 seconds sur la lame puis laver immédiatement à l'eau courante. À ce stade les cellules à Gram négatives seront incolores, les cellules à Gram positives restent violettes.

- **Recoloration** : Faire traiter la lame durant 30 secondes à une courte coloration par la fuchsine, puis rincer et sécher la lame entre deux feuilles de papier buvard propres.
- **Lecture** : Examiner le frottis au microscope optique en ajoutant une goutte de l'huile à immersion (au Gx100). Les bactéries à Gram positif sont colorées en violet alors que les bactéries à Gram négatif sont colorées en rose.

II.3.3. Recherche de l'oxydase

Ce test est à la base de l'identification des bactéries à Gram négatif, il permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N-diméthylparaphénylène diamine, les étapes sont comme suit ([LFNF, 2002](#)) :

❖ Technique

- Déposer un disque pré-imprégné par le réactif le N-diméthylparaphénylène diamine (disque oxydase) sur une lame propre.
- Imbiber le disque d'une goutte d'eau distillée stérile.
- Déposé au-dessus une colonie à l'aide d'une pipette Pasteur.
- Etaler la colonie sur le disque.
- Attendre 3 à 5 secondes.

❖ Lecture

- Si la colonie prend une teinte rose, violette, le germe possède une oxydase (Oxydase positif).
- Si la colonie reste incolore, le germe ne possède pas d'oxydase (Oxydase négatif).

II.3. 4. Recherche de la catalase

Cette enzyme empêche en effet l'accumulation d' H_2O_2 et le dégrade en H_2O et O_2 , ce test est à la base de l'identification des bactéries à Gram positif les étapes sont comme suit ([Rodier, 1996](#)) :

❖ Technique

- Sur une lame propre et sèche déposer une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes.
- À l'aide d'une pipette Pasteur ajouter la souche bactérienne.

❖ Lecture

- Dégagement immédiat de bulles gazeuses indique un test positif.
- Absence de dégagement de bulles gazeuses indique un test négatif.

II.3.5. Identification biochimique par la galerie classique

II.3.5.1. Recherche du nitrate réductase

La nitrate réductase est une enzyme qui catalyse la réduction des nitrate en nitrites, les étapes de la méthode sont comme suit (Delarras, 2000) :

❖ Technique

- Inoculer le bouillon nitrate avec une suspension bactérienne.
- Incuber à l'étuve à 37 °C pendant 48 heures.
- La mise en évidence de l'apparition des nitrites est réalisée par l'addition de 3 gouttes d'acide parasulfanilique (NIT I), puis 3 gouttes d'alpha naphthylamine (NIT II).

❖ Lecture

- Si le milieu prend une coloration rouge : Présence de nitrites, donc la bactérie possède un nitrate réductase.
- Si le milieu reste incolore, on ajoute alors, la poudre de zinc :
- Si la coloration est rouge, cela indique que la bactérie ne possédait pas cette enzyme.
- Absence de coloration, cela indique que les nitrates ont été transformés par la bactérie au-delà des nitrites, la bactérie possède cette enzyme et en plus de nitrite réductase.

II.3.5.2. Utilisation du citrate comme seule source de carbone

Le milieu Citrate de Simmons est un milieu solide en pente, ne contenant aucune autre source de carbone que le citrate, les autres constituants étant les ions minéraux indispensables, les étapes de la méthode sont comme suit (Joffin et Leyral, 2006) :

❖ Technique

- Ensemencée la pente du milieu Citrate de Simmons par des stries longitudinales.
- Incuber à l'étuve durant 24 heures à 37 °C.

❖ Lecture

- Virage de milieu vers le bleu (alcalinisation de milieu), indique que la bactérie utilise le citrate comme seule source de carbone (Citrate +).
- Le milieu reste vert, indique que la bactérie n'est pas capable d'utiliser le citrate comme seule source de carbone (Citrate -).

II.3.5.3. Production de l'acétoïne

On étudie la formation de l'acétyl méthyl carbinol (A.M.C. ou acétoïne) soit à partir de deux molécules d'acide pyruvique, soit à partir du glucose, les étapes de la technique sont comme suit (Delarras, 2003) :

❖ **Technique**

- Inoculé le bouillon Clark et Lubs avec une suspension bactérienne.
- Incuber à l'étuve à 37 °C pendant 48 heures.

❖ **Lecture**

- Après incubation, ajouter 2 à 3 gouttes de VP I (alpha naphthol) et attendre 10 min puis ajouter 2 à 3 gouttes de VP II (une solution de soude).
- Virage du milieu vers le rouge indique la présence d'acétoïne, issu de la fermentation du glucose par la voie butylène glycolique avec production (VP⁺).
- Le milieu reste jaune indique l'absence d'acétoïne, donc il n'a pas de fermentation du glucose par la voie butylène glycolique (VP⁻).

II.3.5.4. Mise en évidence de la voie des fermentations des acides mixtes

Le milieu de Clark et Lubs permet de différencier les *Enterobacteriaceae* avec les réactions au rouge de méthyl et de Voges-Proskauer. Le rouge de méthyl différencie le processus de fermentation, il est jaune au-dessus d'un pH de 6,3 et rouge en dessous de 4,2. La production d'acetyl méthyl carbinol se révèle par l'apparition d'une coloration rouge en surface du milieu, les étapes de la technique sont comme suit (Joffin et Leyral 2006) :

❖ **Technique**

- Inoculer le milieu Clark et Lubs.
- Incuber à l'étuve à 37 °C pendant 48 heures.

❖ **Lecture**

- Après incubation, ajouter 2 à 3 gouttes de rouge de méthyl.
- Virage du milieu vers le rouge, indique la fermentation du glucose par la voie des acides mixtes (RM⁺).
- Le milieu reste jaune, indique l'absence de la fermentation du glucose par la voie des acides mixtes (RM⁻).

II.3.5.5. Dégradation du mannitol

Le milieu Mannitol-mobilité est un milieu complexe utile pour l'identification des entérobactéries, il permet d'étudier en plus de la dégradation du mannitol la mobilité. Les étapes de la technique sont comme suit (Joffin et Leyral, 2006) :

❖ **Technique**

- Ensemencer le milieu mannitol-Mobilité par piqure centrale à l'aide d'un fil droit.
- Incuber à l'étuve à 37 °C pendant 24 heures.

