

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA  
TERRE ET DE L'UNIVERS  
DEPARTEMENT D'ECOLOGIE ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT



M/A

570. 537

M/504

## Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité : santé, eau et environnement

### Thème

L'étude microbiologique de la qualité de l'air  
hospitalier (hôpital-Hakim Okbi) -Guelma

Présenté par :

BEKAKRIA FATIMA

BENCHEIKH FATIHA

BENCHEIKH KAWTHER



Devant le jury composé de :

Président : M. BENHALIMA .L (M.A) Université de Guelma

Examineur : M. AMRI .S (M.A) Université de Guelma

Encadreur : M. BOUSSADIA.M.I (M.A) Université de Guelma

Juin 2011

## REMERCIEMENTS

*Nous tenons d'abord à remercier très fortement notre Dieu qui nous a donné la santé et nous a aidé à faire ce modeste travail.*

*Nous tenons à remercier sincèrement notre encadreur M<sup>lle</sup> BOUSSADIA M.I pour l'intérêt qu'elle nous a porté pour notre thèse, pour son aide précieuse, et sa bienveillance qui nous a beaucoup aidé et bien guidé tout au long de ce projet.*

*Nous remercions vivement également :*

- tous les membres du jury qui auront à porter le jugement nécessaire sur le contenu de notre travail*
- tous le corps professoral de notre institut qui nous ont aidés durant tout le cycle de notre formation.*

*Nous tenons également à exprimer nos reconnaissance envers tout le personnel des laboratoires, ainsi que le personnel des deux services\*réanimation médicale, bloc opératoire\* à l'hôpital HAKIM OKBI- GUELMA.*

*A tous ceux qui contribués à la réalisation de ce travail*

# SOMMAIRE

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des planches

Introduction

**Partie théorique :**

## **Chapitre 1 : présentation des infections nosocomiales**

1-Définition.....	01
2-Épidémiologie.....	01
3-Les modes de transmission.....	02
4-les formes cliniques.....	05
5-les facteurs de risque.....	06
6-Prévention.....	07

## **Chapitre 2 : la contamination de l'air hospitalier**

1 -L'air hospitalier .....	09
2 -La contamination de L'air hospitalier .....	09
3 -Les zones de risques.....	09
4 -les conditions de l'aérobiocontamination : .....	11
5 -les principaux germes aéroportés : .....	13
5-1-Les bactéries de l'air responsable d'infections nosocomiales :	
5-1-1-Les Staphylocoques .....	13
5-1-2-Streptocoques et Entérocoques :.....	15
a) . Les Entérocoques : .....	15
b) . Les Streptocoques :.....	15
5-1-3-Les entérobactéries : .....	16
5-1-4-Les Pseudomonas et germes apparentés .....	16
5-1-5- les Clostridium :.....	17
5-1-6- Autres bactéries responsables d'infections nosocomiales:	

➤ <i>Legionella</i> .....	18
➤ Mycobactéries.....	18
5.2. Les mycètes.....	19
5.2.1. Les levures.....	19
5.2.2. <i>Aspergillus</i> .....	19
5.3. Les virus.....	19
5.4. Les parasites .....	20
6. Le traitement de l'air.....	21
6.1. Les objectifs de traitement de l'air.....	21
6.1.1. Objectif de confort.....	21
6.1.2. Objectif de sécurité sanitaire.....	21
6.2. Les procédés de traitement de l'air.....	23
• Traitement mécaniques.....	23
• Traitement physique.....	24
• Traitement chimique.....	25

## Partie pratique :

### Matériel et méthodes

1- Matériel.....	26
1.1. Matériel du laboratoire.....	26
1.2. Matériel biologique.....	26
2- Méthodes du travail.....	26
1. Prélèvement.....	26
2. Pré-identifications des microorganismes .....	29
2.1 Coloration de Gram.....	29
2.2. Coloration simple (bleu de méthylène).....	29
3. Isolement et purification.....	30
4. Conservations.....	30
5- Test complémentaire.....	30
5-1-Test catalase.....	30
5-1- Test oxydase.....	31
6-Tests d'identification des microorganismes.....	31

6-1-Test mannitol –mobilité.....	31
6-2-Test de la staphylo-coagulation.....	32
6-3-Test DNase.....	33
7- Identification par systèmes API.....	34
7-1-Système API Staph.....	34
8- Détermination de la sensibilité vis-à-vis des antibiotiques.....	35

### **Résultats et discussion**

1. Aspect macroscopique des colonies.....	37
2. Examens microscopiques.....	40
2-1-coloration simple (Bleu de Méthylène).....	40
2-2-coloration différentielles (coloration de Gram).....	42
3- Enrichissement et purification.....	44
4- Identification des cocci Gram + par les tests complémentaires.....	45
5- Identification biochimique des cocci Gram +.....	48

Conclusion

Les références bibliographiques

Les annexes

Résumé

Produced with Scantopdf

## **Liste des abréviations**

<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>SNC</b>	système nerveux central
<b>HAV</b>	Hépatite A
<b>ADV</b>	Adenovirus
<b>EBV</b>	Epstein Barr
<b>HBV</b>	Hépatite B
<b>HCV</b>	Hépatite C
<b>HIV</b>	Immunodéficience humaine
<b>Nd</b>	Non déterminé
<b>HEPNC</b>	Haute efficacité vis-à-vis des particules donnant naissance à colonies
<b>PNC</b>	Les particules donnant naissance à colonies
<b>PSM</b>	postes (des enceintes) de sécurité microbiologique
<b>IGUV</b>	irradiation germicide ultraviolets
<b>CJ2</b>	colonie jaune 2
<b>RB1</b>	colonie moyenne issue de boîte 2 GN de la salle de réanimation
<b>RB2</b>	colonie petite issue de boîte 2 GN de la salle de réanimation
<b>RA1</b>	colonie moyenne issue de boîte 1 GN de la salle de réanimation
<b>RA2</b>	colonie petite issue de boîte 1 GN de la salle de réanimation
<b>B1</b>	colonie issue à partir de boîte 1 de GN de bloc opératoire
<b>B2</b>	colonie issue à partir de boîte 2 de GN de bloc opératoire
<b>CO2</b>	colonie orangée issue de deuxième prélèvement du bloc opératoire
<b>ROSE</b>	colonie rose issue de deuxième prélèvement du bloc opératoire

## Liste des tableaux

N° Tableau	Titre	Page
Tableau 1	Les différentes formes cliniques des infections nosocomiales	5
Tableau 2	Exemple de classement des locaux selon le degré de risque	10
Tableau 3	Principaux virus responsables d'infections hospitalières	20
Tableau 4	Distribution des mielleux de culture dans les différents services.	27
Tableau 5	Liste des antibiotiques utilisés pour étudier la sensibilité et la résistance des souches isolées.	36
Tableau 6	Résultats de l'aspect macroscopique du premier prélèvement.	37
Tableau 7	Examen macroscopique après 48 heures d'incubation	38
Tableau 8	Résultats de l'aspect macroscopique du deuxième prélèvement	39
Tableau 9	Résultats microscopique après coloration au bleu de méthylène	40
Tableau 10	Résultats de l'observation microscopique des micro-organismes isolés	42
Tableau 11	Résultat du test mannitol mobilité	46
Tableau 12	Résultats du test DNase, obtenus à partir des souches purifiées	47
Tableau 13	Résultats des tests biochimiques pour l'identification des cocci Gram positifs (système Api Staph)	/
Tableau 14	Identification des Staphylocoques avec les tests (catalase, test mannitol, coagulase, et DNase).	50

## Liste des figures

N° de figure	Titre	Page
Figure 1	Transmission des infections hospitalières	4
Figure 2	Protocole expérimental de l'analyse microbiologique de l'air hospitalier	28
Figure 3	Méthodologie d'application de l'Api Staph	34
Figure 4	Résultat de l'enrichissement	44
Figure 5	Les résultats de la purification des cocci Gram + sur Chapman	44
Figure 6	Résultat positifs du test catalase	45
Figure 7	Résultat du test oxydase	45
Figure 8	Résultat du test mannitol mobilité	46
Figure 9	Résultat du test coagulase libre	47
Figure 10	Résultat avant et après test DNase	48
Figure11	Résultat avant et après test DNase	48

## Liste des planches

N° de planche	Titre	Page
Planche 1	Résultats d'observation microscopique (gr : 100x) après coloration au bleu de méthylène	41
Planche 2	Résultats d'observation microscopique (gr : 100x) après coloration de Gram	43
Planche 3	Illustration des profils des souches identifiées par le système API Staph	49
Planche 4	Aspect macroscopique des <i>Staphylococcus</i> isolées après repiquage	51

Produced with ScanTopDF

### Introduction

L'hôpital et les services médicaux extra hospitaliers présentent des différentes pathologies infectieuses ou non.

La grande variété de personnes séjourne dans un tel établissement : personnel et des visiteurs en bonne santé, personnes souffrant d'allergies, bénéficiaires atteints de maladies graves ou subissant des chirurgies majeures, personnes âgées, nourrissons, etc. Peuvent réagir différemment à une pollution de l'air intérieur. Malgré les efforts exercés le malade ne peut éviter le contact avec les micro-organismes

Cependant, le mauvais fonctionnement des services cliniques, le non-respect des conditions hygiéniques de travail, le manque de contrôle des foyers d'infection dans le personnel, le non isolement des contagieux peuvent mener à l'explosion épidémique de maladies contagieuses et non contagieuses dans les services sanitaires.

L'état du bâtiment peut également être une source de problèmes liés à la qualité de l'air : infiltrations d'eau causant une contamination fongique, niveau de chaleur élevé dans une chambre d'hôpital non climatisée.

Les infections nosocomiales représentent le problème majeur de santé publique dans les établissements de santé. Elles induisent une morbidité importante, une surmortalité non négligeable et des coûts importants

L'air à l'hôpital véhicule de nombreux microorganismes (bactéries, virus, champignons, levures), de différentes origines : saprophyte et commensale, la transmission aérienne des infections nosocomiales serait responsable de 10 - 20 % des infections nosocomiales endémiques.

Afin de déterminer les risques liés aux infections nosocomiales aéro-gènes dans les services médicaux ; nous nous sommes intéressés à isoler et

identifier la flore microbienne à partir de l'air hospitalier des services suivants : bloc opératoire, salle de réanimation de L'Hôpital HAKIME OBKI - GUELMA

Nous rapportons dans cette étude deux grandes parties :

- la première est attribuée aux données bibliographiques comportant deux chapitres : l'un est consacré à la présentation des infections nosocomiales de manières générales et l'autre à la description de la flore microbienne aérogène de l'air hospitalier.

- la deuxième relate notre travail expérimental qui rassemble les techniques d'isolement et d'identification des microorganismes résidant l'air hospitalier, ainsi que les résultats obtenus et leur discussion, et enfin nous terminerons cette étude par une conclusion

Produced with Scantopdf

# **PARTIE THEORIQUE**

Produced with ScantOPDF

## **Présentation des infections nosocomiales**

### **1- Définition**

- **Infection** : pénétration dans un organisme d'un agent étranger ( bactérie, virus, champignon, parasite. ) capable de s'y multiplier et d'y induire des lésions pathologiques. L'infection peut s'accompagner de manifestations cliniques.

- **Nosocomial** : vient du grec "nosokomeone" qui signifie "hôpital», ce qui se contracte à l'hôpital ou dans n'importe quel autre établissement de soin, durant un acte de prévention, de diagnostic ou de soin. [28]

Le délai de 48h s'allonge jusqu'à 30 jours dans le cas d'infections de site opératoire, et jusqu'à un an s'il y a mise en place de matériel prothétique

Autrement dit, toute infection survenant sur une cicatrice chirurgicale dans l'année suivant l'opération, même si le patient est sorti de l'hôpital, peut être considérée comme nosocomiale.

Ces infections sont très fréquentes et leur gravité est encore accentuée par la nature des germes rencontrés qui sont souvent résistants à de multiples antibiotiques.

Enfin, les infections nosocomiales sont très coûteuses pour la collectivité puisqu'elles prolongent le séjour des malades hospitalisés et qu'elles ont tendance à se propager de façon épidémique dans les unités de soins [37].

### **2- Épidémiologie**

A l'échelle mondiale, l'OMS (2008) estime que 1,4 million de personnes souffrent à tout moment d'une infection contractée à l'hôpital.

Les prévalences maximales sont rapportées en Méditerranée orientale (11,8 %), en Asie du Sud-Est (10,0 %) et en Pacifique occidental (9,0 %). [33]

**En France**

En 1990, parmi 11 599 patients d'un échantillon de 39 hôpitaux de court séjour dans 16 départements; la prévalence des patients infectés était de 6,7 % et celle des infections nosocomiales

**En Italie**

Les maladies nosocomiales concernaient dans les années 2000 environ 6,7 % des personnes hospitalisées, soit 450 000 et 700 000 victimes, causant entre 4 500 et 7 000 morts.

**Aux États-Unis**

On estime que 10 % des patients hospitalisés sont victimes d'une infection nosocomiale, soit 2 millions de patients par an. [26]

**En Algérie**

La prévalence des patients infectés en Algérie avoisine 25%des cas suivant les données nationales :

- 1993 CHU BENI\_MESSOUS :16,2%.
- 1994 CHU BENI\_MESSOUS :18,26%
- 1996 CHU BAB EL OUED : 15 a25% (17)

**3- Les modes de transmission**

Quatre grands modes de transmission possibles (fig.1) :

**• Auto-infection**

Le malade s'infecte par ses propres germes, les « portes d'entrée » sont les lésions des muqueuses, les lésions cutanées (plaies, brûlures, maladies de peau). Les germes seront ceux de la peau, des muqueuses, du tractus digestif, etc. Ce mécanisme est favorisé par différents facteurs, la dissémination des germes du patient dans son environnement (comme par exemple le lit), par l'utilisation de traitement pouvant altérer l'immunocompétence (corticostéroïdes, immunosuppresseurs...), par l'administration de traitements sélectionnant certaines bactéries

(Antibiothérapie à spectre large...). Enfin, les patients immunodéprimés (sida, aplasiques...) sont les personnes les plus à risque du fait du défaut de vigilance immunitaire de leur organisme, développant ainsi des pathologies strictement endogènes.

- **Hétéro-infection**

Dans ce cas, le germe responsable de l'infection nosocomiale provient d'un autre malade, **la transmission étant le plus souvent manu portée**, par le personnel soignant intervenant auprès de plusieurs patients, disséminant ainsi les germes d'une personne à l'autre. Ces infections sont dites « croisées ». C'est le mode de contamination le plus fréquemment retrouvé lors d'épidémies. Cependant certains germes, comme celui de la tuberculose, sont transmis par voie aérienne. Il peut en outre arriver plus rarement que les germes soient transmis par contact direct entre deux patients.

- **Xéno-infection**

Ce mode de transmission est un peu à part, dans ce cas les agents pathogènes sont transmis par des personnes venant de l'extérieur (personnel soignant, visiteurs, sous-traitants), et présentant eux-mêmes une pathologie infectieuse, déclarée ou en cours d'incubation. Ce mode de transmission n'est cependant pas à négliger, car il peut être dévastateur pour les patients particulièrement fragiles. Ainsi, les professionnels de santé sont de plus en plus encouragés à se faire vacciner contre la grippe.

