



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département: Microbiologie

قسم: الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Science Biologique

Spécialité: Mycologie et Biotechnologie Fongique

Intitulé :

Contamination fongique et bactérienne notées dans les services de réanimation et de chirurgie de l'EHS de la Pédiatrie, Mansourah, Constantine

Présenté et soutenu par : GUERBAS Chourouk

Le : 06/09/2020

BELAHOUER Mohammed

TURKI Rayene

Jury d'évaluation :

Président du jury : M^{me} BENKAHOUL Malika (M.C.B- UFMC).

Rapporteur : M^{me} ABDELAZIZ Ouided (M.C.B- UFMC).

Examineurs : M^{me} MEZIANI Meriem (M.A.A- UFMC).

*Année universitaire
2019- 2020*

Remerciements

Nous tenons d'abord à remercier Mme. ABDELAZIZ, pour son accueil, le temps passé ensemble et le partage de son expertise au quotidien. Grâce aussi à sa confiance, nous avons pu nous accomplir totalement dans nos missions. Elle fut d'une aide précieuse dans les moments les plus délicats.

Nous tenons à exprimer notre très grande considération à Mme. BENKAHOUL et Mme. MEZIANI d'avoir accepté de juger ce travail.

Nous tenons aussi à remercier et exprimer notre gratitude envers Dr. AISSAOUI, de nous avoir donné la chance de travailler dans d'excellentes conditions notre projet de fin d'études, de nous avoir accueilli, conseillé, et supervisé tout au long des 3 mois passés au Laboratoire Central d'Etablissement Hospitalier De Pédiatrie Mansourah Constantine.

Nous voudrions également remercier Dr. BENHAMOUDE, qui s'est toujours empressé de nous venir en aide au moindre problème rencontré que nous n'arrivions pas à résoudre seuls, et pour son soutien tout au long du stage.

Nous remercions tous nos enseignants pour tout le savoir qu'ils nous ont transmis. Nous remercions en particulier Mme. BOUCHLOUKH qui a toujours fait preuve de rigueur scientifique, d'ouverture et de disponibilité.

Nous remercions vivement toutes les personnes qui, durant nos cursus, ont apporté leur soutien, leurs conseils et leurs encouragements.

Dédicace

A cœur vaillant rien d'impossible, quand il y a la soif d'apprendre, tout vient à point à qui sait attendre. Quand il y a le souci de réaliser un dessin, tout devient facile pour arriver à nos fins, souhaitant que le fruit de nos efforts fournis jour et nuit, nous mènera vers le bonheur fleuri.

Je dédie ce mémoire :

A ma chère mère Wassila, affable, honorable, aimable. Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance. Je dédie ce travail en témoignage de mon profond cœur. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon cher Père, aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A mon très cher frère Seif Eddine, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. Mon ange gardien et mon fidèle compagnon dans les moments les plus délicats de cette vie mystérieuse.

A mes chères sœurs Khaoula et Imene, vous avez toujours été présentes pour les bons conseils. Votre affection et votre soutien m'ont été d'un grand secours au long de ma vie professionnelle et personnelle.

A ma chère amie Mimi, je ne peux trouver les mots justes et sincères pour exprimer mon affection et mes pensées, tu es pour moi sœur et amie sur qui je compte.

Chourouk GUERBAS

Dédicace

JE DEDIE CE MODESTE TRAVAIL

A mes chers parents je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Puisse dieu, le très haut, vous accorder sante, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

A mes adorables sœurs, Dounia la prunelle de mes yeux et son mari amine le généreux que je l'aime sans oublier mon petit neveu Anes l'amour de ma vie, Hanane la douce au cœur si grand, Meryem ma petite et la plus proche de mon cœur, témoignage de mon affection fraternelle du bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant vous protège et vous garde.

A Mes Amis De toujours, Mahmoud, SiiZiad, Seif, Rgheb, Ilyes, Redha, Massi, Dalid, Ibrahim, Lotfi, Nounou, Mohammed, Haitem, Nouzha, Ines, Chourouk, Rayen, Yasmine, Dounia, Soumia...