❖ Lecture

- Apparition d'une couleur rouge, indique l'absence de la fermentation du mannitol.
- Apparition d'une couleur jaune, indique la fermentation du mannitol.
- Absence de diffusion en voile, indique que la bactérie est immobile.
- Diffusion et formation d'un voile autour de la pique, indique que la bactérie est mobile.

II.3.5.6. Production de l'uréase

Le milieu urée-indole est un milieu synthétique complexe fournissant un ensemble de résultats utiles à l'identification des entérobactéries et autres bactéries, les étapes de la technique sont comme suit (Joffin et Leyral 2006) :

❖ Technique

- Inoculé le milieu urée-indole avec une suspension bactérienne.
- Incuber à l'étuve à 37 °C pendant 24 heures.

❖ Lecture

- Virage de la couleur vers le rose / rouge, traduit une alcalinisation du milieu du à l'hydrolyse de l'urée (Uréase +).
- Absence de virage, indique l'absence de l'hydrolyse de l'urée (Uréase -).

II.3.5.7. Production d'indole

Le milieu eau peptonée exempte d'indole est un milieu synthétique complexe utile à l'identification des entérobactéries et autres bactéries, il permet de déterminer la capacité d'un organisme à produire de l'indole à partir de la dégradation de l'acide aminé tryptophane. Les étapes de la technique sont comme suit (Joffin et Leyral 2006) :

❖ Technique

- Inoculé le milieu eau peptonée exempte d'indole avec une suspension bactérienne.
- Incuber à l'étuve à 37 °C pendant 24 heures.
- Ajouter 0,5 ml (5 gouttes) de réactif de Kovác et agiter doucement
- Examiner la couche supérieure de liquide après environ 1 min.

❖ Lecture

- Apparition d'un anneau rouge traduit la présence d'indole issu de la dégradation du tryptophane par la tryptophanase (Indole +).
- Absence d'un anneau rouge traduit l'absence de production d'indole (Indole -).

II.3.5.8. Production du tryptophane désaminase (TDA)

La tryptophanase est un complexe multienzymatique permettant aux micro-organismes de produire de l'indole à partir du tryptophane, les étapes de la technique sont comme suit (Joffin et Leyral, 2006) :

❖ Technique

- Faire une suspension bactérienne dans le milieu urée-indole.
- Incuber à l'étuve à 37 °C pendant 24 heures.

❖ Lecture

- Après incubation, ajouter quelque goutte du réactif de chlorure de fer III, puis lire immédiatement.
- Apparition d'un précipité brun, indique la présence d'acide indole pyruvique issu de la désamination du tryptophane (TDA +).
- Absence de précipité brun, indique l'absence d'acide indole pyruvique issu de la désamination du tryptophane (TDA -).

II.3.5.9. Production de la β -galactosidase

La recherche de la β -galactosidase est un des premiers tests enzymatiques réalisés en pratique courante, il est particulièrement important pour les entérobactéries à la mesure de la place du lactose dans l'étude de ces bactéries, les étapes de la technique sont comme suit (Joffin et Leyral 2006) :

❖ Technique

- Faire une suspension dense dans de l'eau distillée stérile.
- Déposer un disque d'ONPG.
- Placer au bain d'eau à 37 °C durant 30 minutes.

❖ Lecture

- Coloration jaune traduit l'hydrolyse de l'ONPG, du à la présence de la β -galactosidase.
- Absence de coloration jaune, indique l'absence d'hydrolyse de l'ONPG.

II.3.5.10. Fermentation des sucres avec ou sans gaz et production d'H₂S

Le milieu TSI est utilisée pour l'identification présomptive des entérobactéries basée sur la fermentation des sucres (glucose, lactose et saccharose), la production de gaz et d'H₂S, les étapes de la technique sont comme suit (Delarras, 2000) :

❖ Techniques

- Ensemencement de la pente du milieu TSI par stries et le culot par une pique centrale.
- Incuber à l'étuve à 37 °C pendant 24 heures.

❖ **Lecture**

- Appariation d'une pente jaune, indique la fermentation du lactose et /ou du saccharose.
- Appariation d'un culot jaune, indique la fermentation du glucose.
- Appariation d'un noircissement, indique la production d'H₂S.
- Appariation de bulles gazeuses, indique la production du gaz.

II.3.5.11. Production de pyocyanine et pyoverdine

La gélose King A est utilisée pour la caractérisation des *Pseudomonas* par la mise en évidence de la production de pyocyanine. La gélose King B est utilisée pour la caractérisation des *Pseudomonas* par la mise en évidence de la production de fluorécéine (pyoverdine). Les étapes de la technique sont comme suit (Joffin et Leyral 2006) :

❖ **Techniques**

- Ensemencer les milieux King A et King B avec une goutte d'une suspension bactérienne.
- Incubation à 37 °C pendant 24 heures.

❖ **Lecture**

- Observer la présence de pigment diffusant dans la gélose sur la pente et noter sa couleur.
- Une couleur bleue sur King A, indique la présence de pyocyanine.
- Une couleur jaune-vert fluorescent sur King B, indique la présence de pyoverdine.
- Aucune coloration, indique l'absence de la production de pyocyanine et pyoverdine.

II.3.5.12. Identification

L'ensemble des résultats obtenus vont servir pour l'identification des bactéries à l'aide d'une matrice de calcul réalisé par J-Noël Joffin.

II.2.6. Identification biochimique par la galerie miniaturisée

Pour l'identification des bactéries nous avons utilisé 2 types de galeries biochimiques miniaturisées :

- Galerie API 20E pour l'identification des entérobactéries.
- Galerie API 20NE pour l'identification des bactéries à Gram négatif non entérobactéries.

II.2.6.1. Galerie biochimique miniaturisé API 20E

La galerie API 20E comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydraté, les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanées ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture se fait à l'aide de la table de lecture ([Annexes](#)). Le dosage a été réalisé selon le mode opératoire proposé par l'API dont les étapes sont comme suit :

❖ Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

❖ Préparation de l'inoculum

- Faire une suspension bactérienne dans un tube d'eau distillée stérile, d'opacité légère avec une seule colonie prélevée sur un milieu gélosé.