- **Exo-infection**

Ce mode de transmission est dû :

- soit à un dysfonctionnement technique d'un matériel (filtre à air, autoclave...) destiné à la protection des patients qui, ne remplissant plus son office, les laisse en contact avec des germes qui ne devraient, en principe, pas faire l'objet d'une infection, au vu des mesures prises pour les prévenir (aspergillose, légionnelle...).
- Soit à une erreur commise dans l'exécution des procédures de traitement du matériel médico-chirurgical [27]

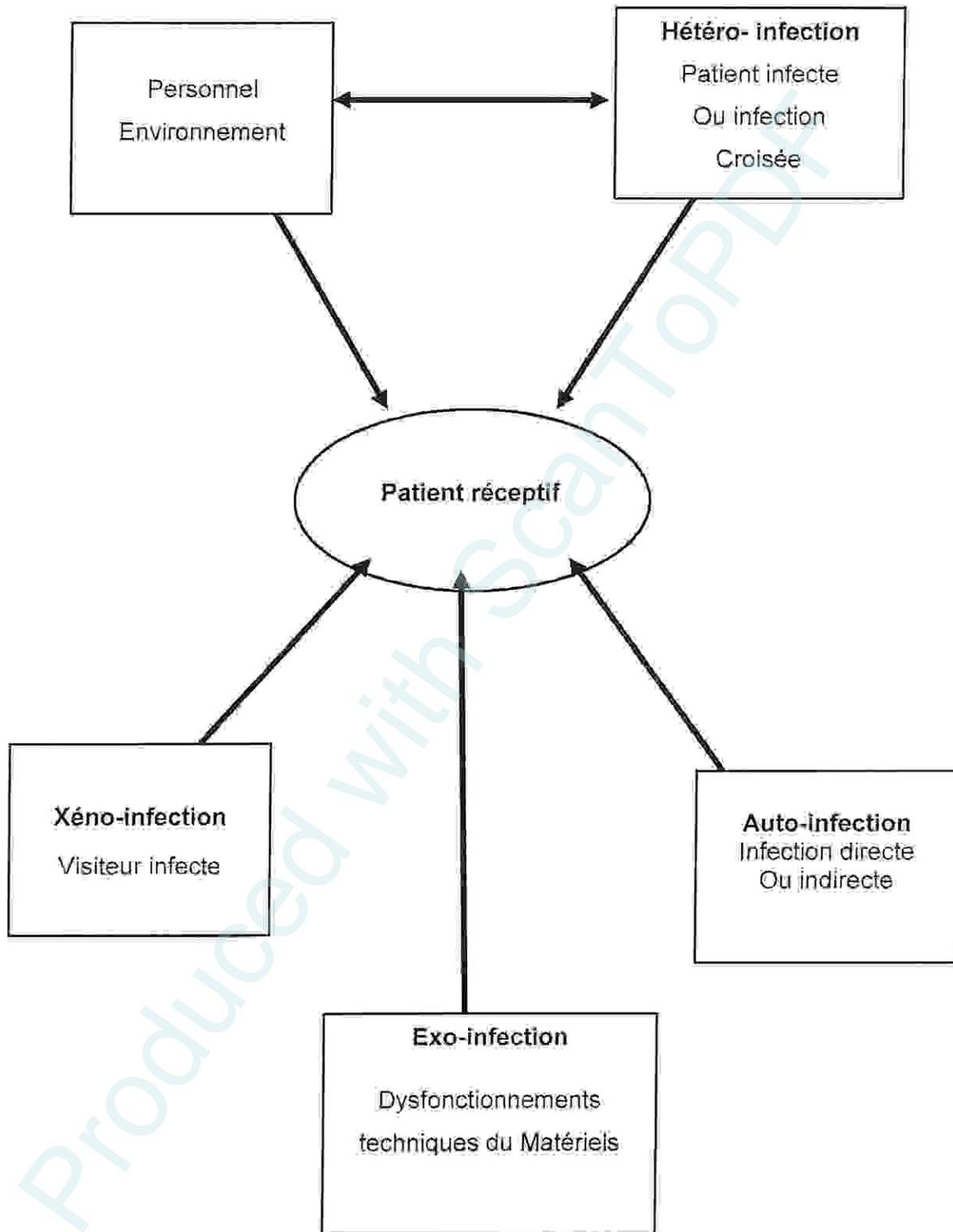


Figure 1 : Transmission des infections hospitalières. (26)

#### 4- Les formes cliniques

Diverses infections sont distinguées allant des dermatoses (gale) jusqu'aux méningites pneumopathies (formes plus graves).

Les principales formes cliniques fréquentes sont les : **(13)**

- ❖ Infections urinaires
- ❖ Infections poste - opératoire
- ❖ Infections respiratoires basses
- ❖ Bactériémies

**Tableau 1 : les différentes formes cliniques des infections nosocomiales (17)**

type d'infections	Fréquence	Facteur de risque	Pourcentage de risque
Infection urinaire	30_40%	Cathétérisme des voies urinaires ... Sondes à demeure	6% 25%(max le 5 <sup>ème</sup> _11ème jours)
Infection Poste - opératoire	20%	Chirurgie propre Chirurgie sale	<2% 20%(sans antibioprophylaxie)
Infection respiratoires basses	15_20%	Ventilions assistée Post opéré	7 a 35%(7a21 fois plus de risque chez l'intubé ou le trachéotomisé) 18%
Bactériémies nosocomiales	10_15%	Spontanée secondaire	2 à 5%
Autres infection de SNC, peau, tube digestifs, organe génitaux, bouche périnée	15_25%	Acte chirurgical Hospitalisation prolongée Chio thérapie instrumentations	indéterminé

## 5- Les facteurs de risque

Les infections nosocomiales ont une plus grande probabilité de survenue dans un certain nombre de circonstance parfaitement définies. (13)

Les facteurs de risques se classent en facteurs intrinsèques et extrinsèques :

### • Les facteurs intrinsèques

Ces facteurs sont liés au malade ou à la pathologie ayant motivé l'hospitalisation ils ne sont pas tous maîtrisables.

Les pathologies préexistantes : le diabète, Immunodéprimés, insuffisance rénale et urinaire, hémopathie, Troubles de la conscience

- les âges : avant 1 an et après 65ans
- le sexe : l'infection urinaire est plus fréquente chez les femmes.
- la durée de séjour qui augmente l'incidence des infections.
- le poids de naissance chez les prématurés : un poids inférieur à 1kg double l'incidence des infections sur les cathéters des nouveaux nés ventilés
- l'état nutritionnel non satisfaisant : dénutrition ou obésité
- l'intervention chirurgicale (13)

### • Les facteurs extrinsèques

Ces facteurs sont liés aux techniques diagnostiques et thérapeutiques :

- Toutes les prothèses, comme les sondes urinaires, les cathéters vasculaires, les drains, les sondes digestives... L'infection est favorisée par :
- la durée de maintien en place des prothèses et leurs manipulations
- l'utilisation mal maîtrisée des antibiotiques :
- les actes invasifs autres que la chirurgie, comme l'endoscopie, dialyse, hémodialyse [30].
- les traitements diminuant la résistance à l'infection : radiothérapie, Chimiothérapie, corticothérapie.

- les erreurs dans l'organisation des soins : encombrement du service, défaut d'isolement des malades infectés, antibiothérapie, désinfection insuffisante, stérilisation de mauvaise qualité (32).

### **6-Prévention**

Pour diminuer la survenue d'infections hospitalières, voici quelques règles simples à respecter :

- ◆ Un nombre suffisant de salle de bains et de douches (un lavage fréquent des mains entre chaque patient, désinfection avec les solutions antiseptiques contenant de l'eau et de l'alcool afin de diminuer le risque d'infection nosocomiale transportée par les mains : manu porté).
- ◆ Un meilleur comportement des patients et du personnel hospitalier, surtout des médecins qui doivent donner le bon exemple.
- ◆ Un isolement des personnes âgées ou au contraire des prématurés et des nouveau-nés quand cela est possible. Pour qu'il n'aura pas une propagation de certaines infections, telles que la diphtérie, la varicelle, zona, la fièvre hémorragique épidémique, pneumonie, rougeole, tuberculose
- ◆ Un isolement dans une unité spéciale pour les patients suspectés de porter des bactéries multi résistantes et certain exemple du staphylocoque doré qui résiste à la méticilline. Des entérobactéries qui sécrètent des bêtalactamases dont le spectre est étendu (BLSE).
- ◆ Un isolement respiratoire pour les patients présentant une infection par Haemophilus influenza et ou encore par méningocoque. Il en est de même des patients atteints d'érythème infectieux, de pneumonie bactérienne, de rougeole ou d'oreillons.
- ◆ Un isolement sans contact surtout pour l'enfant atteint de bronchiolite, d'herpès des muqueuses et de la peau, de coqueluche, infecté par le naevus respiratoire Syncytial et la rubéole.
- ◆ Une utilisation rationnelle et normale des antibiotiques dans un hôpital en pratiquant une surveillance de la résistance aux antibiotiques régulièrement.

- ◆ Une limitation des gestes et des traitements susceptibles de favoriser la survenue de maladies hospitalières telle qu'un sondage urinaire, l'utilisation d'antiulcéreux (médicaments destinés à prévenir ou traiter les ulcères de l'estomac et du duodénum), l'utilisation d'antibiotiques sur une longue période et à large spectre, les médicaments destinés à diminuer l'acidité gastrique et donc augmentant la résistance des bactéries.
- ◆ La surveillance des services techniques (buanderie, cuisine, ventilation, tuyauteries diverses, etc.).
- ◆ Un programme de vaccination adaptée.
- ◆ La constitution d'un comité ayant pour rôle de contrôler les infections hospitalières.
- ◆ La mise en place d'une surveillance épidémiologique avec un relevé régulier et fréquent des infections. [32]
- ◆ Le contrôle de l'environnement du patient (Contrôle d'air, contrôle de l'eau et le contrôle des surfaces).
- ◆ Formation et contrôle médical périodique du personnel de l'hôpital (précautions standards). [40]

## La contamination de l'air hospitalier

### 1- L'air hospitalier

L'air hospitalier présente un danger potentiel de contamination microbienne (bactérie, champignon virus, parasites), il intervient donc comme un transporteur (vecteur) et non pas comme source de germes causant ainsi de nombreuses maladies

Les germes présents dans l'air hospitalier se répartissent en deux groupes :

- ✓ les microorganismes de l'air extérieurs : c'est la flore saprophyte de l'environnement
- ✓ les microorganismes provenant de l'intérieure de l'hôpital souvent d'origine humaine c'est la flore commensal humaine (19)

### 2- La contamination de L'air hospitalier

C'est la pénétration des différent germe (bactérie, champignons, virus, parasite) ou des agents étrange dans l'air hospitalier a des zone sensible a l'hôpital et capables de s'y multiplier et induire des lésions pathologiques.

Ces agent augmente les risques de contracté une infection nosocomial (aéroportée) est en moyenne 7% c'est a dire que sur 100 personne hospitalier sept d'entre elles auront une infection nosocomial ; ce chiffre varie en fonction de service dans le quel la personne hospitalisée se trouve (bloc opératoire, salle de réanimation, service pédiatrie ..... ) [34,35]

### 3-Les zones de risques

Une zone à risques est un espace géographiquement défini et délimité dans lequel des individus, des produits ou des matériels (ou toute combinaison possible) sont particulièrement vulnérables à la biocontamination.

Une zone à risques peut être un local, une partie d'un local ou un groupe de locaux.

La combinaison des facteurs de risque liés à l'état du patient (âge, maladie sous-jacente immunodéprimé) et de ceux liés aux soins ou le type d'activités pratiquées: (Interventions chirurgicales, transplantations, traitements immunosuppresseurs ou antibiotique à large spectre), permet d'obtenir un niveau de risque pour le patient. Cette évaluation des risques, qui doit être validée dans chaque établissement par le Comité de Lutte contre l'infection nosocomiale, est un outil utile pour définir les zones à risques.

Selon le degré de risque attribué au patient et/ou aux soins, on distingue des zones à très hauts risques, à hauts risques, à risques modérés et à risques faibles ou négligeables (Tableau 2).[36]

**Tableau 2:Exemple de classement des locaux selon le degré de risque**

Zone 1	Zone 2	Zone 3	Zone 4
Risques minimales	Risques moyens	Risques sévères	Très hauts risques
Halls Bureaux Services administratifs Services techniques Maison de retraite Résidence pour personnes âgées	Circulations Ascenseurs Escaliers Salle d'attente Cs externes Salle de rééducation Maternité Moyen et long séjour Psychiatrie Stérilisation (lavage) Pharmacie Blanchisserie	Pédiatrie Soins intensifs Réanimation Urgences Salles d'accouchement Secteurs d'hospitalisation Court séjour Laboratoire Radiologie Hémodialyse Exploration fonctionnelle Stérilisation (côté propre) Toilettes cuisine	Néonatalogie Bloc opératoire Service de greffe Service de brûlés Imagerie médicale interventionnelle Oncologie Onco-hématologie Chimiothérapie immunodéprimés

**4- Les conditions de l'aérobiocontamination****➤ Les sources de contamination**

Les réservoirs microbiens sont classiquement distingués en réservoirs vivants, c'est-à-dire les personnes présentes dans le local, et en réservoirs inertes : on y retrouve les micro-organismes saprophyte, bactéries et champignons microscopiques, qui sont très résistants dans le milieu extérieur, et certains germes pathogène ou commensaux d'origine humaine qui survivent bien en dehors de leur organisme-hôte.

**➤ L'amplification microbienne**

La multiplication des micro-organismes, présents dans les réservoirs, se produit lorsqu'il existe une infection chez un individu ou lorsque sont réunies, dans un réservoir environnemental, toutes les conditions nutritives, physico-chimiques et microbiologique nécessaires à la croissance de ces micro-organismes. Elle aboutit à une concentration élevée de micro-organismes.

**➤ La dissémination aérienne**

La perturbation des réservoirs microbiens permet de libérer les micro-organismes de leurs sources et d'être à l'origine d'une dissémination aérienne. Les vecteurs de l'aérobiocontamination sont multiples. Ils peuvent être d'origine humaine :

Les gouttelettes rhino-pharyngées, dites gouttelettes de Pflugge, émises lors de la parole, de la toux ou de l'éternuement. Elle sédimentes plus ou moins vite selon leur diamètre, généralement compris entre 5 et 10  $\mu\text{m}$ . au fur et à mesure de leur sédimentation, les gouttelettes perdent leur eau et diminuent en diamètre jusqu'à 0.5 $\mu\text{m}$  , formant un noyau de condensation appelé *droplet nuclei*. Leur vitesse de sédimentation est alors pratiquement nulle.

Ces noyaux de condensation, en nombre très important, sont d'autant plus dangereux qu'ils contiennent un concentré de germes, qu'ils restent très longtemps en suspension dans l'air (on les surnomme pour cette raison les

\*long courriers\* de la contamination) et qu'ils pénètrent profondément dans les voies respiratoires.