En souvenir de notre sincère et profonde amitié se des moments agréables que nous avons passés ensemble, je vous remercie.

Mohammed BELAHOUER

Dédicace

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos profondes gratitude :

À Dieu le tout puissant
En ce moment particulier dans ma vie,
Je tiens à dédier ce modeste travail à :

Ma chère maman, la lumière de ma vie qui m'a toujours soutenu en toutes circonstances et qui me donnent de la force et la volonté d'avancer et **mon cher papa** qui a sacrifié toute sa vie à fin de me voir devenir ce que je suis, je vous dis infiniment merci que dieu vous garde et vous accorde longue vie.

Mes chères frères, Abd el mohaymen et Mohammed que dieu vous protège et vous garde.

Ma belle-famille, Nacer, Ghania, et Ali merci pour votre soutien.

Mon Fiancé Oussama, merci pour votre amour et votre soutien.

Mes grands-mères, Zayneb, MAMA Malika Tu restes dans mes pensées et dans mon cœur

Mon oncle Maamar, il m'a toujours soutenu et encouragé, Que ton âme repose en paix.

A Mes Amis De Toujours, Hadil la plus proche de mon cœur, Samah, Meissa, Leila, Sadjed, Iyed, Ikram, Rania, Wafa, Chourouk, Mohamed

Mes tantes, Samah, Souad, Doumia, Mounira, Bassma

Mes oncles, Khaled, Massinissa, Mourad, Tahar, Salah

Rayene TURKI

Sommaire

Remerciements

Dédicace

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....	1
Chapitre I : Contamination de l'environnement hospitalier.....	3
1.Environment hospitalier.....	3
2.Contamination de l'environnement hospitalier par les micro-organismes.....	3
2.1.Eau.....	4
2.2.Air.....	4
2.3.Surface.....	5
3.Hygiène de l'environnement hospitalier.....	5
Chapitre II: Les principaux microorganismes rencontrés dans le milieu hospitalier.....	7
1.Introduction.....	7
2.Les germes responsables en milieu hospitalier.....	7
2.1.Les bactéries.....	7
2.1.1.Bactéries à Gram négatif.....	8
2.1.1.1. <i>Escherichia</i>	8
2.1.1.2. <i>Klebsiella</i>	9
2.1.1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
2.1.2.Bactéries à Gram positif.....	11
2.1.2.1.Les <i>Staphylocoques</i>	11
2.1.2.2.Les <i>Streptocoques</i>	13
2.2.Les champignons.....	14
2.2.1.Moisissures.....	14
2.2.2.Levures.....	16
2.3.Virus.....	17
2.4.Parasites.....	17
Matériels et méthodes	18
1.Lieu d'étude.....	18
2.Techniques de prélèvement.....	18
2.1.Prélèvement à partir des surfaces.....	18
2.2.Prélèvement à partir de l'atmosphère hospitalière.....	22
3.Isolement.....	22
3.1.Isolement des germes prélevés à partir des surfaces.....	22
3.1.1.Isolement des bactéries.....	22
3.1.2.Isolement des champignons.....	22
3.2.Isolement des germes prélevés à partir de l'atmosphère hospitalière.....	23
4.Purification des microorganismes.....	24
4.1.Purification des bactéries.....	24
4.2.Purification des champignons.....	24
5.Identification des microorganismes.....	24
5.1.Identification des bactéries.....	24
5.1.1.Identification macroscopique.....	24