❖ Inoculation de la galerie

- Remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne.
- Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Remplir uniquement les tubes des autres tests.
- Refermer la boîte d'incubation et la placer à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

❖ Lecture

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés, sauf certaines sont révélées par l'addition de réactifs :

- **VP** : Ajouter les réactifs (VP I + VP II) puis attendre 10 min, une couleur rose rouge indique une réaction positive.
- **TDA** : Ajouter le réactif TDA, une couleur marron foncé indique une réaction positive.
- **IND** : Ajouter le réactif de Kovacs puis attendre 2 min, un anneau rouge apparaît indique une réaction positive.
- **NO₂** : Ajouter les réactifs (NIT I + NIT II) puis attendre 2 à 3 min, une coloration rouge indique une réaction positive (NO₂⁻). Une réaction négative (coloration jaune) peut être due à la production d'azote, alors ajouter 2 à 3 mg de la poudre de zinc dans la cupule du GLU. Après 5 minutes, si la couleur resté jaune, cela indique une

réaction positive (N_2). Si la couleur est orange-rouge, la réaction est négative, les nitrates sont encore présents.

La lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture (**Annexes**), Les tests sont regroupés en groupe de 3 et une valeur de 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. Additionner à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs. On obtient un nombre de 7 chiffres qui sert de code d'identification (**Guiraud, 2003**). Le code numérique obtenu permet d'identifier la souche étudié en se référant au logiciel d'identification **API web™**.

II.2.6.2. Galerie biochimique miniaturisé API 20 NE

Le principe et la préparation de la galerie API 20 NE est similaire à celui décrite pour la galerie API 20 E, à l'exception de certaines différences :

- Remplir uniquement les tubes des tests NO_3 à PNPG,
- Créer une anaérobiose dans les tests : GLU, ADH, URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Remplir les tubes et les cupules des tests GLU à PAC avec la suspension bactérienne.

II.2.6.3. Lecture et interprétation des résultats

Après incubation, noter sur les fiches des résultats de toutes les réactions spontanées. Réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs. L'ensemble des résultats obtenus vont servir pour l'identification des bactéries à l'aide d'un logiciel d'identification **API web™**.

II.3. Conservation des souches bactériennes

Toutes les souches identifiées ont été conservés par ensemencement en stries sur une gélose nutritive ou Chapman incliné (**Guiraud, 2005**).

Chapitre III

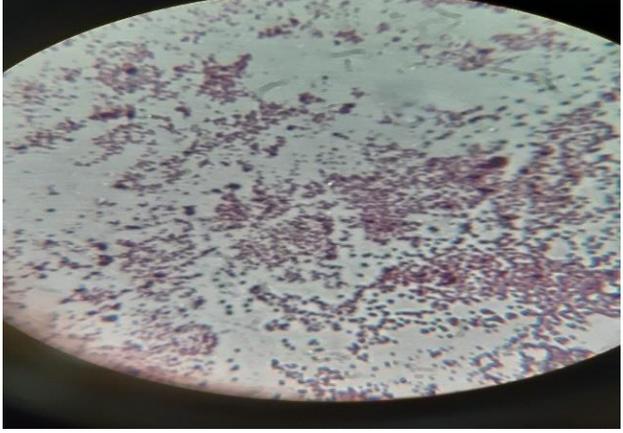
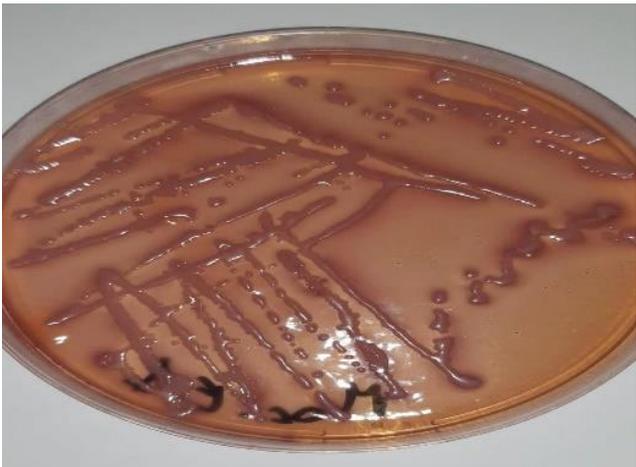
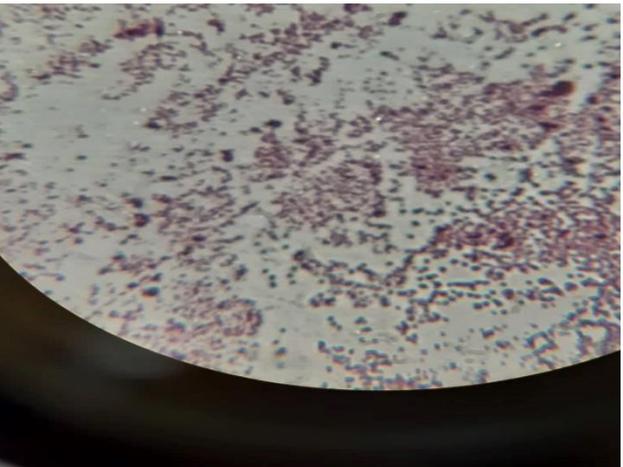
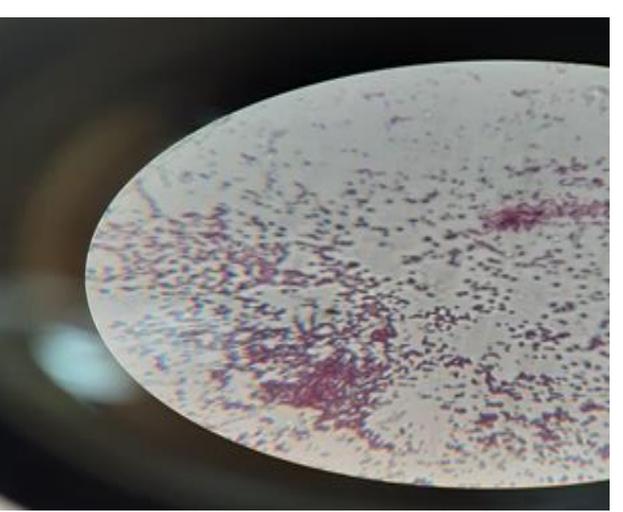
Résultats et discussion

III.1. Examens macroscopiques et microscopiques

Les aspects macroscopiques et microscopiques des colonies bactériennes qui ont été isolées et purifiées à partir des différents milieux de culture sont représentés dans le [tableau 02](#) et les photos présent dans la [figure 03](#).