Les squames cutanées (diamètre compris entre 5 et 30 $\mu$ m) provenant de la desquamation permanente de la peau, les phanères (diamètre compris entre 20 et 30  $\mu$ m) comprenant des particules de poils, d'ongles et d'autres dérivés protecteurs de l'épiderme.

La présence d'un réservoir humain conduit à une contamination inéluctable de l'environnement

Les vecteurs peuvent également être environnementaux :

- les particules textiles se couvrent de micro-organismes en raison de leur charge électrostatique. D'un diamètre supérieur à 10  $\mu$ m, elles vont sédimenter sur le sol avec remise en suspension éventuelles par les mouvements du personnel ou les flux d'air.
- les poussières extérieures d'origine minérale ou végétale sont autant de vecteurs potentiels de leur biocontamination aérienne.
- les particules viables liquides, présentes dans un bio aérosol, sont émises lors de la perturbation de tout milieu hydrique contaminé. Les gouttelettes d'un diamètre inférieur à 5  $\mu$ m pénètrent dans les voies respiratoires.

La dimension des particules vectrices conditionne le temps durant lequel elle reste en suspension dans l'air et la distance qu'elle peut parcourir. Plus la particule est fine, plus longtemps elle persistera dans l'air plus loin elle ira.

(21)

## 5-les principaux germes aéroportés

### 5.1. Les bactéries de l'air responsable d'infections nosocomiales

Les germes nosocomiaux rencontrés sont souvent des cocci Gram positif et des bacilles Gram négatif, cependant les bactéries nosocomiales sont :

#### 5.1.1. Les Staphylocoques

Les Staphylocoques sont répandus dans la nature (sol, eaux, air) et sont responsables d'un grand nombre d'infections humaines et animales

Les staphylocoques sont des cocci sphérique à Gram + de 1 µm de diamètre regroupés en petits amas (grappes de raisin), aérobies-anaérobies facultatifs, immobiles (mouvement brownien), oxydase et catalase positif. Leur température de croissance optimale 37°C avec pH de 7,2 a7 ,4 (13)

Sont généralement responsable d'infection de plaies opératoire et aussi à l'origine d'infection cutanée superficielles

Au sein du genre *Staphylococcus* on distingue actuellement près de 30 espèces : certaines sont présentes chez l'homme, d'autres chez les animaux ou dans les aliments.

Au laboratoire, la recherche d'une enzyme, la coagulase, permet de distinguer classiquement : **S. aureus** : le staphylocoque doré, coagulase +, souvent pathogène, et les staphylocoques à coagulase négative sans pouvoir pathogène réel, mais dont le rôle est croissant dans les infections nosocomiales.

Les Staphylocoques sont répandus dans la nature (sol, eau, air) et sont responsables d'un grand nombre d'infections humaines et animales.

On estime que 50 à 100 % des sujets normaux sont porteurs de manière persistante ou transitoire de différentes espèces de Staphylocoques. (17).

### ➤ Staphylocoque doré

Le staphylocoque doré est un germe dont la virulence est liée à son pouvoir de multiplication dans les tissus, associé à la synthèse de nombreuses enzymes et toxines à l'origine de lésions suppuratives et nécrotiques variées :

- Infections cutanées, sous cutanées et muqueuses : abcès, infections des plaies traumatiques et du site opératoire, médiastinites.
- Bactériémies : 10 à 30 % des bactériémies, toutes bactéries confondues

### ➤ Les staphylocoques à coagulase négative

Longtemps considérés comme des bactéries commensales de la peau, leur isolement à partir de produits pathologiques à longtemps été interprété comme sans signification. En réalité, ils sont responsables d'authentiques infections avec une fréquence accrue depuis une quinzaine d'années notamment en milieu hospitalier

Les staphylocoques à coagulase négative font partie des germes les plus fréquemment isolés au laboratoire.

Les infections nosocomiales sont dues principalement à *S. epidermidis*, plus rarement à d'autres espèces comme *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus* et *S. hominis*. Elles sont observées surtout dans les unités de réanimation, de chirurgie et de néonatalogie.

Les staphylocoques coagulase négative introduits au niveau du matériel étranger peuvent y persister de façon prolongée sans entraîner d'infection. Cette notion rend compte de la survenue tardive d'infections à staphylocoques coagulase négative chez des patients porteurs de prothèses diverses.

Ils représentent la 4<sup>ème</sup> cause d'infections nosocomiales. (6)

### 5.1.2. Streptocoques et Entérocoques

#### a) Les Entérocoques

Ils se présentent sous la forme de diplocoques à Gram +, immobiles ; anaérobie facultatif, catalase négatif, la température de croissance optimale a 37°C (13)

Ils représentent près de 6,5 % des bactéries isolées dans les infections nosocomiales. Ce sont des commensaux de l'intestin de l'homme et des animaux. Ils survivent dans le milieu extérieur où leur présence est considérée comme un indice de contamination fécale. Pathogènes opportunistes, ils sont souvent sélectionnés par une antibiothérapie. Les espèces les plus fréquemment rencontrées sont *Enterococcus faecalis* et *E. faecium*.

Les infections à point de départ digestif sont particulièrement fréquentes surtout au décours de la chirurgie digestive : abcès intra-péritonéaux et péritonites post-opératoires. Ils sont aussi responsables d'infections urinaires après cathétérisme ou pose d'une sonde à demeure ainsi que de bactériémies et endocardites. Enfin, ils infectent les plaies chirurgicales, des ulcères variqueux ou de décubitus, des brûlures, les lésions périnéales. (2)

#### b) Les Streptocoques

Ils sont moins fréquemment responsables d'infections nosocomiales. Ce sont des cocci à Gram + en chaînettes que l'on différencie sur des caractères antigéniques et/ou biochimique, présence de capsule les *Streptococcus pneumoniae* (diplocoques encapsulés), immobiles, anaérobie facultatifs, catalase négatif, leur température de croissance optimale 35 a37°C de pH optimal 7,2 a 7,4.

Les groupes antigéniques A, C et G qui se localisent préférentiellement au niveau du pharynx sont peu rencontrés dans les infections hospitalières. Ils peuvent cependant être responsables d'infections des plaies et des tissus mous (cellulites) ainsi que de bactériémies (13).

### 5.1.3. Les entérobactéries :

Les entérobactéries constituent une vaste famille de bacilles à Gram négatif, mobiles et immobiles chez d'autres espèces, type respiratoires aéro-anaérobie ou anaérobie facultative, oxydase négative, catalase positif sauf *Shigella dysenteriae* sérotype 1. La température optimale varie de 30 à 37°C. Les principaux germes sont :

- *Escherichia coli*
- *Klebsiella – Enterobacter – Serratia – Hafnia*
- *Proteus – Providencia – Morganella*
- *Salmonella – Shigella*
- *Citrobacter*
- *Yersinia*

Incluent les espèces qui sont souvent mises en cause dans les infections endogènes (infection urinaires) car la plus part sont d'origines intestinales (flore endogène). (13).

### 5.1.4. *Pseudomonas* et germes apparentés

Les *Pseudomonas* sont des bacilles Gram négatif aérobies, mobiles, oxydase, catalase positif, température optimales de 30 à 45°C et pH compris entre 6,5 et 8. Ces bactéries sont ubiquistes, saprophyte ; suivant les espèces elles peuvent être retrouvées dans les eaux douces et marines, dans les sols humides, les boues et les sédiments, dans l'air et chez les végétaux (par exemple les fleurs dans les chambres de malades à l'hôpital, constituant une source de contamination). (13).

Les germes apparentés les plus connus dans les milieux hospitalier :  
*Pseudomonas aeruginosa*

L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* ou bacille pyocyanique est un germe ubiquitaire répandu dans la nature, le sol, les eaux, sur des végétaux divers.

La bactérie est retrouvée en faible quantité dans la flore fécale de 4 à 12 % de sujets sains, mais en milieu hospitalier sont souvent liés à la présence humaine (malades, visiteur, personnel) aux activités du personnel médical et chirurgical et aux produits liquides utilisés.

Chez l'homme *P.aeruginosa* est l'agent du pu bleu des infections cutanées post-chirurgicales, de septicémies, d'endocardites.

Ce germe est aussi pathogène opportuniste et il constitue une cause majeure d'infection nosocomiales divers chez des personnes fragilisées ou immunodéprimées (grand brûlés, cancéreux ...). (6)

### 5.1.5. Les Clostridium

Gros bacilles à Gram positif sporulés d'origine tellurique comprend plus de 150 espèces, mobiles (*C.perfringens* immobiles), anaérobies strictes, catalase négative, température optimale de 25°C à 45°C suivant les espèces. Certains sont parfois commensales de l'intestin de l'homme et des animaux parmi ces espèces :

#### ➤ *C. perfringens*

Germe commensal du tube digestif et tellurique capable de former des spores qui sont relativement résistantes aux désinfections.

Il est responsable (avec quelques autres espèces de *Clostridium*) de la gangrène gazeuse caractérisée par une destruction musculaire avec production de gaz, associée à des signes toxémiques.

Elle peut faire suite à un acte chirurgical (20 à 40 % des cas) ou survenir après une injection intramusculaire d'un médicament. Les gangrènes post-opératoires compliquent essentiellement la chirurgie dite "septique" (abdomino-pelvienne, périnéale) et les interventions effectuées chez des sujets diabétiques ou artéritiques. (10)

*C.perfringens* peut également être responsable de toxi-infections alimentaires collectives (par sécrétion d'une entérotoxine).

D'autre *Clostridium*, **C. difficile** retrouvé dans l'intestin du nouveau né, sont l'agent responsable des colites pseudomembraneuses favorisées par une antibiothérapie. Cette bactérie est aussi responsable de 15 à 25 % des diarrhées post-antibiotiques et est reconnu comme la principale étiologie des diarrhées infectieuses nosocomiales de l'adulte.

La transmission nosocomiale est manuportée. La contamination environnementale est fréquente et persistante. (9)

### **5.1.6. Autres bactéries responsables d'infections nosocomiales**

#### ➤ **Legionella**

Les Légionnelles sont des bacilles Gram négatif saprophytes de l'environnement ayant une très large distribution. On les retrouve dans de nombreux réservoirs d'eau douce, les circuits de distribution d'eau potable et surtout d'eau chaude (ballons, robinets, pommeaux de douche), les piscines d'eau chaude et dans l'eau des tours aéro-réfrigérantes.

L'exposition de sujets à une source riche en légionnelles sous forme d'aérosols constitue la cause de légionelloses sporadiques ou épidémiques.

#### ➤ **Mycobactéries**

Les bacilles tuberculeux ou bacilles de Kock ou *Mycobacterium tuberculosis* agent de la tuberculose se colore mal au Gram, il se présente sous forme de bâtonnets rose fuchsia à la coloration de **Ziehl Nelsen**.

Les bacilles tuberculeux est plus résistant aux désinfections que les autres microorganismes La transmission nosocomiale possible d'un malade tuberculeux au personnel soignant plus exceptionnellement d'un soignant aux patients exposés. Contamination possible de fibroscopes. (14)

## **5.2. Les mycètes**

### **5.2.1. Les levures**

Sont de champignons microscopique unicellulaire, suivent le genres et les espèces, peuvent être utiles nuisibles ou même pathogène à l'hommes, et Elle font partie de la flores saprophytes des muqueuses et pour certain cas de la peau sain ,la listé des levures retrouvés associées a des manifestations pathologique s'allonge chaque années du fait de l'augmentation des circonstances favorisant le développement de ces champignon chez les malades immunodépressifs, explorations endoscopique prothèses, traitement antifongique systématiquement responsable de la sélection des souches ou d'espèces résistantes. (3)

### **5.2.2. Aspergillus**

Fait partie de flore fongique banale de notre environnement. Le mode de dissémination de ces moisissures se fait par émission de spores entraînées ainsi que les courants d'air.

Les Aspergillus sont le type même des champignons opportunistes, agent d'infection nosocomiales redoutés dans les services s'occupent de malades neutropéniques ou en aplaises.

Les principales espèces rencontrées sont : *A.fumigarus*, *A.niger*, *A .flavus*. (24)

La fréquence de cette infection dépend de l'état du patient : en cas de greffe de moelle, le risque est compris entre 0,5 et 10%. Pour un individu en bonne santé, sans problème allergique, le risque est nul. La mortalité des patients ayant une aspergillose prouvée est considérable , entre 50 et 90%. [31]

### **5.3. Les virus**

Les infections virales peuvent être à l'origine d'infection à transmission direct(les infections respiratoires, les infections de l'œil) et a transmission indirect par matériel contaminé (hépatite virale B -C, SIDA). (17)

Les virus responsables d'infection hospitalières sont nombreux et appartiennent à des familles virales distinctes (Tableau3) :

Tableau 3 : Principaux virus responsables d'infections hospitalières (13)

Virus	Abré- viation	Famille Virale	Gén- nome	Dimensions du virus <sup>°</sup>	Envel- oppe	Persistance intracellulaire du génome viral
Rougeole	-	Paramyxoviridae	A.R.N	120 - 250	+	-
Oreillons	-	Paramyxoviridae	A.R.N	100 - 600	+	-
Respiratoire syncytial		Paramyxoviridae	A.R.N	100 - 300	+	-
Grippe	-	Orthomyxoviridae	A.R.N	100	+	-
Rota virus	-	Réoviridae	A.R.N	70	-	-
Hépatite A	HAV	Picornaviridae	A.R.N	27	-	-
Adénovirus	ADV	Adenoviridae	A.D.N	80	-	+
Epstein Barr	EBV	Herpesviridae	A.D.N	200	+	+
Hépatite B	HBV	Hepadnaviridae	A.D.N	42	+	+/-
Hépatite C	HCV	Flaviviridae	A.R.N	60	+	nd
Ebola . Marbourg	-	Filoviridae	A.R.N	100-1000 x 80	+	-
Immunod éfi- cience humaine	HIV	Retroviridae	A.R.N	100	+	+

<sup>°</sup> : Diamètre avec variation (nm) ou longueur X diamètre (nm).

**5.4. Les parasite :** Sont rarement à l'origine d'infection hospitalière. (17)

## 6. Le traitement de l'air

### 6.1. Les objectifs de traitement de l'air

Le traitement de l'air porte 2 objectifs

### **6.1.1. Objectif de confort**

Le traitement de l'air a pour premier objectif général d'assurer le confort des occupants des locaux :

- Patients et personnels des équipes de soins.

Un environnement confortable peut être obtenu et contrôlé par des paramètres tels que :

- **L'humidité** ; Le niveau d'humidité relative doit être maintenu à un taux favorable au confort et en mesure de diminuer les risques de prolifération fongique dans les endroits desservis, et par le fait même, les affections et malaises qui leurs sont attribuables. D'une manière générale, le taux d'humidité relative doit être de 30% à 60 % selon les saisons et peut varier de façon ponctuelle en fonction des conditions extrêmes.

- **La température** ; L'air doit être admis dans les pièces à une température qui permet de maintenir une température ambiante confortable et apte à favoriser la guérison du patient. L'air d'alimentation doit être chauffé ou refroidi selon les besoins de la pièce desservie.