5.1.2. Identification microscopique.....	25
5.1.3. Etude des caractères biochimiques.....	26
5.1.3.1. La galerie biochimique classique.....	26
5.1.3.2. Test coagulase.....	29
5.2. Identification des champignons.....	30
5.2.1. Identification des moisissures.....	30
5.2.1.1. Identification macroscopique.....	30
5.2.1.2. Identification microscopique.....	30
5.2.2. Identification des levures.....	31
5.2.2.1. Observation macroscopique.....	31
5.2.2.2. Observation microscopique.....	31
5.2.2.3. Tests d'identification des levures.....	32
6. Etude de la sensibilité des souches.....	35
6.1. Etude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.....	35
6.1.1. L'antibiogramme.....	35
6.2. Etude de la sensibilité des champignons aux antifongiques.....	38
6.2.1. L'antifongigramme.....	38
Résultats.....	42
1. Identification des microorganismes isolés à partir des surfaces.....	42
1.1. Identification des bactéries.....	42
1.1.1. Etude des caractères macroscopiques des bactéries.....	42
1.1.2. Etude des caractères microscopiques des bactéries.....	44
1.1.3. Etude des caractères biochimiques des bactéries isolées.....	45
1.2. Identification des champignons.....	46
1.2.1. Identification des moisissures.....	46
1.2.1.1. Etude des caractères macroscopiques.....	46
1.2.1.2. Etude des caractères microscopiques des moisissures.....	48
1.2.2. Identification des levures.....	50
1.2.2.1. Etude des caractères macroscopiques des levures isolées.....	50
1.2.2.2. Etude des caractères microscopiques des levures.....	51
1.2.2.3. Identification des levures par le test de Blastèse et de Chlamydosporulation.....	52
1.2.2.4. Identification par la galerie api 20C AUX.....	53
2. Identification des microorganismes isolés à partir de l'atmosphère hospitalière.....	53
2.1. Identification des bactéries.....	53
2.2. Identification des champignons.....	54
2.2.1. Etude des caractères macroscopiques des moisissures isolées à partir d'air.....	55
2.2.2. Etude des caractères microscopiques des moisissures isolées à partir d'air.....	57
3. Etude de la sensibilité des souches isolées.....	59
3.1. Etude de la sensibilité des bactéries prélevées à partir des surfaces.....	59
3.1.1. Etude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.....	59
3.2. Etude de la sensibilité des champignons vis-à-vis les antifongiques.....	60
Discussion.....	61
Conclusion.....	65
Références bibliographiques	
Résumés	
Annexes	

Liste des abréviations

EUCAST: *L'Européen Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.*

GLU: Glucose.

Lac: Lactose.

ONPG: Ortho-Nitro-Phényl-Galactopyranoside.

REA: Réanimation

SAC: Saccharose

TSI: *Three Sugar Iron*

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Les milieux de cultures utilisés en bactériologie	22
02	Préparation des boîtes de sédimentation	23
03	La galerie biochimique classique	26
04	Test de Blastèse	32
05	Test d'antibiogramme	37
06	Aspect macroscopique des levures sur milieu Sabouraud	51
07	Examen à l'état frais des levure vu au microscope optique	51
08	Identification des levures par les tests de Blastèse et de chlamydo-spore	52
09	Résultats de la galerie biochimique api 20C AUX	53
10	Résultats des prélèvement d'air	53
11	Moisissures sélectionnées	54
12	L'antibiogramme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
01	Les sites des prélèvements d'environnement hospitalier	19
02	Le but et les méthodes d'examen microscopique	25
03	Les caractéristiques de la galerie biochimique classique	27
04	Ensemble des caractères macroscopique	31
05	Système d'identification des levures	33
06	Les antibiotiques testés contre les bactéries isolées	35
07	Conditions d'incubation des bactéries isolées	38
08	Les antifongiques testés contre les souches fongiques isolées	39
09	Les conditions d'incubation des champignons isolés	40
10	Résultats d'isolement des différents prélèvements effectués	42
11	Résultats de l'examen microscopique à l'état frais et après coloration	45
12	Résultats d'identification des germes isolés à partir des surfaces	45
13	Caractères macroscopiques des souches fongiques isolées à partir des surfaces	46
14	Caractères microscopiques des souches fongiques isolées à partir des surfaces	48
15	Résultats des tests de Blastèse et de chlamydosporulation	52
16	Caractères macroscopiques des souches fongiques isolées à partir de l'environnement hospitalière	55
17	Caractères microscopiques des souches fongiques isolées à partir de l'atmosphère hospitalière	57
18	L'antibiogramme des bactéries isolées de l'environnement hospitalier	59
19	L'antifongigramme des souches fongiques isolées à partir de l'environnement hospitalier	60