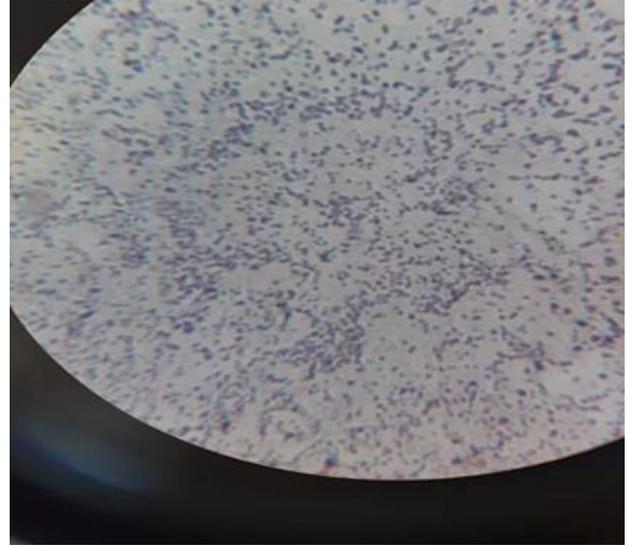
Tableau 02 :Aspect macroscopique et microscopique des colonies bactériennes.

Géloses	Code	Observation	
		Macroscopique	Microscopique
Cétrimide	P1	Petites colonies de couleur bleu-vert	Bacilles à Gram négatif
	P2	Absence de colonies	/
	P3	Absence de colonies	/
Hektoen	K1	Colonies muqueuses bombées d'un diamètre de 2 à 3 mm de couleur saumon.	Bacilles à Gram négatif
	K2	Colonies muqueuses bombées d'un diamètre de 2 à 3 mm de couleur saumon.	Bacilles à Gram négatif
	K3	Absence de colonies	/
Mac Conkey	E1	Petites colonies plates de couleur rose à rouge entourée d'une zone rose foncé.	Bacilles à Gram négatif
	E2	Petites colonies plates de couleur rose à rouge entourée d'une zone rose foncé.	Bacilles à Gram négatif
	E3	Petites colonies plates de couleur rose à rouge entourée d'une zone rose foncé.	Bacilles à Gram négatif
	K12_1	Petites colonies bombé de couleur rose entouré d'une zone foncée.	Bacilles à Gram négatif
	K12_2	Petites colonies bombé de couleur rose entouré d'une zone foncée.	Bacilles à Gram négatif
	K12_3	Absence de colonies.	/