- **L'aéraulique** : on cherche à éviter les courants d'air ou turbulences ;

- **L'acoustique** : on cherche à minimiser le niveau sonore.

- **Eliminer les odeurs et les gaz d'anesthésie.(23)**

### **6.1.2. Objectif de sécurité sanitaire**

C'est l'objectif qui retient notre attention.

Dans le cas le plus fréquent, le traitement de l'air vise la protection du patient fragile contre l'aérobiocontamination. On envisage deux directions d'approche :

#### **➤ Prévenir la contamination extérieure**

- Par une filtration efficace permettant de souffler un air dépourvu de spores ;
- Par une surpression empêchant la pénétration des spores dans la chambre

#### **➤ Eliminer la contamination produite sur place**

- Par un renouvellement et la maîtrise des flux d'air afin d'épurer (diluer et évacuer) rapidement l'air du local. **(11)**

- La protection des patients fragiles vis-à-vis de la biocontamination aérienne est liée à La capacité d'épuration du système de traitement d'air qui dépend de quatre paramètres :

✓ **Le renouvellement d'air du local.** L'apport d'air neuf et l'extraction d'air conduisent à la dilution et l'élimination des biocontaminants, libérés dans l'air par les équipements et le personnel, selon le nombre de personnes présentes et leur degré d'activité. Les variations du taux de renouvellement d'air permettent d'aboutir à différents classes d'empoussièremment, en soulignant qu'il n'existe pas de relation linéaire entre les niveaux d'empoussièremment de l'air et les niveaux d'aérobiocontamination.

✓ **Le mode de diffusion de l'air.** Il entraîne une élimination, plus ou moins rapide, des biocontaminants de la zone à protéger.

✓ **La surpression du local par rapport aux locaux annexes**  
La hiérarchie des pressions D'air évite la contamination des locaux à protéger par un confinement dynamique.

✓ **La filtration de l'air.** Associé au taux de brassage de l'air, le choix du niveau de Filtration conditionne la propreté particulière de l'air soufflé dans le local, en retenant les particules selon leur taille. **[36]**

## 6.2. Les procédés de traitement de l'air

### A. Traitement mécaniques

#### ➤ La ventilation

Elle est destinée à entraîner vers l'extérieur les particules en suspension dans l'air et responsables de l'aérobiocontamination, l'élimination de ces particules sera en fonction de la vitesse de la pulsion de l'air et de la concentration en particules. Le flux d'air doit être homogène, sans turbulence avec un taux de renouvellement horaire suffisant pour traiter le volume de la salle.

Le taux de ventilation de six volumes/heure est souvent celui retenu pour les chambres d'hospitalisation, pour les salles d'opération à flux turbulent il ne doit pas être inférieur à quinze volumes/heure et peut aller jusqu'à cinq cents volumes/heure pour les salles à flux laminaire.

Dans tous les cas la forme, la disposition des panneaux de soufflage et des bouches d'extraction doivent être prévues de manière convenable pour éviter les turbulences aérauliques. (13)

#### ➤ La climatisation de l'air

Dans ces locaux, elle est indispensable, la température et l'hygrométrie seront ajustées pour assurer le confort des patients la mise en œuvre de système de récupération de chaleur plus ou moins sophistiqués car basés sur l'apport d'air neuf. (13)

#### ➤ La filtration

La filtration de l'air d'alimentation a pour but d'arrêter les impuretés de toute nature qui peuvent porter des micro-organismes ou en devenir le support.

Un pré filtre est placé au niveau de la prise d'air extérieur ; un deuxième, facultatif, est placé après le ventilateur dans le but de protéger le réseau de gaines ; un troisième filtre ou \*filtre finisseur\* a très haute efficacité est

disposé le plus près possible de la pièce à protéger de l'aérobiocontamination.

Les filtres dits \*absolus\* et à \*très haute efficacité\* (HEPNC : Haute efficacité vis-à-vis des particules donnant naissance à colonies), Retenant des particules à partir de 0.3  $\mu\text{m}$  sont à réserver aux zones sensibles comme les blocs opératoires et les unités de greffe.

Ces installations nécessitent une surveillance technique par du personnel qualifié. Les particules donnant naissance à colonies (P.N.C) mesurant habituellement plus de 5  $\mu\text{m}$  et peuvent donc être retenues par des filtres beaucoup moins coûteux, ces derniers seront suffisants pour les zones peu sensibles comme les chambres d'hospitalisation.

Dans les circonstances particulières, comme la manipulation d'agents infectieux au laboratoire, on peut être amené à utiliser des enceintes \*postes\* de sécurité microbiologique (P.S.M) dont le principe repose sur l'association d'un flux d'air (laminaire ou non laminaire) et de filtres absolus.

(13)

### **B. Traitement physique de l'air**

L'irradiation aux rayons ultraviolets est une technique destinée à réduire la quantité et la pathogénicité de polluants biologiques aéroportés

Elle est aussi appelée irradiation germicide ultraviolets (IGUV). De longueur d'onde de 200 à 270 nm, elle peut inactiver les bactéries en induisant la formation de dimères de thymine dans leur ADN. Ceci inhibe la capacité de la bactérie à se répliquer, et c'est une façon efficace de stériliser les surfaces. Cette technique a également été utilisée pour tenter de stériliser l'air. Cependant, contrairement aux traitements de surface pour les quels les temps d'exposition sont relativement longs, les débits d'air usuels pour le traitement de l'air sont trop élevés pour que la dose d'irradiation requise pour être efficace soit atteinte. (5).

La source de ces rayons (les lampes UV) est souvent placée dans la centrale d'air, à l'intérieur des conduits de ventilation ou directement dans la pièce de manière à éviter d'irradier directement les occupants de l'espace desservi.

Souvent utilisée comme mesure additionnelle qui s'ajoute à la filtration, l'irradiation ultraviolette ne doit pas remplacer la filtration dans la séquence d'opérations destinées à assurer un traitement convenable de l'air admis ou recirculés. (20)

### **C. Traitement chimique de l'air**

La désinfection chimique de l'air, préconisée par l'ASHRAE, bien qu'utilisant des produits très efficaces *in vitro*, se heurte à de nombreux problèmes pratiques ; concentration insuffisante des principes actifs, dépôt sur les surfaces du bloc opératoire, efficacité discutable du désinfectant dispersé sur les particules chargées des micro-organismes. (13)

# **PARTIE PRATIQUE**

Produced with ScantOPDF

## 1. Matériel

### 1.1. Matériel du laboratoire

Ce matériel serait introduit au fur et à mesure au long de cette partie expérimentale.

### 1.2. Matériel biologique

Notre travail dont l'objectif est l'isolement et l'identification des microorganismes à partir de l'air hospitalier des services chirurgicaux à l'hôpital el Hakim okbi.

Ce travail a été effectué au niveau de deux laboratoires de Microbiologie un au sien du département de biologie \* Université 8 mai 1954 Guelma \*.et l'autre à l'hôpital Hakim okbi.

Nous avons récolté plusieurs souches provenant de 2 Les prélèvements effectués dans deux services (réanimation, bloc opératoire) à l'hôpital Hakim okbi Guelma.

## 2. Méthodes du travail

### 1- Prélèvement

La méthode consiste à mettre, dans chaque service, des boîtes de Pétri ouvertes contenant différents milieux (tab.4).

- Gélose nutritive (GN), ou gélose nutritive ordinaire (GNO) est un milieu universel.
- Milieu de Chapman : permet de sélectionner les microorganismes halophiles.
- Gélose Sabouraud : c'est un milieu composé de trois peptones et du glucose ainsi que le pH acide du milieu favorisent la croissance des levures et des moisissures.
- Milieu Hektoen : un milieu sélectif permettant l'isolement et la différenciation des entérobactéries pathogènes tel que les Pseudomonas, les Salmonelles et les Shigelles, bien que de nombreuses bactéries à Gram négatif puissent se développer sur ce milieu. L'identification d'entérobactéries pathogènes repose sur le non utilisation des glucides présents dans le milieu. (8).
- Après un temps d'exposition de plus que deux heures, les boîtes modifiées (date, service) doivent être refermées et incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Tableau 4 : Distribution des milieux de culture dans les différents services.

Nombre de prélèvement	Les services	Les milieux de cultures utilisées
Le 1 <sup>er</sup> prélèvement	Bloc opératoire	boîtes Gélose nutritive boîtes Sabouraud boîtes Chapman boîtes Hektoen
	Salle de réanimation	boîtes Gélose nutritive boîtes Sabouraud boîtes Chapman boîtes Hektoen
Le 2 <sup>ème</sup> prélèvement	Bloc opératoire	boîtes Gélose nutritive boîtes Chapman boîtes Hektoen
	Salle de réanimation	boîtes Sabouraud boîtes Chapman boîtes Hektoen

- Le Protocole expérimental de l'analyse bactériologique d'un prélèvement effectué de l'air hospitalier est présenté sur la figure 2

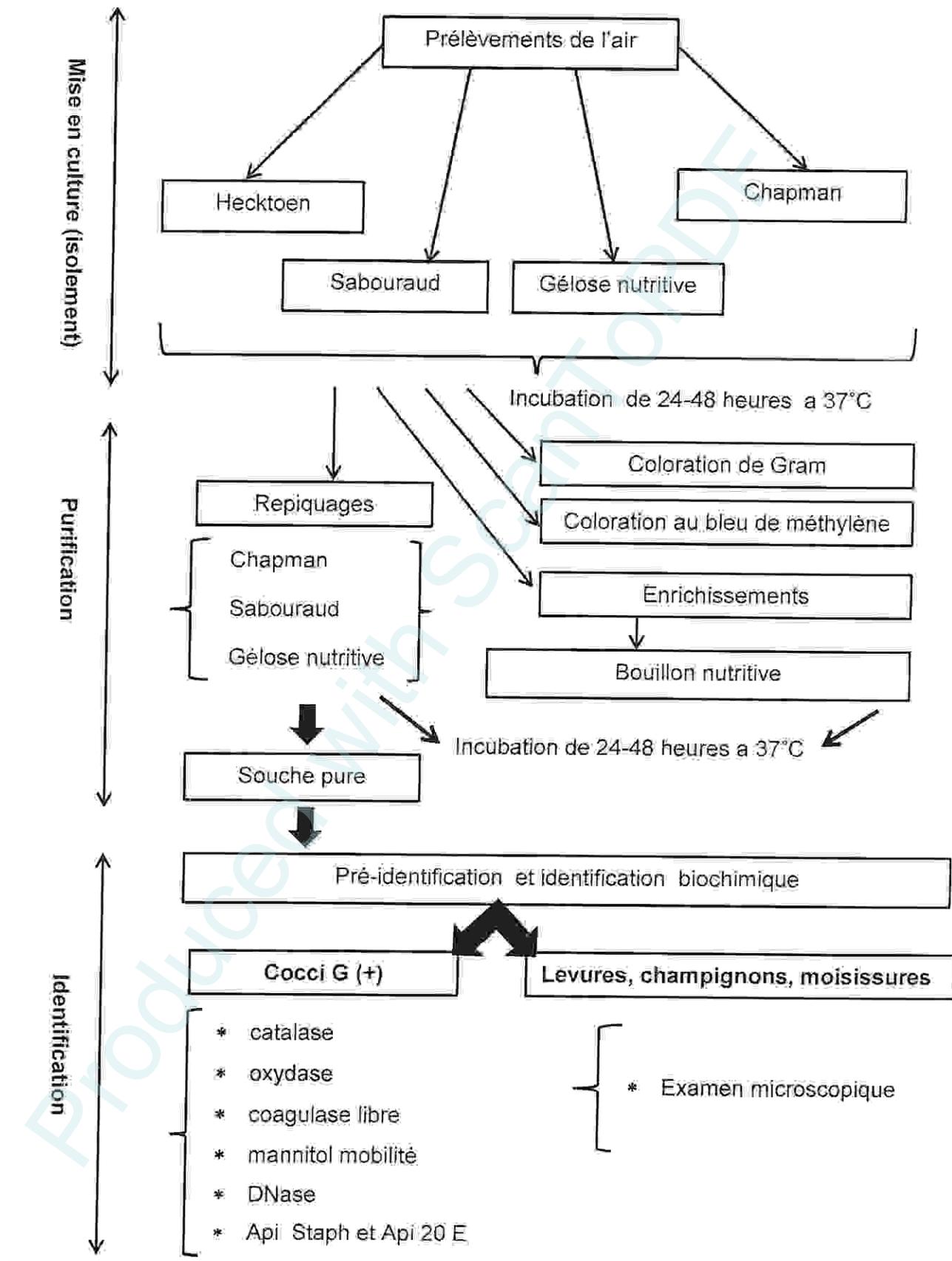


Figure2 : Protocole expérimental de l'analyse microbiologique de l'air hospitalier

## 2- Pré identifications des microorganismes

### 2-1- Coloration de Gram

#### ➤ Principe

C'est une coloration qui permet la distinction entre 2 types de paroi qui se différencient par leurs taux lipidique. (18)

#### ➤ Technique

- Préparer un frottis en déposant sur la lame propre à l'aide d'une pipette Pasteur une goutte de suspension bactérienne, et on réalise une fixation à la chaleur.
- Couvrir le frottis avec le violet de Gentiane et laisser agir 1 min.
- Rincer à l'eau distillée ou de robinet.
- Entraîner le violet avec le lugol (lame inclinée).
- Recouvrir le frottis avec le lugol et laisser agir pendant 1 min.
- Décolorer la lame avec l'alcool jusqu'à ce que la dernière goutte devient transparente puis rincer à l'eau de robinet ou distillée ;
- Recouvrir le frottis avec la fuschine basique pendant 30 secondes, laver la lame à l'eau et la sécher.
- Examiner le frottis à l'objectif à émergence 100, après avoir mis une goutte d'huile de cèdre pour condenser la lumière. (25)

#### ➤ Lecture

- Cellules colorées en violet → Gram+
- Cellules colorées en rose → Gram-

### 2-2- Coloration simple (bleu de méthylène)

#### ➤ Principe

La coloration au bleu de méthylène est une coloration rapide, Économique et d'usage courant.

#### ➤ Technique

- Faire un frottis des bactéries sur une lame propre et sèche ;
- Sécher le frottis ;
- Fixer à l'alcool puis rincé à l'eau ou à la flamme en passant trois fois dans la flamme (Ou au-dessus du bec) ;
- Recouvrir d'une solution de bleu de méthylène pendant une minute ;
- Rincer et sécher.
- Observer le frottis à l'immersion (objectif ×100).

➤ **Lecture**

Il faut noter la forme, la taille et le mode de groupement.

Il faut aussi observer attentivement le cytoplasme : coloration homogène ou hétérogène.

La particularité du colorant est qu'il respecte la structure cellulaire et donc déforme peu la cellule. [38]

### **3- Isolement et purification**

Chaque type de colonies, va subir un ré isolement dans le but d'obtenir à partir des souches présentes, des colonies nettement distinctes, non contaminées c'est à dire cultures pures. La purification est effectuée sur des boites et tubes contenant les milieux saboureaud et Chapman.