Introduction

Introduction

L'environnement dans les établissements hospitaliers, est un milieu susceptible d'être contaminé directement ou indirectement par des agents nuisibles à la santé humaine. Cette situation affecte la qualité des soins et par conséquent, retarde la guérison des patients et complique la conduite thérapeutique des équipes médicales en exercice.

Les facteurs de cet environnement air, eau, surfaces apparentes et cachées, matériels médicaux (respirateur, seringue électrique, ciseaux, pinces...), ainsi que des locaux (murs, toiture, poignée de porte, montants de lits ..), et en fin le personnel peuvent inéluctablement se présenter comme des niches ou des incubateurs d'agents pathogènes (bactéries, virus, champignons et parasites), responsables de pathologies nosocomiales. Ces dernières ont augmenté en crescendo ces dix dernières années et leur prévalence ne cesse d'augmenter significativement pour puiser la trésorerie suite à l'utilisation massive des médicaments et matériel médical (**Le Heurt et al., 1995**).

Le risque de contracter une infection à l'hôpital a toujours existé et ce risque s'est accru avec l'évolution des pratiques de soin et d'hospitalisation de patients. La pratique de soins plus efficaces mais souvent plus invasives s'est accompagnée d'une possibilité de contamination par des micro-organismes d'origine endogène ou exogène. De plus, l'hospitalisation de patients s'est modifiée en particulier avec la prise en charge de personnes de plus en plus vulnérables à l'infection (patients immunodéprimés, interventions chirurgicales lourdes, patients présentant plusieurs pathologies graves, patients polytraumatisés en réanimation) (**Samou, 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 de 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**).

Parce qu'il doit utiliser largement les antibiotiques et les antifongiques, l'hôpital est un lieu privilégié pour le développement des résistances bactériennes et fongiques. Il héberge ainsi de nombreuses bactéries, et champignons multi-résistants qui survivent dans cet environnement des semaines et parfois des mois. Ils ont une grande capacité de résistance aux agressions chimiques et résistent à de nombreux détergents. On les retrouve partout, sur les surfaces planes, la literie, le mobilier, les poignées de porte, les téléphones, les commandes de

Introduction

télévision, les claviers d'ordinateurs, les stéthoscopes, les brassards de tensiomètres. ils sont dans l'air ambiant, les canalisations d'eau où ils forment des bios films résistants à la plupart des détergents(**Harley et Klein, 2010**).

Notre travail s'articule sur :

- La détermination du degré de contamination de l'environnement au niveau des différents services réanimation et chirurgie de l'Etablissement Hospitalier Spécialisé De Pédiatrie Mansourah Constantine.
- La purification et l'identification des souche bactériennes et fongiques.
- L'étude de la résistance et la sensibilité aux antibiotiques et antifongiques.

Revue Bibliographique

Chapitre I : Contamination de l'environnement hospitalier

1. Environnement hospitalier

L'environnement hospitalier regroupe habituellement l'ensemble des éléments liquides, solides ou gazeux qui environnent ou entrent en contact avec les patients, les visiteurs ou le personnel dans une structure hospitalière. Entrant dans cette définition l'air (médical ou atmosphérique), les surfaces inertes (mobilier, linge, instrumentation,...), les surfaces vivantes (les mains du personnel), les eaux (de réseau, de piscine et de dialyse), les solutés (préparations injectables, solutions d'antiseptiques, pommades,...) et l'alimentation. (**Le Heurt et al., 1995**).