Aspect macroscopique à l'œil	Aspect microscopique au grossement Gx100
	
Souche bactérienne E1	Souche bactérienne E1
	
Souche bactérienne E2	Souche bactérienne E2
	
Souche bactérienne E3	Souche bactérienne E3



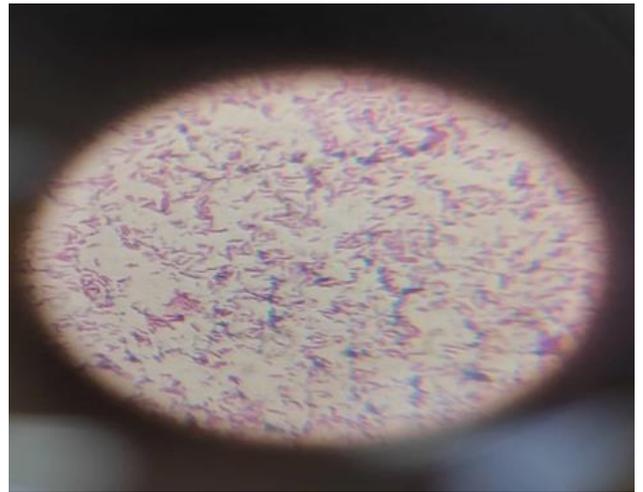
Souche bactérienne P1



Souche bactérienne P1



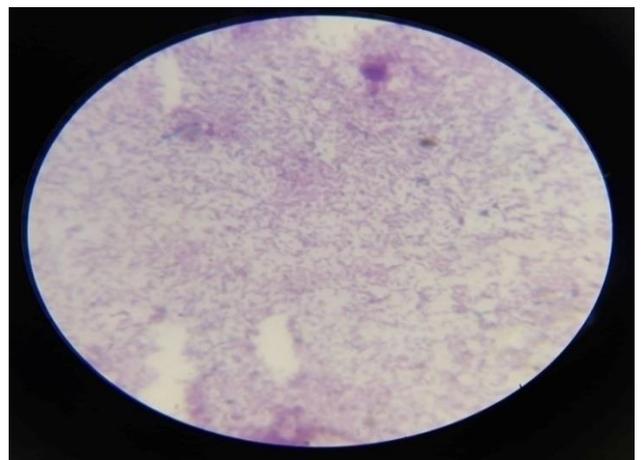
Souche bactérienne K 1



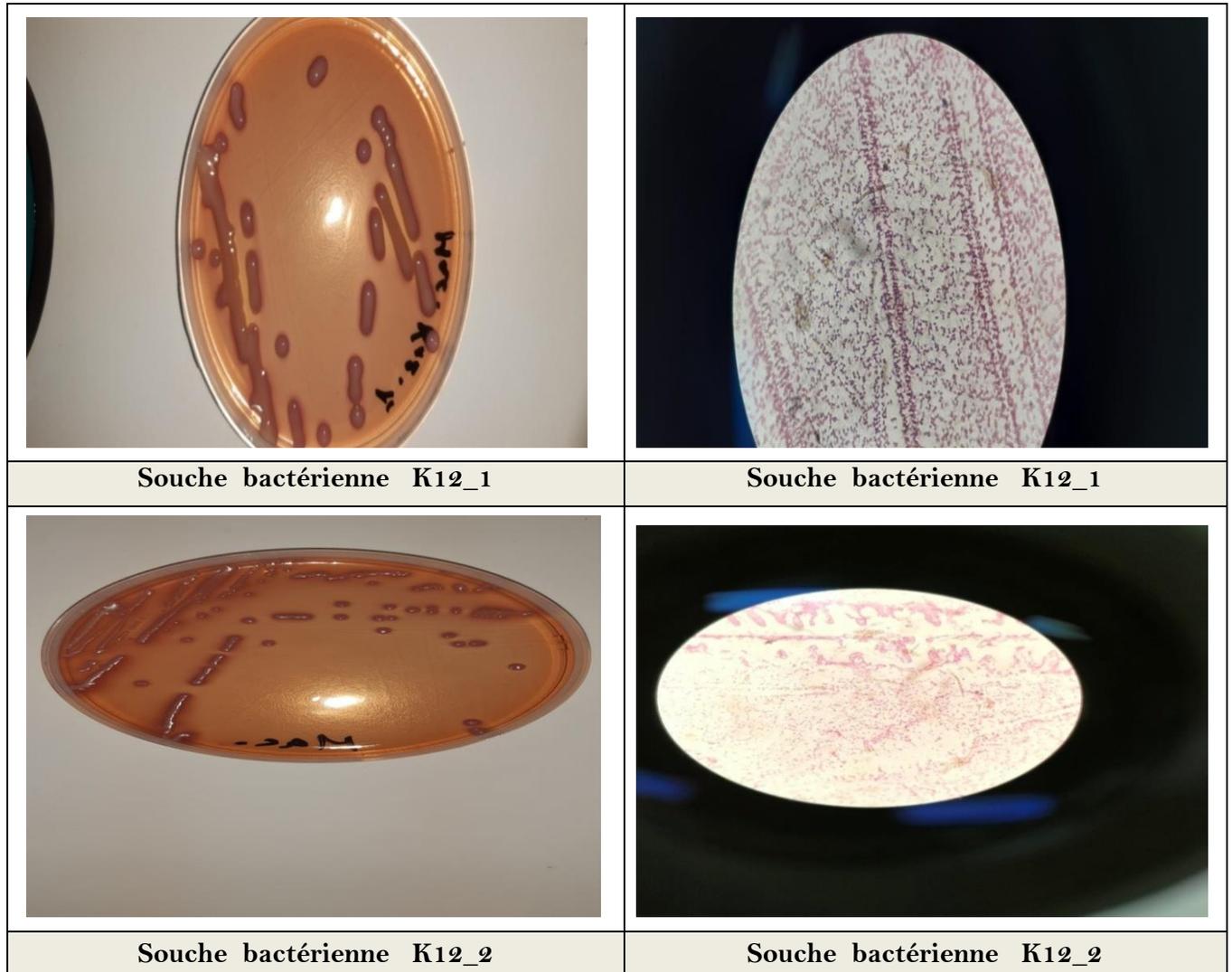
Souche bactérienne K1



Souche bactérienne K 2



Souche bactérienne K 2



Souche bactérienne K12_1

Souche bactérienne K12_1

Souche bactérienne K12_2

Souche bactérienne K12_2

Figure 03: Aspect macroscopique et microscopique des colonies bactériennes.

III.2. Recherche de l'oxydase et la catalase

Les résultats des tests de la catalase et de l'oxydase des souches isolées à sont mentionnés dans le **tableau 03** et les photos présent dans la **figure 04**.

Tableau 3: Identification de l'oxydase et de la catalase des souches isolées.

Code	Oxydase	Catalase	Code	Oxydase	Catalase	Code	Oxydase	Catalase
E1	+	+	K1	+	+	K12-1	+	+
E2	+	+	K2	+	+	K12-2	+	+
E3	+	+	/	/	/	P1	+	+

	Résultat positif	Résultat négatif
Oxydase		
Catalase		

Figure 04 : Photosprésentent des testes de l'oxydase et la catalase.

III.3. Identification biochimique par la galerie classique

Les résultats de l'identification biochimique par la galerie classique sont représentés dans le **tableau 04** les photos present dans les **figures 05** à **12**.



Figure 05 :Identification biochimique de l'espèce *Entérobacter cloacae*(E1).



Figure 06 :Identification biochimique de l'espèce *Entérobacter cloacae*(E2).



Figure 07 :Identification biochimique de l'espèce *Serratia fonticola*(E3).



Figure 08 : Identification biochimique de l'espèce *Pseudomonas luteola*(P1).



Figure 09 : Identification biochimique de l'espèce *Entérobacter cloacae*(K1).



Figure 10 : Identification biochimique de l'espèce *Aeromonashydrophila*(K2).



Figure 11 : Identification biochimique de l'espèce *Enterobacter aerogenes* (K12_1).

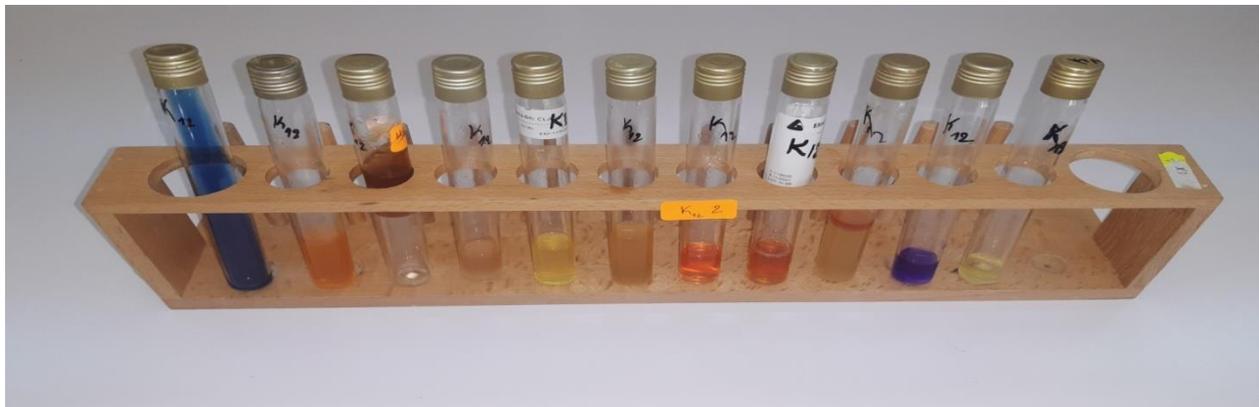


Figure 12 : Identification biochimique de l'espèce *Aeromonas hydrophila* (K12_2).

Tableau 04: Résultats des testes biochimiqueclassique des souchesisolées.