La technique consiste à prélever quelques colonies à partir de la gélose nutritive, à l'aide d'une anse de platine préalablement flambée et refroidie, qu'on dispose à la surface de la gélose et on ensemence par la méthode des stries. Les boites de Pétri et les tube sont mises en incubation durant 24 h à 37°C.

### **4- Conservations**

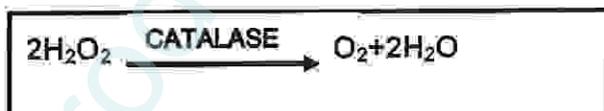
Les souches repiquées sur GN doivent être conservés au froid pour une ultérieure étude.

### **5- Test complémentaire**

#### **5-1- Test catalase**

➤ **Principe**

La catalase est une enzyme qui a la propriété de décomposer l'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) avec libération d'oxygène et formation d'eau. La réaction chimique est la suivante :



➤ **Technique**

Sur une lame très propre, déposer une goutte d' $H_2O_2$  à 10% et introduire la colonie bactérienne à étudier.

### ➤ Lecture

L'observation d'un dégagement de bulles gazeuses signifie que la bactérie possède une catalase. (9)

## 5-2- Test oxydase

### ➤ Principe

Le cytochrome oxydase est le dernier transporteur d'électrons dans la chaîne respiratoire. Elle catalyse le transport d'hydrogène sur l'oxygène moléculaire ; ce qui aboutit à la formation de l'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ).

Pour ce test, utiliser des disques (OX), imprégnés d'un substrat incolore qui est l'oxalate de N diméthyle paraphényldiamine. Ce dernier, avec l'action du l'oxydase, forme une semiquinone de couleur rouge, instable qui s'oxyde rapidement en donnant un composé noirâtre.

### ➤ Technique

- Déposer le disque (OX) sur une lame propre
- Humidifier le disque avec l'eau distillée stérile
- A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, écraser la colonie sur le disque (OX).

### ➤ Lecture

L'apparition d'une coloration violette ou brun noir au disque, signifie que la bactérie possède un cytochrome oxydase (4).

## 6-Tests d'identification des microorganismes

### 6-1-Test mannitol –mobilité

#### ➤ Principe

Le mannitol-mobilité et un indicateur de pH, le rouge du phénol permet de mettre en évidence la mobilité et la fermentation du mannitol.

#### ➤ Technique

Ensemencer par piqure centrale jusqu'au fond du tube à l'aide d'un fil droit de platine chargé de colonies de culture, incuber à 37°C pendant 24 heures

#### ➤ Lecture

### 1. Fermentation du mannitol

- Coloration rouge → Mannitol +

- Coloration jaune → Mannitol –

## 2. Mobilité

- Culture au niveau de la pique → Mobilité –
- Formation d'un voile autour de la pique → Mobilité +

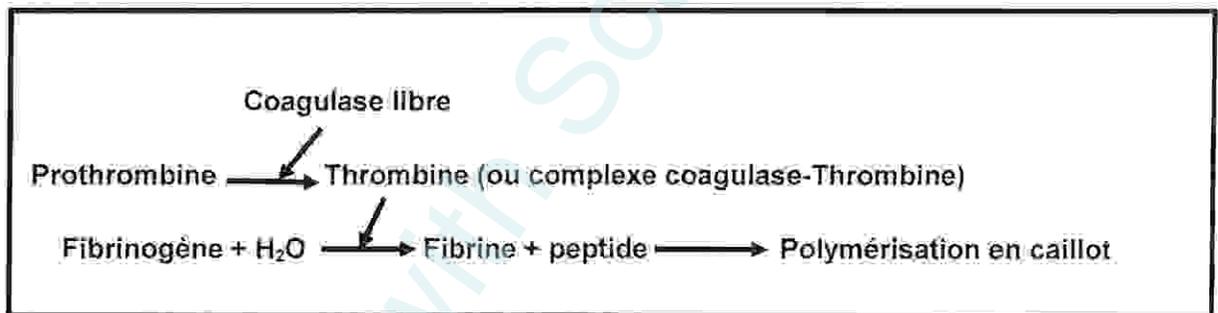
(7-15)

### 6-2-Test de la staphylo-coagulation

#### ➤ But

Dans le genre *Staphylococcus* existe quelques espèces pathogènes, cette pathogénicité est exercée par la production de certaines toxines et enzymes, parmi lesquelles l'enzyme coagulase qui est produite seulement par l'espèce *Staphylococcus aureus* et qui a la faculté de coaguler le plasma de lapin ou humain.

(15)



#### ➤ Technique

- Préparer d'une culture des souches Staphylocoques en bouillon spécial pour la recherche de la coagulase (bouillon cœur de cerveaux).
- Incuber à 27°C pendant 24 heures ;
- Mélanger dans un tube à hémolyse stérile 0,5 ml de plasma oxalaté de lapin réhydraté et 0,5 ml de la culture en bouillon des souches bactérienne ;
- Bien agiter et porter à l'étuve à 37°C et incubé pendant 24heures.
- La culture se fait après 30 minutes à 3heures (7)

#### ➤ Lecture

La présence d'une coagulase se manifeste par la formation d'un coagulum en temps inférieur à 3 heures (9)

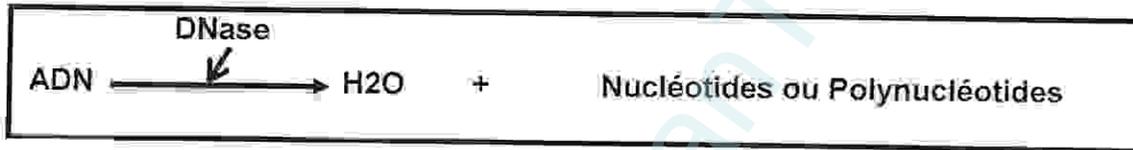
<i>S.aureus</i>	}	Coagulation +
<i>S.intermedius</i>		
<i>S.hyicus</i>	→	Coagulation -

### 6-3-Test DNase

#### ➤ Principe

Certaines bactéries sont capables d'hydrolyser l'ADN (Acide DésoxyRibonucléique) grâce à une enzyme : l'DNase.

La réaction catalysée est la suivante :



#### ➤ Technique

Ensemencer le milieu DNase avec un inoculum issu à partir du milieu Chapman dans une bande, ou déposer la croissance en un point, à l'aide d'un ensemençer à anse.

Il est possible d'ensemencer jusqu'à quatre types de microorganismes sur une même boîte de Pétri. Il est recommandé d'inclure un témoin négatif, p. ex. *Staphylococcus epidermidis*, ainsi qu'un témoin positif, p. ex. *S. aureus*.

Incuber les boîtes de Pétri pendant 18 à 24 h entre 35 et 37 °C. Après incubation, recouvrir les boîtes de Pétri avec une quantité suffisante de solution d'acide chlorhydrique (HCL) 1 N. Attendre 2 min afin de permettre à l'acide de pénétrer toute la surface du milieu.

#### ➤ Résultats

Une fois que l'acide a été appliqué et laissé pénétrer dans le milieu, les microorganismes DNase positifs, comme *Staphylococcus aureus*, sont entourés de zones claires d'ADN dépolymérisé, tandis que les parties du milieu plus éloignées de la bande d'ensemencement sont opaques et blanchâtres, sous l'effet de l'ADN polymérisé. Les colonies de microorganismes négatifs à la DNase ne présentent pas de zones plus claires en périphérie des colonies. [39]

## 7- Identification par systèmes API

### 7-1-Système API Staph

API Staph est un système d'identification des genres *Staphylococcus* comportant des tests biochimiques standardisés et miniaturisés. Cette galerie comprend 20 micros tubes contenant des substrats sous forme déshydratée, leur reconstitution se fait lors de l'addition à chaque tube de l'API d'un milieu API Staph medium ensemencé avec la souche à étudier.

La technique d'ensemencement suit le protocole préconisé pour API Staph est présenté sur (Fig. 3). L'incubation se fait à 37°C pendant 24H.

Les réactions produits pendant l'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés après l'utilisation de substrats ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture d'API ainsi que l'identification des souches se fait à l'aide du tableau des réactions (annexe1), selon le catalogue analytique API Staph. (16)

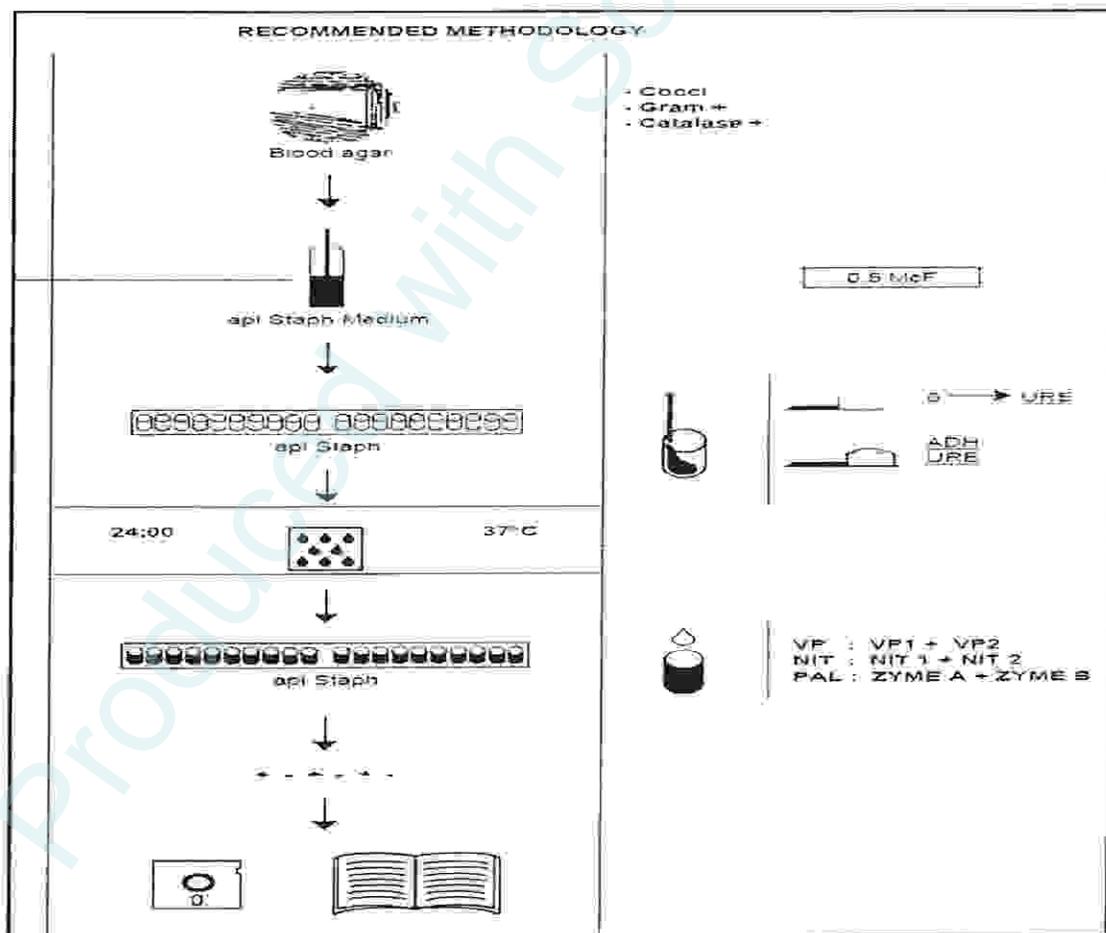


Figure 3 : Méthodologie de l'application de l'API Staph. (7)

## 8- Détermination de la sensibilité vis-à-vis des antibiotiques

### ➤ But

L'antibiogramme permet de déterminer la sensibilité d'une bactérie vis-à-vis d'un antibiotique.

### ➤ Technique

Au laboratoire, la mesure de la sensibilité aux antibiotiques est réalisée le plus souvent par diffusion en milieu solide (méthode des disques). La méthode utilisée est celle de Kirby-Bauer préconisée par le NCCLS (National Clinical Laboratory Standard).

#### a) Le milieu de culture

Le milieu utilisé pour les bactéries est Mueller Hinton (MH)

La gélose est coulée en boîtes de pétri à une épaisseur de 4mm, et elle est séchée avant l'emploi. (8-12)

#### b) L'inoculum

- A partir d'une culture pure de 18 H sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques,
- Décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique ;
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne.
- L'ensemencement doit se faire dans une à 15mn qui suivent la préparation de l'inoculum. (4).

#### c) Ensemencement

Ensemencer la gélose, en passant trois fois l'écouvillon sur toute la surface de la gélose et en tournant chaque fois de 60°, afin d'assurer une distribution uniforme.

#### d) Application des disques d'antibiotiques

Appliquer à l'aide d'un distributeur ou à la pince les disques d'antibiotique à la surface de la gélose ensemencée 15mn avant.

Ces disques doivent être placés sur la gélose à distance de 3cm les uns aux autres et de 15 mm de la boîte (4).

#### e) Incubation

Incuber les boîtes à 37°C pendant 18 à 24 heures.

## f) Lecture

- Pour chaque antibiotique, mesurer en mm le diamètre de la zone d'inhibition.
- Reporter cette mesure sur l'échelle de concordance correspondante aux diamètres critiques d'inhibition (tableau n°)
- Les résultats sont exprimés par : **R** (résistante), **I** (intermédiaire), **S** (sensible) (4).

Tableau 5 : Liste des antibiotiques utilisés pour étudier la sensibilité et la résistance des souches isolées. (25)

Familles des antibiotiques	Nom de l'antibiotique	Sigle du disque	Charge du disque	Diamètre de la zone d'inhibition
<b>Bêta- lactamines</b>	Pénicilline	P	6 µg	<u>S</u> 20 I 8 <u>R</u>
	Oxacilline	OX	1 µg	<u>S</u> 20 <u>R</u>
<b>Aminosides</b>  et <b>aminocyclitols</b>	Gentamycine	GM	30 U.I	<u>S</u> 17 I 11 <u>R</u>
	Kanamycine	K	10 U.I	<u>S</u> 14 I 10 <u>R</u>
	Neomycine	N	30 U.I	<u>S</u> 15 <u>R</u>
<b>Sterptogramines</b>	Pristinamycine	PT	15µg	<u>S</u> 22 I 19 <u>R</u>
<b>Macrolides</b>	Erythromycine	E	15 U.I	<u>S</u> 22 I 17 <u>R</u>
<b>Quinolones</b>	Acide nalidixique	NA	30µg	<u>S</u> 20 I 15 <u>R</u>
<b>Sulfamides et association</b>	Sulfamides	SSS	200µg	<u>S</u> 17 I 12 <u>R</u>

**R** : Souche résistante, **I** : Souche intermédiaire, **S** : Souche sensible.

**1. Aspect macroscopique des colonies**

Après un temps d'incubation de 24 heures à 37C°, l'examen macroscopique sur GN a montré la présence de colonies blanchâtres, blanches, jaunes, rondes et arborescentes, lisses, avec de différentes tailles; grosses, moyennes, petites, dont l'abondance peut atteindre jusqu'à 200- colonies / boites.