L'environnement hospitalier représente le réservoir potentiel d'organismes impliqués dans les infections nosocomiales, donc il est largement contaminé par des micro-organismes d'origine humaine ou spécifiquement environnementaux. Cette contamination varie qualitativement et quantitativement dans le temps, d'un établissement à un autre et, au sein d'un même établissement, en fonction des services, des patients, des soins et techniques pratiqués (**Barbut et Neyme, 2006**). Les microorganismes présents dans l'environnement hospitalier sont extrêmement variés (bactéries, levures, champignons filamenteux, virus et parasites) et peuvent appartenir aussi bien aux espèces opportunistes qui ne manifestent leur virulence que sur un organisme dont les défenses immunitaires sont affaiblies, qu'aux espèces habituellement pathogènes pour l'homme. La capacité de créer une infection découle d'une combinaison de facteurs associant le niveau d'expression des facteurs de virulence du microorganisme, sa quantité ou sa concentration, le mode de contamination (aérienne, hydrique...) et la réceptivité de l'hôte.

2. Contamination de l'environnement par les microorganismes

L'environnement hospitalier abrite de nombreuses sources de germes qui constituent parfois de véritables niches écologiques. Les surfaces sont régulièrement colonisées par des microorganismes : Ces microorganismes sont d'origines diverses et peuvent être issus de patients, du personnel soignant ou des visiteurs (**Bertou, 2000**). La principale source de contamination est la flore d'origine humaine (flore digestive, respiratoire, cutanée, ...), Plus rarement, le matériel et l'environnement aérien ou hydrique peuvent être des sources de contamination nosocomiale. Les infections d'origine environnementales peuvent être liées à

une contamination à partir d'un réservoir situé dans l'environnement à proximité du malade (dispositifs médicaux, surfaces) ou à partir d'un réservoir situé dans l'environnement général de l'hôpital (eau, air). Cette contamination est diffuse et sa maîtrise, qui entraîne des procédures contraignantes, complexes et coûteuses, n'est le plus souvent que partielle et transitoire(Lucet et Astragneau., 1998).

2.1.Eau

L'eau joue deux rôles principaux :

- Un réservoir émetteur et les exemples les plus frappants sont constitués par la présence de *Legionella* dans les réservoirs d'eau chaude ainsi que la colonisation quasi permanente des siphons d'installation sanitaire par *Pseudomonas aeruginosa*.
- Un transmetteur par la libération de microorganismes.

A l'intérieur de l'établissement hospitalier, les microorganismes en quantité faible peuvent proliférer au niveau des bras morts, des extrémités des canalisations, des brise-jets des robinets, des pommes de douche et dans les circuits d'eau chaude .Une contamination par voie rétrograde peut survenir au niveau des différents points d'usage et des dispositifs branchés sur le réseau (machines à laver les instruments, trompes à vide, ...) (Bertrou *et al.*, 2000).

2.2Air

L'hôpital est un lieu privilégié, car c'est le lieu de rencontre des malades et des soignants avec les microorganismes qu'ils hébergent. Il y a donc un danger potentiel de contamination de l'air par des microorganismes pathogènes; l'air intervient dans les conditions habituelles comme plus un transporteur qu'une source véritable de germes(Audurier *et al.*, 1998).

Les microorganismes de l'air sont véhiculés sur des supports de tailles variables: les poussières, les squames cutanées (dans les services de grands brûlés), les gouttelettes ou les microgouttelettes de salive émises lors de la toux, des éternuements et de la parole et les noyaux de condensation issus de ces gouttelettes Les plus grosses particules sédimentent en quelques minutes alors que les plus petites peuvent rester en suspension plusieurs heures, diffuser à distance et pénétrer par inhalation jusque dans les alvéoles pulmonaires des patients (Barbut et Neyme, 2006).

2.3. Surface

Les surfaces peuvent être divisées en deux groupes :

- Celles où le contact avec les mains est minime : les planchers et les plafonds.
- Celles dont les mains sont souvent en contact : poignées de porte, les ridelles, interrupteurs, les zones des murs autour des toilettes dans la chambre des patients, les bordures des rideaux,...