Code	TSI					Citrates de Simmons	Mannitol mobilité		Urée indole		Clarck et Lubs		ONPG	Nitrate réductase	Nitrite réductase	Production l'indole	Identification
	H ₂ S	Gaz	Glu	Sac	Lac		MAN	MOB	URE	TDA	VP	RM					
E1	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>Entérobactercloaceae</i>
E2	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>Entérobactercloaceae</i>
E3	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	<i>Serratiafonticola</i>
K12-1	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>Enterobacteraerogenes</i>
K12-2	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>Aeromonashydrophila</i>
K1	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
K2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	<i>Aeromonashydrophila</i>
P1	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	<i>Pseudomonas uteola</i>

III.4. Identification biochimique par la galerie miniaturisée

Les résultats de l'identification biochimique par les API sont représentés dans les **tableaux 05 et 06** et les photos présent dans les **figures 13 à 21**.



Figure 13: Profilbiochimique de l'espèce *Entérobacter cloacae* (E1)



Figure 14: Profilbiochimique de l'espèce *Entérobacter cloacae* (E2).



Figure 15: Profilbiochimique de l'espèce *Serratia fonticola* (E3).



Figure 16 : Profilbiochimique de l'espèce *Pseudomonas luteola* (P1).



Figure 17 : Profilbiochimique de l'espèce *Entérobacter cloacae* (K1).



Figure 18: Profilbiochimique de l'espèce *Aeromonas hydrophila* (K2).



Figure 19 : Profilbiochimique de l'espèce *Enterobacter aerogenes* (K12_1).



Figure 20 : Profilbiochimique de l'espèce *Aeromonashydrophila*(K12_2).

III.5 Production de Pyocyanine et Pyoverdine

L'observation des milieux King A et King B indique incoloration des tubes, c'est à dire l'absence de production de pyocainine et pyoverdine



Figure 21: Absence des pigment sur milieu King A et King B

Tableau 05 : Résultat de l'identification biochimique des souches isolées par l'API 20 E.

Code	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO ₂	N ₂	MOB	Identification
E1	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>Enterobactercloaceae</i>
E2	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>Enterobactercloaceae</i>
E3	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>Serratiafonticola</i>
K12-1	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>Enterobacteraerogenes</i>
K12-2	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>Aeromonashydrophila</i>
K1	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
K2	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>Aeromonashydrophila</i>

Tableau 06: Résultat de l'identification biochimique des souches isolées par l'API 20 NE.

Code	NO ₃	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	OX	Identification
P	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas luteola</i>

Sur l'ensemble des prélèvements réalisés, seul le milieu Chapman n'a indiqué aucune croissance. Tous les autres milieux ont indiqué des croissances bactériennes. Nous avons retrouvés des bactéries à Gram négatives. Les Enterobactéries et le genre *Pseudomonas* sont de plus en plus reconnus comme des agents pathogènes importants, porteurs de multiples gènes de résistance aux antibiotiques et provoquant des infections nosocomiales chez les patients humains. La principale source d'infection bactérienne ne peut être déterminée, mais puisque ils sont naturellement présent chez l'Homme et dans l'environnement (Rissi et al., 2015). Habituellement, les agents pathogènes les plus importants liés aux causes des infections nosocomiales sont les bactéries du genre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella* et les espèces d'*Enterobacteriaceae* (Suksatan et al., 2022).

Sur la base de résultats d'études différentes dans les pays développés, l'incidence de l'infection nosocomiale dans les services réguliers et les unités de soins intensifs est de 5-15% et 50% respectivement (Suksatan et al., 2022). Les travaux de Siah et al., (2009), on indiqué que le staphylocoque était le germe le plus fréquemment rencontré, suivi de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter* et *Proteus mirabilis*. Par contre, dans l'enquête d'Atif et al., (2006) menée en Algérie, les bacilles à Gram négatif représentent les germes les plus fréquemment trouvés (77,2 %), et *Pseudomonas aeruginosa* est de loin, le germe le plus souvent en cause (21,1 %).

Conclusion et perspectives

A cours des résultats obtenus, il ressort que :

- Les souches isolées et identifiées sont des bactéries à Gram négatives.
- Aucune bactérie à Gram positive n'a pu être isolée.
- Les souches bactériennes isolées et identifiées appartiennent à famille des *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* et *Aeromonadaceae* . Cela indique, que le risque d'infection nosocomiale est toujours présent et constitue un grand problème pour la santé publique.

En perspectives, il serait judicieux de :

- Déterminer les mesures préventives pris par l'équipe soignante.
- Recherche de bactéries résistantes aux antibiotiques.
- Il est impératif de suivre des stratégies efficaces pour combattre et prévenir ce fléau et de respecter toutes les règles d'hygiène, pensez donc à la formation continue des équipes médicales et à la sensibilisation des patients et des visiteurs.

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

- Amazian, K., Rossello, J., Castello, A., Sekkat, S., Terzaki, S., Dhidah, L., Abdelmoumene, T., Fabry, J., 2010.** Prévalence des infections nosocomiales dans 27 hôpitaux de la région méditerranéenne. *La Revue de la Sante de la Méditerranée Orientale*. 10 : 1070-1078.
- Assous, V., Basse, L., Bourhy, H., Dhote, R., Paugam, A., 1999.** Microbiologie et Pathologie infectieuse. Edition De Boeck Université. Paris. p.993.
- Atif, M.L., Bezzaoucha, A., Mesbah, S., Djellato, S., Boubechou, N., Bellouni, R., 2006.** Évolution de la prévalence des infections nosocomiales dans un centre hospitalier universitaire en Algérie (2001 à 2005). *Médecine et maladies infectieuses*. 36 : 423-428.
- Brucker, G., Bouvet, E., 1998.** Infection nosocomiale et environnement hospitalier. Edition Médecine, Science Flammarion. Paris. p.217. Disponible sur : <https://www.upload4ever.com>.
- Dancer, S., 2004.** How do we assess hospital cleaning? A proposal for microbiological standards for surface hygiene in hospitals. *Journal of Hospital Infection*. 56 : 10-15.
- Delarras, C., 2000.** Microbiologie de l'environnement avec législation : travaux pratique. Gaëtan Moriu Editeur. Paris. p. 231.
- Delarras, C., 2014.** Pratique en microbiologie du laboratoire. Edition Lavoisier. Paris. p.772.
- Dembele , J., 2015 .** Infections nosocomiales dans les services des maladies infectieuses du chu du point G. Thèse de doctorat, option : Faculté de Médecine et d'odontostomatologie. Université des Sciences, des techniques et des technologies de Bamako Mali. p.89. Disponible sur : <http://www.keneya.net>.
- Dembele, G., 2020.** Infection du site opératoire dans le service de traumatologie a l'hôpital de Sikasso. Thèse de doctorat, option : Faculté de Médecine et d'odontostomatologie. Université Bamako. p.93. Disponible sur : <http://www.keneya.net>.
- Ducel, G.,2002.** Prévention des infections nosocomiale : guide pratique. Organisation Mondiale de Sante. France. p .71. Disponible sur : www.apps.who.int. Consulte le : 31/01/2022.
- Figarella , J., Leyral, G.,Terret, M., 2007.** Microbiologie générale et appliquée. Edition Jacques Lanore. France. p.285
- Guiraud, J., 2003.** Microbiologie alimentaire. Edition RIA Dunod. France. p. 651.