Sur Sabouraud, les colonies sont blanchâtres, blanches, rondes, en étoiles, de différentes tailles: petites, moyennes, grosses, avec une faible abondance (ne dépasse pas 78 colonies / boites). Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau 6 : Résultats de l'aspect macroscopique du premier prélèvement.**

Le Service	Nombre De PV	Couleur et aspect des colonies	Le Milieu de culture	La Taille	La forme	L'abondance
<b>La salle de réanimation</b>	01	blanchâtre lisse, rugueuse.	Gélose nutritive	Grosse, Petite, moyenne	Régulière irrégulière, bombé.	69
	02	blanchâtre lisse, rugueuse	Gélose nutritive	Grosse, petite, moyenne	Bombé, irrégulière, ronde	104.
	03	blanchâtre lisse, rugueuse.	Sabouraud	Grosse, moyenne petite.	Ronde, étoilé, irrégulière, bombé	84
	04	blanchâtre lisse, rugueuse	Sabouraud	Grosse, moyenne petite.	Régulière, irrégulière, Bomber, Arborisent.	72
	05, 06, 07, 08	Pas de pousse	Chapman, Hektoen	Pas de pousse	Pas de pousse	/

En ce qui concerne le bloc opératoire, l'aspect macroscopique des boîtes contenant différents milieux (Gélose nutritive, Sabouraud, Chapman, Hektoen) durant 24 h à 37° C, montre l'absence de croissance microbienne.

La lecture après 48 heures d'incubation à 37C° (tab.7), n'a pas montré de grandes différences pour les milieux (Chapman, Hektoen) dans l'ensemble des deux services. Tandis que pour la GN et le Sabouraud une augmentation considérable du nombre de colonies est observée uniquement dans les boîtes mises dans le bloc opératoire.

Tableau7: Examen macroscopique après 48 heures :

Le Service	Le Nombre de prélèvement	La Couleur et l'aspect des colonies	Le Milieu de culture	La Taille	La forme	L'abondance
<b>Le bloc opératoire</b>	09	blanchâtre, lisse	Gélose nutritive	Petite, moyenne	Bomber, ronde	1
	10	blanchâtre, lisse	Gélose nutritive	Petite	Ronde	200
	11	blanche, lisse, régulier	Sabouraud	Petite	Bomber	1
	12	blanche, irrégulier	Sabouraud	Moyenne	Plate	2

Un deuxième prélèvement est effectué dans les services de la même manière que le précédant, les résultats macroscopique après incubation de 24 heures à 37° C, sont représentés dans le (tableau 8).

Tableau 8 : Résultats de l'aspect macroscopique du deuxième prélèvement :

Service	Le Nombre de prélèvement	La Couleur et l'aspect des colonies	Le Milieu de culture	La Taille	La forme	L'abondance
<b>La salle de réanimation</b>	01'	Jaune, blanchâtre, Lisse	Sabouraud	Grande, Moyenne petite	Etoilé, ronde, Régulière, Irrégulière	06
	02'	Pas de poussé	Chapman	Pas de pousse	Pas de pousse	/
	03'	Pas de pousse	Hektoen	Pas de pousse	Pas de pousse	/
<b>Le bloc opératoire</b>	04'	Blanche, blanchâtre, Orangé, jaune lisse, rugueux	Gélose nutritive	Grande, moyenne petite	Ronde bombé, ombiliqué, Irrégulière	42
	05'	Pas de pousse	Chapman	Pas de pousse	Pas de pousse	/
	06'	Pas de pousse	Hektoen	Pas de pousse	Pas de pousse	/

**2. Examens microscopiques**

**2-1-coloration simple (Bleu de Méthylène)**

L'examen microscopique des colonies abondantes sur Sabouraud des deux services (bloc opératoires, salle de réanimation) après coloration au bleu de méthylène, nous a permis d'observer des filaments enchevêtrés, serrés (planche. 17).

**Tableau 9 : Résultats microscopique après coloration au bleu de méthylène**

Service	N° PV	Aspect et couleur des colonies	Aspect microscopique après la coloration par bleu de méthylène
<b>Le bloc opératoire</b>	11	Colonie étoilé plat, blanche	Des filaments longs, septés avec des noyaux
	12	Colonie arborisent blanche	Des filaments serrés, septés (hyphes)
<b>Salle de réanimation</b>	3	Colonie étoiler de grande taille a la forme d'une fleur	Des hyphes très serrées (chevelue)
	4	Blanchâtre cotonneuse, Ronde régulière	Des filaments isolés et cloisonné

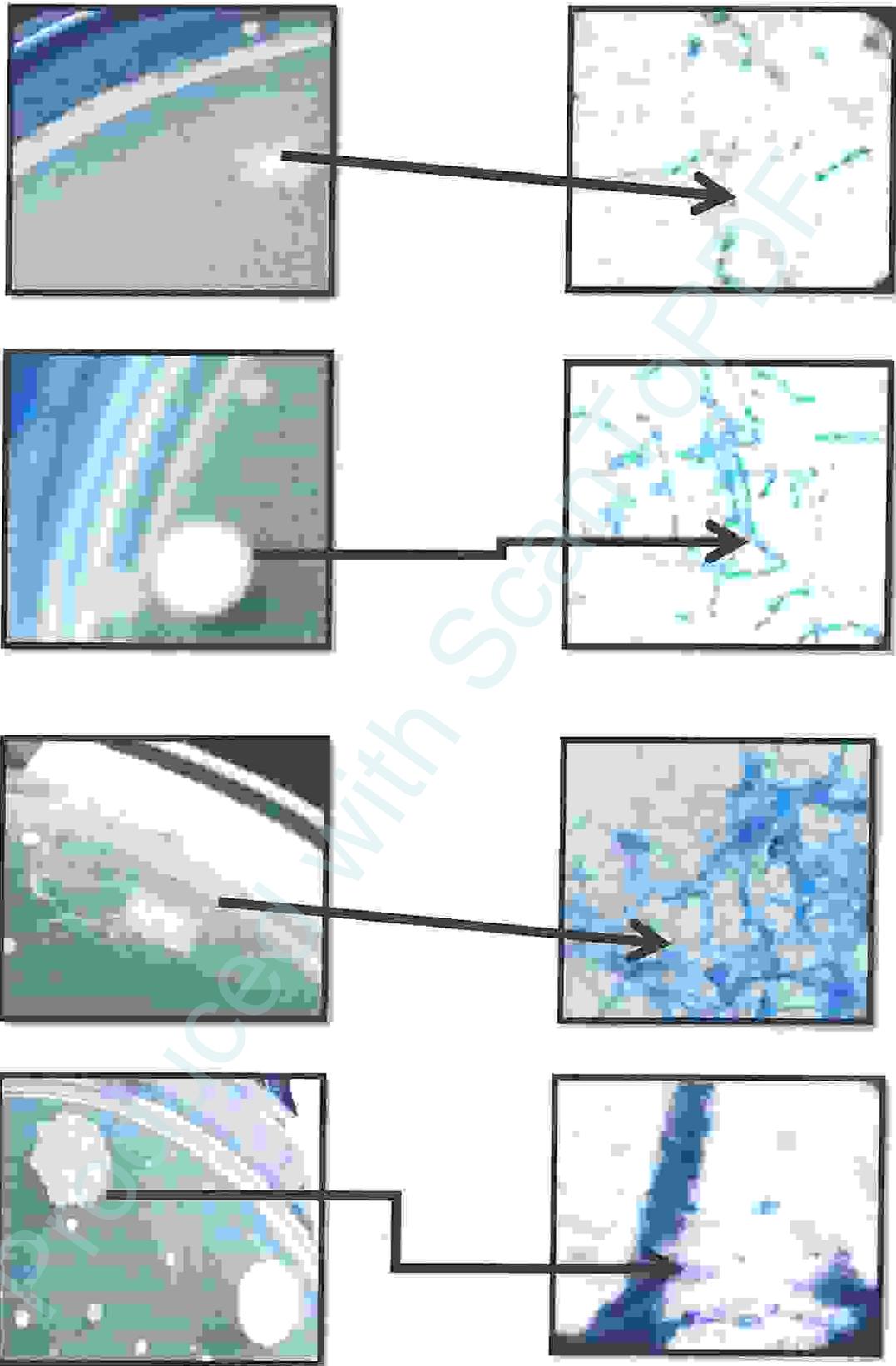


Planche 1: Résultats d'observation microscopique (100x) après coloration au bleu de méthylène

**2. 2. Coloration différentielles (coloration de Gram)**

L'observation des colonies prélevées a partir de la Gélose nutritive (planche 2), Montre l'existence de Cocci colorées en violet donc sont des cocci Gram positif, (ce qui laisse pensé aux Staphylocoque ou des Streptocoque).

Dispersés dans tous les services analysés (blocopérateur, sale de réanimation).

Ces cocci Gram positif sont disposées en diplocoques isolés, en tétrades, en amas, ou en grappe. (Tableau10)

**Tableau 10 : Résultats de l'observation microscopique des micro-organismes isolés**

N <sup>b</sup> PV	services	N° de souche	Couleur et aspect	Aspect microscopique (coloration de Gram)
Le 1 <sup>er</sup> prélèvement	Bloc opératoire	9	Blanche, muqueuse	Petites cocci Gram+, en amas ou en chaînette.
		10	Blanc sale (pale), muqueuse	Petites cocci Gram+, en amas ou diplocoque.
	Sale de Réanimation	1	Blanchâtre	Petites cocci Gram+, diplocoque ou en amas
		1	Blanchâtre	Petites cocci Gram+, diplocoque ou en amas
		2	Blanchâtre	Petites cocci Gram+, en court chaînette ou en amas
		2	Blanchâtre	Petites cocci Gram+, en court chaînette ou en amas.
Le 2 <sup>eme</sup> Prélèvement	Bloc opératoire	4 <sup>1</sup>	Jaunes muqueuse	Petites cocci Gram+, diplocoque, en amas, ou en court chaînette.
		4 <sup>2</sup>	Orangés, muqueuses	
		4 <sup>3</sup>	Blanche, muqueuse	
		4 <sup>4</sup>	Rose, muqueuse	

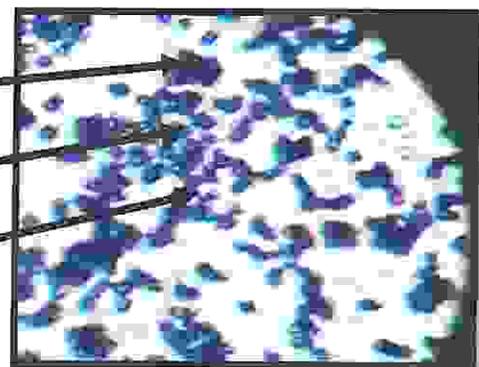
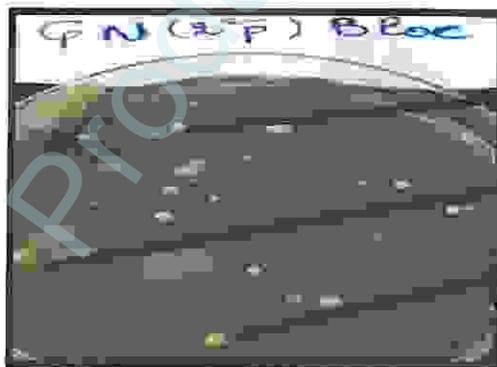
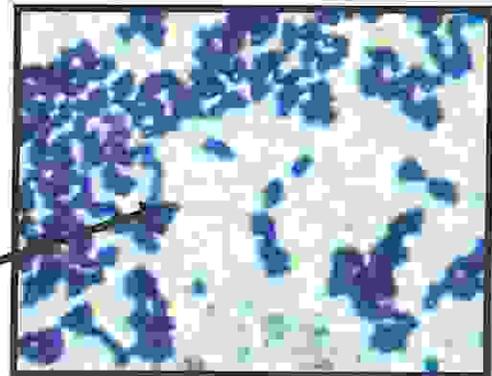
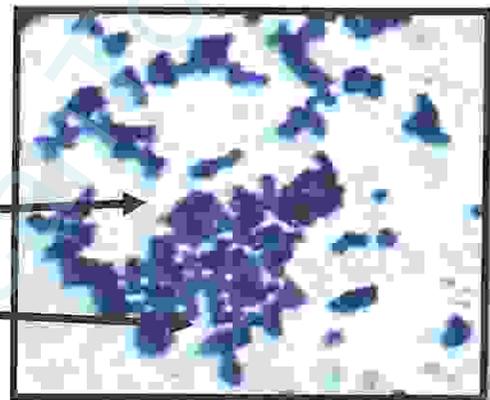
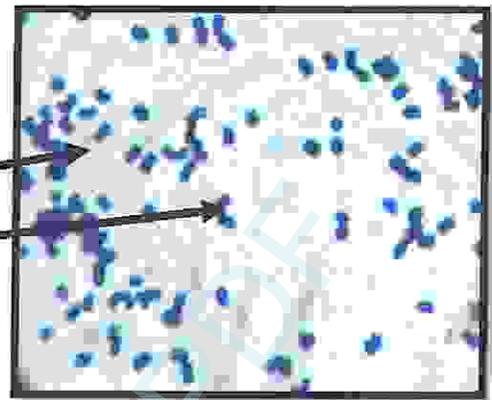
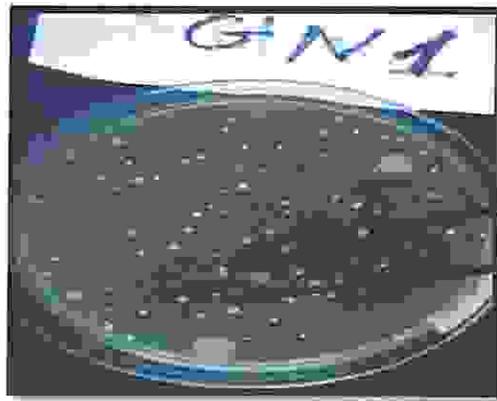


Planche 2 : Résultats d'observation microscopique (100 x) après coloration de Gram

### 3. Enrichissement et Purification

Dans le but de purifier, et augmenter le nombre des souches prédominantes dans les prélèvements effectués à partir de l'air hospitalier.

Les résultats d'enrichissements apparaissent après une culture de 24H, où on a constaté un trouble au niveau de tous les tubes. (Fig.4)

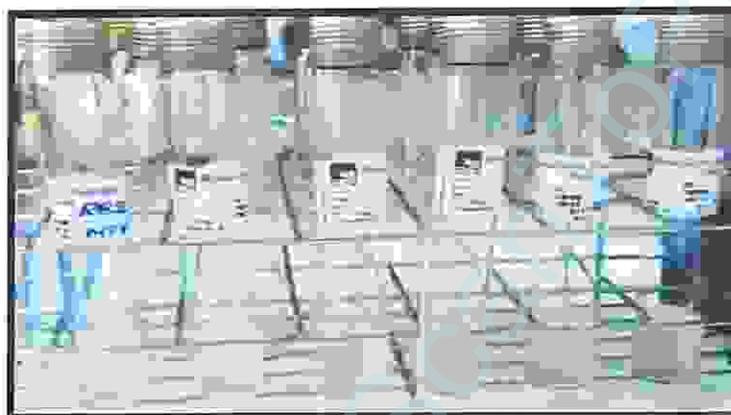


Figure 4 : résultat de l'enrichissement

Après l'enrichissement, on réalise un ensemencement sur des milieux spécifiques propres à chaque microorganisme.