Les surfaces sont contaminées soit par contact ou par sédimentation des microorganismes présents dans l'air. En effet, la bio contamination des surfaces se fait par contact (chaussures, roues de chariot,...), par rinçage ou par sédimentation des particules en suspension dans l'air (**Mereghetti, 1998**).

La contamination des surfaces a trois origines :

- L'air qui véhicule sous forme d'aérosols des amas bactériens qui sont capables de sédimenter et de coloniser le milieu (**Bosi, 2000**).
- Le contact des patients infectés par des bactéries multi résistantes avec des surfaces inertes les rendent généralement contaminées. Cette contamination peut persister des heures, voire des semaines sur des surfaces sèches. Le personnel médical, les travailleurs et d'autres patients peuvent être contaminés par contact direct avec ces surfaces qui par la suite deviendront un réservoir de microorganismes dans l'hôpital (**Rutala et Weber, 2001**).
- L'eau qui contamine les surfaces et les dispositifs médicaux par rinçage (inoculation de mycobactéries à partir d'un matériel chirurgical contaminé par l'eau du robinet après désinfection) (**Lucet et Astagneau, 1998**).

3. Hygiène de l'environnement hospitalier

L'hygiène hospitalière est l'ensemble des mesures systématiques et individualisées permettant de prévenir les infections nosocomiales. Les mesures systématiques sont des précautions d'hygiène à prendre automatiquement dont notamment la maîtrise de l'environnement du patient, la conception architecturale de l'établissement qui s'apprête à l'application des principes d'hygiène, le choix des équipements techniques et biomédicaux les plus appropriés vis-à-vis de l'hygiène, les comportements individuels et collectifs, l'hygiène des locaux, l'hygiène du matériel dont la désinfection et la stérilisation des instruments de travail (**Chouitar, 2004 ; Fikri Ben Brahim, 2006**).

Chapitre I : Contamination de l'environnement hospitalier

L'hygiène de l'environnement c'est d'abord l'hygiène de l'environnement de la personne malade. Cet environnement concerne tout ce qui, de près ou de loin, concourt à la prise en charge d'un malade durant son hospitalisation, du hall-d'accueil au bureau des sorties.

Cela concerne l'unité d'hospitalisation mais l'unité médicales-techniques également (Consultation, exploration fonctionnelle, bloc opératoire), les installations assurant l'alimentation, le traitement de l'eau ou celui des déchets, etc. C'est également l'hygiène de toutes les surfaces (sols, murs, table, chariots de transport, chaises, etc.) et bien évidemment.

L'hygiène des soins infirmiers ; cette hygiène de l'environnement concerne également l'eau qui circule à tous les niveaux de l'hospitalisation (eau des salles de bains, eau des lavabos de blocs opératoires, circuit d'eau chaude, eau de piscines de rééducation)(Alain, 2004).

Chapitre II : Les principaux microorganismes rencontrés dans les milieux hospitaliers

1.Introduction

Des agents pathogènes très divers peuvent être à l'origine d'infections nosocomiales. Les agents infectieux varient selon les populations de patients et les types d'établissements de santé, d'un établissement à l'autre et d'un pays à l'autre.

Les microbes présents dans l'environnement hospitalier (eau, air, surface) infectent le malade par voie respiratoire, digestive ou contact(**Ducel, 2002**).

- Les saprophytes qui vivent naturellement dans le milieu extérieur comme *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Legionella*, *Bacillus*....
- Les commensaux de l'être humain, qui sont des " Parasites " facultatifs et appartiennent à la flore cutanée, digestive ou respiratoire, par exemple : *E.coli*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, ils peuvent d'ailleurs servir d'indicateurs de contamination dans l'environnement.
- Les pathogènes spontanés pour l'être humain, tels : *Salmonella*, *Yersinia*, *Listeria*....
(**Lionel, 2003**).