- Haddadi, A., 2013.** Construction d'un score prédictif du risque nosocomial pour des patients de réanimation. Thèse de doctorat. Option : Epidémiologie, économie de la sante et prévention. Université du droit et la sante, Lille 2. p.122. Disponible sur :www.tel.archives-ouvertes.fr.
- Joffin, J., Leyral, G., 2006.** Microbiologie Technique 1 : dictionnaire des techniques. 3^{ème} éditions, France. p. 331.
- John Spicer, W., 2002.** Pratique clinique en bactériologie, et mycologie et parasitologie, Edition Lavoisier. Francep.220
- Kernan, W., Walter, N., 2013.** Obesity: a stubbornly obvious target for stroke prevention. Stroke. 44 : 278-286.
- Koumedjina, K., 2019.** Evaluation de la connaissance et l'application des mesures de prévention des infections nosocomiales dans le service de maladies infectieuses du C.H.U de point g. Thèse de pharmacie. Université des sciences, des techniques et de technologies de Bamako, Mali. p.112. Disponible sur :<https://www.bibliosante.ml/discover>.
- Larpent, J., 1997.** Microbiologie des eaux d'alimentaire : Technique de labo. Edition Tec et Doc. Paris. p. 1073.
- LFNF, 2002.** Light Foot Nigel Francis. Analyses microbiologiques des aliments et de l'eau. Directives pour l'assurance qualité. Paris. p.186.
- Nauciel, C., Vilde, J., 2005.** Bactériologie médical. Edition : Masson. Paris. p.272.
- Oumar Cissé, M., 2014.** Evaluation des mesures de prévention des infections nosocomiales au chu de Kati. Thèse de doctorat, option : Faculté de Médecine et d'odontostomatologie. Université Bamako. p.124. disponible sur :<http://www.keneya.net>.
- Rissi, D.R., Elsmo, E.J., Sanchez, S., 2015.** Cystitis and peritonitis caused by *Staphylococcus xyloso* infection in a calf. Brazilian Journal of Veterinary. 8 : 99- 101.
- Rodier, J., 1996.** L'analyse de l'eau ; eaux naturelles, Eaux Résiduelles, Eaux de Mer. sième édition. Paris. p.1383.
- Rouaiguia, M., 2014.** Contribution à l'étude écologique de l'Hirondelle de fenêtre *Delichon urbica* dans le Nord-Est de l'Algérie. Thèse de Doctorat, option : Santé, Eau et Environnement. Université de Guelma. Algérie. p.239.
- Samou, F., 2005.** Les infections nosocomiales dans le service de chirurgie de l'hôpital. Thèse de doctorat, option : Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie. Université du Mali. p.106. disponible sur :<http://www.keneya.net>.

- Sanogo, O., 2007.** Les infections nosocomiales en milieu de réanimation au chu Gabriel Toure. Thèse de doctorat, option : Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie. Université du Mali. p.100. disponible sur : <http://www.keneya.net>.
- Siah, S., Belefqih, R., Elouennass, M., Fouadi, F. E., & Ihrari, I., 2009.** L'infection Nosocomiale en Reanimation des Brules. *Annals of Burns and Fire Disasters*. 22 : 72.
- Singleton, P., 1999.** Bactériologie 2^{ième} cycle. 4^{ième} édition. Paris. p.415.
- Suksatan, W., Jasim, S. A., Widjaja, G., Jalil, A. T., Chupradit, S., Ansari, M. J., Mohammadi, M. J., 2022.** Assessment effects and risk of nosocomial infection and needle sticks injuries among patents and health care worker. *Toxicology Reports*. 9 : 284-292.
- Sumba, H., 2012.** Cout de l'infection nosocomiale (A propos de 50 cas). Thèse de doctorat, option : Faculté de Médecine et de pharmacie Fes. Université Sidi Mohammed Ben Abdallah. Maroc. p.105. Disponible sur : <https://cdim.fmp-usmba.ac.ma>.
- Thierry, L., 2016.** Surveillance des infections nosocomiales en réanimation : intérêt d'une approche multimodale clinico-biologique et étude d'impact. Thèse de doctorat, option : Vie et Sante, Aspects Moléculaire et Cellulaire de la Biologie. Université du Strasbourg. France. p.155. Disponible sur : <https://publication-theses.unistra.fr>.
- World Health Organization. ,2005.** Mental Health Atlas. . Organisation mondiale de sante. Geneva .P 81. Disponible sur : <https://books.google.dz/books>.
Consulte-le : 08/05/2022.
- Zeroual, Z., 2012.** Profil épidémiologique et bactériologiques des infections nosocomiales. Thèse de doctorat, option : Faculté de Médecine et de pharmacie Rabat université Mohammed V. p.171. Disponible sur : <http://ao.um5.ac.ma>.

Sites :

- [1] : <https://www.techno-science.net>. Consulté le : 29/01/2022.
- [2] : <https://www.inspq.qc.ca>. Consulté le 20/02/2022.
- [3] : <https://www.inserm.fr>. Consulté le 20/02/2022.