Dans notre cas, pour des cocci Gram (+), le milieu choisi est la gélose Chapman ; les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Les résultats de la purification sont représentés dans la (Fig.5).

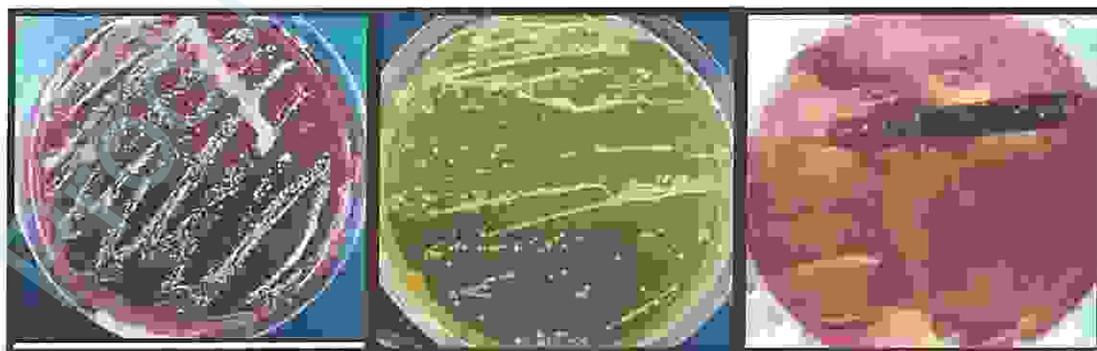


Figure 5 : Résultats de la purification des cocci Gram + sur Chapman

#### 4- Identification des cocci Gram + par les tests complémentaires

##### ➤ Le test catalase

Ce test est effectué dans le but de différencier entre les streptocoques et les staphylocoques, puisque ce test est négatif pour les premiers et positif pour les seconds.

Les résultats ont montré, que toutes les souches isolées qui proviennent du prélèvement effectué dans les deux services sont catalase positif (fig.6).

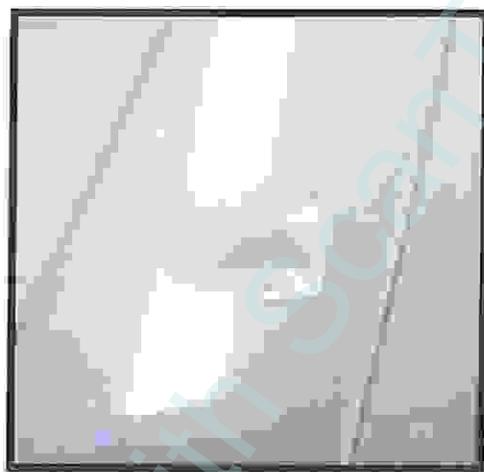


Figure 6 : Résultat positif de test catalase

##### ➤ Le test oxydase

Les résultats relatifs à ce test montrent que toutes les souches sont oxydase négatif à l'exception de la souche (CJ2) qui peut être un *Micrococcus* (fig.7).

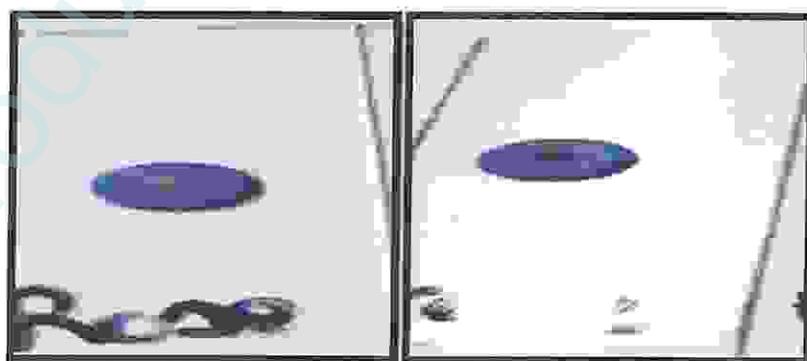


Figure 7: Résultat du test oxydase

➤ Test mannitol-mobilité

Les résultats du test mannitol- mobilité (fig.8), sont représentés dans le tableau suivant (tab .11):

Tableau 11 : Résultat du test mannitol mobilité

test Nb : de PV	Mannitol	Mobilité
RB1=2	+	-
B1=9	-	-
RA2=1	+	-
RB2=2	+	-
B2=10	-	-
RA1=1	-	-
CJ2=4'	-	-
CO2= 4'	-	-
B2 1/2=4'	+	-
ROSE=4'	-	-



Figure 8 : résultat obtenue de test mannitol mobilité

➤ **Test coagulase libre**

La majorité des souches purifiées des prélèvements pris des deux services, ne possèdent pas une coagulase libre à l'exception de la souche (RA2 colonie jaune) prévenant de la salle de réanimation.

(Fig. 9).

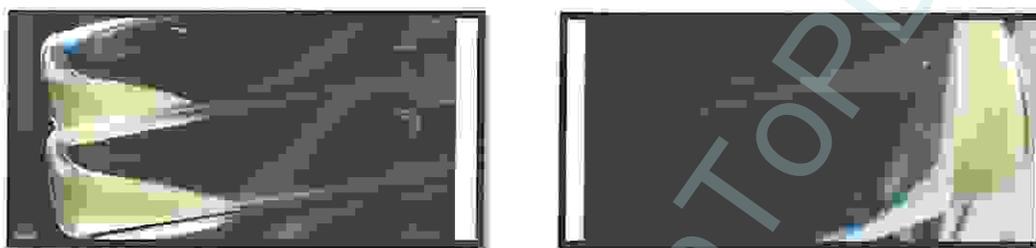


Figure 9 : Résultat du test coagulase libre

➤ **Test DNase**

Les résultats de ce test sont représentés dans le tableau : 12, et les figures 10 et 11.

Tableau12 : les résultats de test DNase, obtenus à partir des souches purifiées :

Le test Nombre de PV	Résultats de test DNase
4', CJ2, ROSE, 1	++++
9,10, RA1	---
4', RB1, 2	---

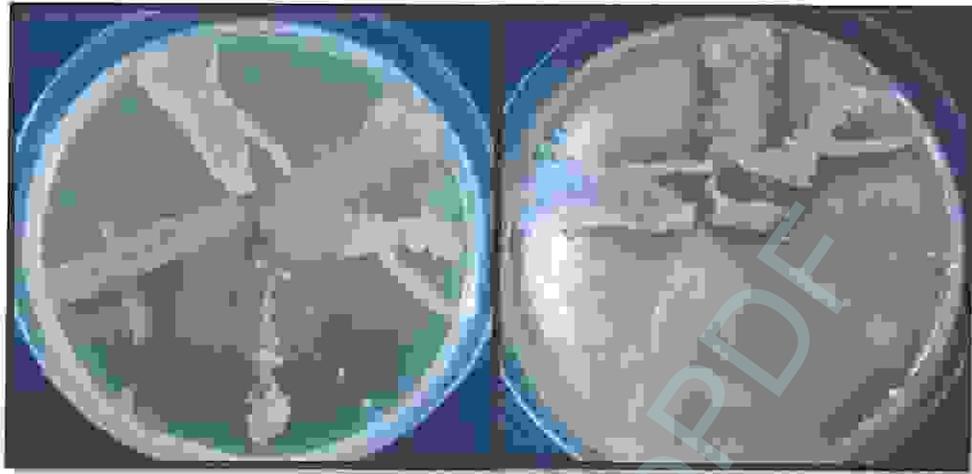


Figure 10 : Résultat avant et après de test DNase +

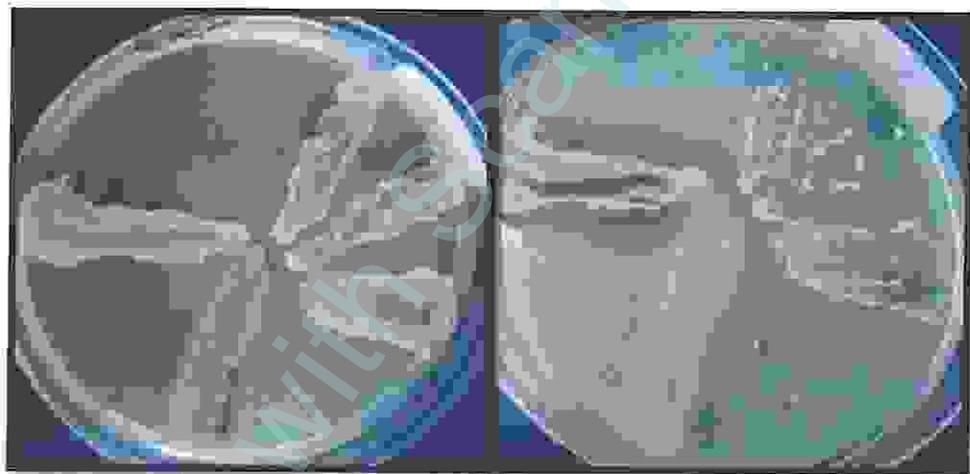


Figure 11 : Résultat avant et après de test DNase -

### 5- Identification biochimique des cocci Gram +

L'API Staph nous a permis d'enregistrer les résultats suivants :

Tableau 13 : résultats des tests biochimiques pour l'identification des cocci Gram positifs (système Api Staph)

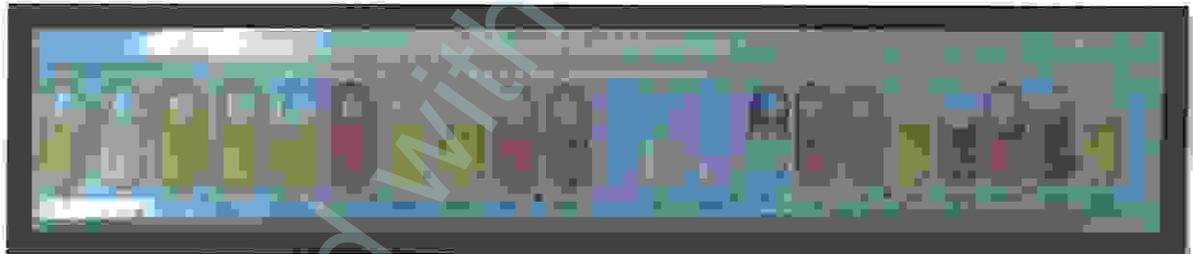
Test	N°	Souches				
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>	
0		-	-	-	-	
GLU		+	+	+	+	
FRU		+	+	+	+	
MNE		+	-	+/-	+	
MAL		+	+	+	+	
LAC		+	+	+/-	-	
TRE		+	+	+	+	
MAN		+	+	-	+	
XLT		-	-	-	-	
MEL		-	-	-	-	
NIT		+	-	/	-	
PAL		/	/	/	/	
VP		+	+	+	+	
RAF		-	-	-	-	
XYL		-	-	-	-	
SAC		+	+	+	+	
MDG		-	-	-	-	
NAG		-	+	+/-	-	
ADH		+	-	-	+	
URE		+	+/-	+	+	
MOB		-	-	-	-	
Coagulase libre		+	-	-	-	
CAT		+	+	+	+	
OXY		-	-	-	+	
DNase		+	-	+	-	



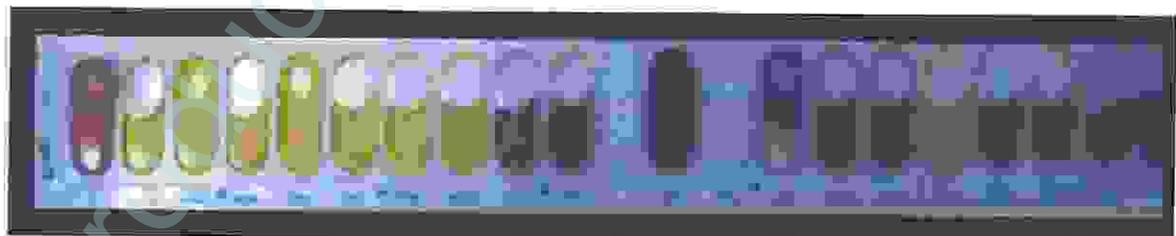
Profil de la souche *Staphylococcus saprophyticus*



Profil de la souche *Staphylococcus hominis*



Profil de la souche *Staphylococcus Warneri*



Profil de la souche *Staphylococcus aureus*

Planche 3 : illustration des profils des souches identifiées par le système API Staph

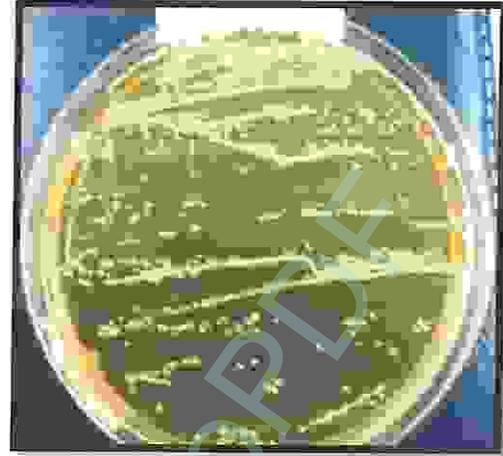
➤ La caractérisation de *Staphylococcus epidermidis* est obtenue par les tests : DNase, mannitol, coagulase négative, alors que la présence de *Staphylococcus saprophyticus* est confirmée par une DNase et coagulase négative, et mannitol positive. (Tab.14).

Tableau14 : Identifications des Staphylocoques avec les tests (catalase, test mannitol, coagulase, et DNase).

Les tests *pv *espèces	Test catalase	Test mannitol	Test coagulase	Test DNase
B2 = (10) <i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	-	-	-
B1 = (9) <i>staphylococcus épidermidis</i>	+	-	-	-
RB <sub>1</sub> =(2) <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	+	+	-	-
RA1=(2) <i>Staphylococcus épidermidis</i>	+	-	-	-



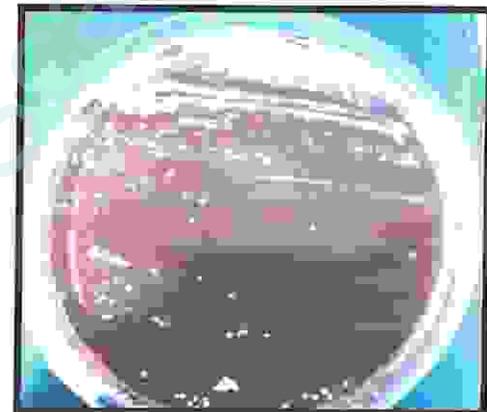
*Staphylococcus epidermidis*



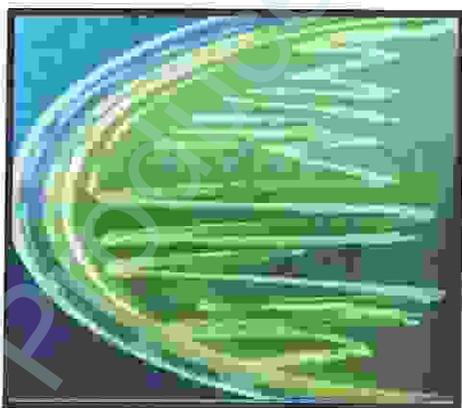
*Staphylococcus aureus*



*Staphylococcus épidermidis*



*Staphylococcus warneri*



*Staphylococcus saprophyticus*



*Staphylococcus hominis*

Planche 4 : aspect macroscopique des staphylococcus isolées après repiquage

## Discussion

Selon les résultats obtenus des analyses microbiologiques sur les échantillons prélevés de l'air à partir des deux services (bloc opératoire, salle de réanimation), on a remarqué que :

Les différents tests effectués à partir des deux prélèvements ont montré qu'il y a une prédominance des champignons filamenteux et des *Staphylocoques* qui sont souvent rencontrés en milieux hospitaliers et qui peuvent être incriminés dans les infections nosocomiales.