Annexes

Milieux utilisés

Milieux	Composition
Mac Conkey	Peptone pancréatique de gélatine..... 17,0 g
	Tryptone 1,5 g
	Peptone pepsique de viande 1,5 g
	Lactose..... 10,0 g
	Seles biliaires..... 1,5 g
	Chlorure de sodium..... 5,0 g
	Rouge neutre..... 30,0 mg
	Cristale violet..... 1,0 mg
	Agar Agar 13,5 g
	Eau distillée..... 1000 ml
	pH : 7,3
Hektoen	Protease peptone..... 2 g
	Extrait de levure..... 3 g
	Chlorure de sodium..... 5 g
	Thiosulfate de sodium..... 5 g
	Seles biliaires..... 9 g
	Citrate de fer ammoniacale..... 1,5 g
	Salicine..... 2 g
	Saccharose..... 12 g
	Fuchsine acide..... 2 g
	Lactose..... 0,1 g
	Bleu de brothynol..... 0,06 g
	Agar Agar 1,4 g
	Eau distillée..... 1000 ml
	pH=7
Gélose nutritive	Extrait de viande de l'œuf..... 1g
	Agar 15g
	Peptone 5g
	Chlorure de sodium 15g
	Extrait de levure..... 2g
	Eau distillée 1000 ml
pH = 7,4	
Chapman	Peptone trypsique de caséine..... 10 g
	Extrait de viande..... 1 g
	Chlorure de sodium..... 75 g
	Mannitol..... 10 g
	Rouge de phénol..... 0,025 g
	Agar Agar 15 g
Eau distillée..... 1000 ml	
pH=7,5	
Cétrimide	Peptone..... 20g
	Sulfate de sodium..... 10g
	Chlorure de manganésium..... 3g
	Phosphate dipotassique..... 0,3g
	Cétrimide..... 0,2g
	Acide nalidixique..... 0,015g
	Glycérol..... 10g
	Agar Agar 13g
Eau distillée 1000 ml	
pH=7,1	

TSI	Extrait de l'œuf	3 g
	Agar	12 g
	Extrait de levure.....	3 g
	Peptone.....	20 g
	Lactose.....	10 g
	Saccharose.....	10 g
	NaCl.....	5 g
	Glucose.....	1 g
	Citrate ferrique.....	3 g
	Thiosulfate de sodium.....	3 g
	Rouge de phénol.....	0,025 g
	Eau distillée.....	1000 ml
	pH = 7,4	
Citrate de Simmons	Chlore de sodium.....	5g
	Sulfate de magnésium.....	0,2g
	phosphate d'ammonium POH.....	1g
	Phosphate di potassique.....	2g
	Citrate trisodique.....	2g
	Solution de bleu bromothymol 1%.....	8g
	Agar Agar.....	15g
	Eau distillée.....	1000ml
pH = 7		
Mannitol-mobilité	Peptone pancréatique de viande.....	20 g
	Agar Agar.....	4 g
	Mannitol.....	2 g
	Nitrate de potassium.....	1 g
	Rouge de phénol solution à 1%.....	4 g
	Eau distillée.....	1000 ml
pH = 7,2		
Clark et Lubs	Peptone trypsique de caséin.....	5 g
	Phosphate di potassique.....	5 g
	Glucose.....	5 g
	Eau distillée.....	1000 ml
pH=7,5		
Urée-indole	L-tryptophane.....	3 g
	Phosphate monopotassique.....	1 g
	Phosphate de sodium.....	1 g
	Chlorure de sodium.....	5 g
	Urée.....	20 g
	Solution rouge de phénol à 1%.....	2,5 ml
	Alcool à 95°.....	10 ml
	Eau distillée.....	1000 ml
pH = 6,7		
Eau peptonée exempte d'indole	Peptone exempte d'indole	10 g
	Chlorure de sodium	0,5 g
	Eau distillée	1000 ml
pH=7,2		

Table de lecture de la galerie miniaturisée API 20 E.

Test	Groupement active	Réactions/Enzymes	Résultats	
			Négative	Positive
ONPG	Ortho-nitro-Phényle-B-D-Galactopyranoside	Beta-galactosidase	Incolore	Jaune
ADH	Arginine	Arginine désahydrolase	Jaune	Rouge/orange
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orange
ODC	Orthine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orange
CIT	Sodium citrate	Production de citrate	Vert	Bleu-vert/orange
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production de H ₂ S	Incolore	Noir
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orange
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Jaune	Marron
IND	Tryptophane	Production d'indole	Incolore	rose
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP1+VP2	
			Incolore	Rose/rouge
GEL	Gélatine emprisonnant de charbon	Gélatinase	Pas de diffusion de pigment noir	Diffusion de pigment noir
GLU	Glucose	Fermentation/oxidation	Bleu /bleu vert	Jaune/vert jaune
MAN	Mannitol	Fermentation/oxidation	Bleu/bleu vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxidation	Bleu/bleu vert	Jaune
SOR	Sorbitol	Fermentation/oxidation	Bleu/bleu vert	Jaune
RHA	Rhamnose	Fermentation/oxidation	Bleu/bleu vert	Jaune
SAC	Sucrose	Fermentation/oxidation	Bleu/bleu vert	Jaune
MEL	Mlebiose	Fermentation/oxidation	Bleu/bleu vert	Jaune
AMY	Arabinose	Fermentation/oxidation	Bleu/bleu vert	Jaune
ARA	Arabinose	Fermentation/oxidation	Bleu/bleu vert	Jaune
NO ₃ ⁻ NO ₂ ⁻	GLU tube	Production de NO ₂ Reduction N ₂	NIT1+NIT2, 2-3 min	
			Jaune	Rouge

Table de lecture de la galerie miniaturisée API 20NE.

Tests	Substrat	Enzymes / Reactions	Resultants	
			Negative	Positive
NO ₃	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrite	NIT1+NIT2/ 5 min	
			Incolore	Rose/rouge
		Réduction des nitrates en azote	ZN/ 5 min	
			Incolore	Rose
TRP	Tryptophane	Formation d'indole	TRP / 3-5 min	
				Incolore
GLU	Glucose	Fermentation	Bleu à vert	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange/rose/rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Orange/rose/rouge
ESC	Esculine	Hydrolyse	Jaune	Gris/rose/rouge
GEL	Gélatinase	Hydrolyse	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment noir
PNPG	p-Nitro-phényle- βD-galactopyranoside	B-galactosidase	Incolore	Jaune
GLU	Glucose	Assimilation	Transparence	Trouble
ARA	Arabinose			
MNE	Mannose			
MAN	Mannitol			
NAG	N-acétyl-glucosamine			
MAL	Maltose			
GNT	Gluconate			
CAP	Caprate			
ADI	Adipate			
MLT	Malate			
CIT	Citate			
PAC	Phenyl-acétate			
OX	Tetraméthyl-p-phenylène diamine	Cytochrome oxydase	Incolore	Violet