Les espèces bactériennes identifiées sont soit pathogène spécifique, c'est le cas de *Staphylococcus aureus*, soit pathogène opportunistes, c'est le cas de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus warneri*.

La répartition des microorganismes dans les deux services est comme suit :

\* sur le milieu Sabouraud on a remarqué que les champignons sont plus nombreux dans la salle de réanimation par contre ils sont presque absents dans le bloc opératoire.

\* la présence de *Staphylococcus aureus* est uniquement observée dans la salle de réanimation.

\* la présence de *Staphylococcus epidermidis* est présente dans les deux services (bloc opératoire, salle de réanimation) avec une abondance par rapport aux autres espèces identifiées.

L'existence de cette variété d'espèces microbiennes au niveau de ces deux sites plus au moins en contact direct avec le malade peut être expliquée par des contaminations croisées dues au mouvement des personnes dont la dissémination des germes dans l'air, se fait par la toux, l'éternuement, et les particules Pflüggs.

### Conclusion

L'hôpital, conçu pour mieux soigner et guérir les malades, peut à tout moment les exposer à un danger fatal.

Les infections nosocomiales peuvent toucher n'importe quel service et spécialement le bloc opératoire, la salle de réanimation ou on enregistre une diversité de micro-organismes dont la présence des bactéries pathogènes exposées aux malades, dont l'état physiologique est fragile, causent des affections non négligeables.

Les différents prélèvements effectués sur l'air des services (bloc opératoire, salle de réanimation), de l'hôpital Hakim Okbi - Guelma, révèlent la présence de différentes espèces du genre *Staphylococcus*: *Staphylococcus aureus*, avec une prédominance de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus hominis* et *Staphylococcus warneri*.

Il convient de signaler que la présence des bactéries dans le milieu hospitalier, notamment dans l'air ambiant n'est pas une condition suffisante pour les impliquer dans la survenue d'une infection, celle-ci exige l'association de plusieurs facteurs liés aux microorganismes, la voie de transmission, la porte d'entrée et la réceptivité de l'hôte. Par ailleurs, le contrôle de l'air hospitalier nécessite un traitement par un ensemble de procédés mécaniques, chimiques et physiques pour évaluer l'efficacité de la stérilisation surtout dans le bloc opératoire.

L'importance de cette étude est de montrer la gravité du problème de santé publique que provoquent les infections nosocomiales, donc pour pallier à ce problème, la prévention, le respect des règles d'hygiène et un traitement efficace de l'air, resteront les meilleurs moyens à mettre en application.

# Les références bibliographiques

## 1. Les livres :

- (1)- **Alioua Souad, Derradjia Amira, Guezgouz Meriem** : Mémoire de fin d'étude en vue d'obtention du diplôme de Master «microflore vaginale –isolement-identification et antibiogramme », université Badji Mokhtar –Annaba- 2010.
- (2)- **Avril. J.L, Carlet. J (1998)** : Les infections nosocomiales et leur prévention Ellipses, 679 p.
- (3)-**Avril-J.L, H. Dabernat, F. Denis, H. Monteil, (2000)** : Bactériologie médicale, Ellipses 3e Ed, 601 p.
- (4)-**Béraud J. (2001)** : le technicien d'analyse biologique Guide théorique et pratique. Édition Lavoisier Technique et documentation, P.967-973
- (5)-**Bergeron V, Metahni A (2009)** : «la qualité de l'air intérieur : une préoccupation croissante» Annales des falsifications, de l'expertise chimique et toxicologique, 971P
- (6)-**Brücker. G (1998)** : Infections nosocomiales et environnement hospitalier Médecine – Sciences Flammarion, 1998, 217 p.
- (7)-**Dellarras C.1998** : Microbiologie : 90 heures de travaux pratiques. Gaëtan Morin Editeur, p.276.
- (8)-**Delarras Camille 2007** : Microbiologie pratique pour le laboratoire (D'analyse ou de contrôle sanitaire). Editions médicales internationales (TEC & DOC), P476
- (9)-**Denis. F, M-C. Ploy, C. Martin, E. Bingen, R. Quentin (2007)** : Bactériologie médicale, Techniques usuelles Masson, 573 p.
- (10)-**Flandrois. J.P(1997)** : Presses Universitaires de Lyon, Bactériologie médicale (Collection AZAY sous la direction de **J.P. Flandrois**)
- (11)-**Guide Uniclisma 1995.** – Traitement de l'air en milieu hospitalier – Editions Separ.
- (12)-**Hart T. & Shears P. (1999)** : Atlas de poche de microbiologie. Médecine-Science. p. 240, 242.
- (13)-**Hygis. N-(1988)** : hygiène hospitalière, collection azay (Presses universitaire de Lyon). P658

- (14)-Hygis. N (2010) : Hygiène hospitalière, Editions Sauramps Médical, (Montpellier – Paris), 513 p. [www.saurampsmedical.com](http://www.saurampsmedical.com)
- (15)-Joffin J.N. & Leyral G. (2006) : microbiologie technique. Dictionnaire des techniques. 4<sup>ème</sup> édition, p.207-209.
- (16)-Joffin J.N. & Leyral G. (1998) microbiologie technique. Dictionnaire des techniques. 2<sup>ème</sup> édition, p.73-74-146.
- (17)-Maser Copy 2009-2011 : cours S4 médecine : Bactériologie infectieux, 82P
- (18)-Nauciel C & Vildé J.L (2005) : Bactériologie Médicale.2<sup>ème</sup> édition, P6
- (19)- Patrick Berche, Jean-Louis Gaillard, Michel Simonet (1989) : Bactériologie (les bactéries des infections humain). Médecine-Science-Flammarion, P660
- (20)- RUTY D. 1998 : « Les méthodes de stérilisation », revue Soins n°623, Ed Masson, Paris, pp.7-12.
- (21)-13-Squinazi. F (1990) : Contrôle de la qualité microbiologique de l'air des salles d'opération – Inter Bloc –tome 9, no 3, p12-14.
- (22)-14-Squinazi F. (1995) : La maîtrise de l'environnement microbien à l'hôpital. A propos de L'aérobiocontamination - Chauffage, Ventilation, conditionnement d'air – p51-56.
- (23)- Vanhée JM .2002 : Solutions de filtration d'air en milieu hospitalier – Chauffage, Ventilation, conditionnement d'air – no 3, – Tiré à part.
- (24)- Veyssier. P, Domart. Y (1996): Abrégés : Infections nosocomiales Masson, 158 p.
- (25)-Boussadia M .I, Bouzidi R, (2005) : isolement et identification des bactéries à partir de l'air hospitalier (Hôpital ibn Rochd- Annaba
- (26)-POPI. Maladies infectieuses. Paris : APPIT ,1999 :159-169.

## 2. Les sites web :

[27] -Épidémiologie et Les modes de transmission des infections nosocomiales : [Visité le 27/02/2011]

[http://fr.wikipedia.org/wiki/Infection\\_nosocomiale](http://fr.wikipedia.org/wiki/Infection_nosocomiale)

[28]- définition des infections nosocomiales Dossier rédigé par Elisabeth Faure, novembre1999 : [visite Le 27/02/2011]

<http://www.caducee.net/DossierSpecialises/infection/nosocomiales.asp>

[29]- QU'EST-CE QU'UNE infection nosocomiale [visité Le 27/02/2011]

[http://www.securitesoins.fr/infections/qu-est-ce-qu-une-infection\\_nosocomiale/qu-est-ce-qu-une-infection\\_nosocomiale\\_fr\\_05\\_01\\_01.html?gclid=CMe675HKqKcCFUODDgodyezCQ](http://www.securitesoins.fr/infections/qu-est-ce-qu-une-infection_nosocomiale/qu-est-ce-qu-une-infection_nosocomiale_fr_05_01_01.html?gclid=CMe675HKqKcCFUODDgodyezCQ)

[30]- les facteurs favorisant une infection nosocomiales

<http://www.remede.org/documents/article361.html>

[31] -les micro-organismes responsables d'infection nosocomiales :

<http://www.cclinparisnord.org/Usagers/accueil/Acc.htm>

[32]- Prévention contre les infections nosocomiales

<http://www.vulgaris-medical.com/encyclopedie/nosocomiales-infections-5710/prevention.html>

[33]- Les prévalences épidémiologique des infections nosocomiales (OMS) :

<http://www.inserm.fr/thematiques/microbiologie-et-maladies-infectieuses/dossiers-d-information/infections-nosocomiales>

[34] -Les infections nosocomiales – [visité le 12/02/11] :

<http://www.caducee.net/DossierSpecialises/infection/nosocomiales.asp>

[35]- La lutte contre les infections nosocomiales – [visité le 23/02/11] :

[http://www.sante.gouv.fr/htm/actu/34\\_980901.htm](http://www.sante.gouv.fr/htm/actu/34_980901.htm)

**[36]-zones à risques et traitement de l'air Docteur Fabien SQUINAZI Laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris**

<http://www.rrhbn.org/attachments/026 Resume%20Squinazi.pdf>

**[37]- les infections nosocomiales sont très couteuses pour la collectivité puisqu'elles ?**

<http://www.remede.org/documents/article361.html>

**[38]- la techniques de coloration au bleu de méthylène :**

<http://www.arnobio2.com/colorations/bleu-de-méthylène.pdf>

**[39]- Principe et technique de test DNase :**

<http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/FR-PA-255506.pdf>

**[40] -La prévention de l'infection nosocomiale**

**«Protéger la population par la prévention et le contrôle des infections »**

[http://www.cno.org/docs/prac/51002\\_infection.pdf](http://www.cno.org/docs/prac/51002_infection.pdf)

Produced with ScanTopDF

# ANNEXES

Produced With ScantOPDF

TESTS	SUBSTRATS	REACTIONS/ ENZYMES	RESULTAT	
			NEGATIF	POSITIF
0	Aucun	Témoïn négatif	Rouge	-
GLU FRU MNE MAL LAC TRE MAN XLT MEL	D-Glucose D-Fructose D-Mannose Maltose Lactose D-Trehalose D-Mannitol Xylitol D-Mélibiose	(Témoïn positif)  Acidification à partir du carbohydrete	Rouge	jaune
NIT	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites	incolore	<u>NIT 1 + NIT 2/10min</u> rouge-rose pâle
PAL	B-naphtyl ac.phosphate	Phosphate alcaline	Jaune	<u>ZYM A + ZYM B/10min</u> Violet
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétyl méthyl- carbinol	Incolore	<u>VP 1 + VP 2/10min</u> Violet-rose
RAF XYL SAC MDG NAG	Raffinose Xylose Saccharose A-méthyl-D-glucoside N-acétyl-glucosamine	Acidification à partir du carbohydrete	Rouge	jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange-rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge-violet

Annexe 1 : Tableau de lecture API Staph.

API STAPH V4.1	0	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYU	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	LSTH
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	100	100	95	96	80	91	30	0	0	83	97	78	1	0	97	2	90	80	80	0
<i>Staphylococcus auricularis</i>	0	100	99	38	72	10	90	9	0	0	81	0	1	0	0	40	0	15	90	1	0
<i>Staphylococcus capitis</i>	0	100	99	80	43	22	2	30	0	0	86	23	90	0	0	50	0	1	85	35	0
<i>Staphylococcus caprae</i>	0	100	99	70	10	75	74	10	0	0	99	95	99	0	0	0	0	1	99	80	0
<i>Staphylococcus carnosus</i>	0	100	100	99	0	99	99	99	0	0	99	83	83	0	0	0	0	100	100	0	0
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	0	100	100	99	79	100	100	13	0	0	96	96	1	0	1	100	0	31	89	85	0
<i>Staphylococcus cohnii ssp cohnii</i>	0	100	99	66	99	2	97	88	33	0	21	88	94	0	0	2	0	9	2	1	0
<i>Staph cohnii ssp arealyticum</i>	0	100	100	99	98	89	100	94	64	0	1	94	87	0	0	0	0	98	0	99	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	100	99	70	99	81	2	0	0	1	80	84	68	1	0	97	4	18	73	88	0
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0	99	75	5	99	90	99	00	0	1	78	3	57	0	0	98	13	83	85	1	0
<i>Staphylococcus hammonis</i>	0	98	94	41	37	50	86	28	0	1	82	27	70	1	0	97	4	50	43	84	0
<i>Staphylococcus hyicus</i>	0	100	99	99	0	37	99	0	0	0	90	90	15	0	0	99	2	93	100	68	0
<i>Staphylococcus lentus</i>	0	100	100	100	100	100	100	100	7	99	92	21	57	100	100	100	28	100	0	1	0
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	0	100	99	38	99	66	99	0	0	0	99	16	93	0	0	100	0	90	1	50	0
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0	100	99	2	97	90	99	83	22	0	35	14	79	1	0	98	1	70	30	65	0
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	0	100	30	100	0	1	71	0	0	0	99	97	99	0	0	0	0	94	99	0	0
<i>Staphylococcus solni</i>	0	99	99	99	48	70	93	98	0	0	83	67	30	0	16	95	7	68	0	0	0
<i>Staphylococcus simulans</i>	0	100	100	57	11	95	92	73	4	0	83	27	38	0	4	97	2	90	97	84	0
<i>Staphylococcus warneri</i>	0	99	99	50	38	19	96	70	0	0	23	16	90	0	0	99	0	6	77	97	0
<i>Staphylococcus xylosum</i>	0	100	100	32	81	86	95	90	30	9	82	75	67	11	82	87	10	80	5	90	0
<i>Kocuria kristinae</i>	0	99	95	99	90	9	84	3	0	0	8	3	93	0	0	90	12	0	0	0	97
<i>Kocuria varians/rosea</i>	0	91	97	8	1	1	8	1	0	0	75	4	8	4	8	4	0	1	1	29	95
<i>Micrococcus spp</i>	0	2	4	0	1	0	1	0	0	0	8	15	1	0	0	1	0	1	11	11	31

Annexe 2 : Tableau d'identification API Staph.