2.Les germes responsables en milieu hospitalier

2.1.Les Bactéries

Les bactéries représentent la majorité des pathogènes responsables d'infections nosocomiales. Parmi les bactéries à Gram négatif, la Famille des *Enterobacteriaceae* est la plus représentée, et les genres *Pseudomonas* et *Acinetobacter* ont également un impact conséquent. Pour les bactéries à Gram positif, la "palme" revient aux genres *Staphylococcus* et *Enterococcus*. (**Monnet, 2011**).

Les bactéries commensales présentes dans la flore normale des sujets en bonne santé. Elles jouent un rôle protecteur significatif en empêchant la colonisation par des microorganismes pathogènes. Certaines bactéries commensales peuvent provoquer une infection si les défenses immunitaires de l'hôte sont affaiblies. Par exemple, les *Staphylocoques* cutanés

coagulase-négatifs provoquent des infections sur cathéter vasculaire et les *Escherichia coli* présentes dans l'intestin sont la cause la plus courante d'infections urinaires.

Les bactéries pathogènes ont une virulence plus élevée et provoquent des infections épidémiques quel que soit l'état immunitaire de l'hôte(Ducel G, 2002).

2.1.1.Bactéries à Gram négatif

Les *Entérobactéries* sont des bacilles fermentaires, retrouvées partout dans le sol, dans l'eau, et surtout dans l'intestin de l'homme et des animaux. Elles comprennent un nombre très élevé de genres et d'espèces. Leur abondance dans l'intestin, leur mobilité, la rapidité de leur multiplication, l'acquisition fréquente de mécanismes de résistance aux antibiotiques expliquent qu'elles soient les bactéries les plus souvent impliquées en pathologie infectieuse humaine surtout en milieu hospitalier.

La famille comprend 130 espèces actuellement répertoriées. Les espèces les plus communément isolées en bactériologie clinique appartiennent aux genres *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia* (Khayar, 2011).

2.1.1.1.Escherichia

Le genre *Escherichia* compte 5 espèces : *E.coli*, *E.fergusonii*, *E.hermanii*, *E.vulneris* et *E.blattae*. L'espèce *E. coli* est considérée comme un hôte normal, c'est-à-dire commensal, de la microflore digestive de l'homme et de la plupart des animaux à sang chaud(Alpha, 2013).

Escherichia coli ou colibacille est une bactérie mesurant 2 à 4 micros mètre de long sur 0,4 à 0,6 micros mètre de large. C'est une bactérie fine et allongée à extrémité arrondie, mobile grâce à une ciliature péritriche. Ce germe, non exigeant sur gélose ordinaire, il donne des colonies lisses, brillantes et homogènes. Sa température de croissance optimale est de 37 °C. *E. coli* possède une catalase mais est dépourvu d'oxydase. L'étude d'activités enzymatiques et de la fermentation des sucres est réalisée à l'aide de micro-méthodes validées disponibles dans le commerce sous forme de galeries. Ces galeries permettent l'identification de cette bactérie ainsi que le diagnostic différentiel avec les autres bactéries de la même famille.(Abraham, 2018).

➤ Résistance aux antibiotiques

La proportion d'*E.coli* résistants aux antibiotiques a considérablement augmenté au cours de la dernière décennie, et l'émergence de souches combinant des résistances à plusieurs classes d'antibiotiques est de plus en plus fréquente.

La résistance aux **aminopénicillines** est la plus répandue, elle est soit l'unique résistance de la souche (33,3% des souches), soit associée avec une ou plusieurs autres résistances. Elle est fréquemment combinée à la résistance aux **fluoroquinolones** (84,8% des souches multi-résistantes), qui est la deuxième résistance la plus fréquente. La résistance aux **céphalosporines de 3ème génération (C3G)**, si elle est la moins fréquente. Avec l'émergence de souches produisant des **carbapénémases**, la prise en charge des patients atteints d'infection nosocomiale va devenir de plus en plus compliquée dans les prochaines années, au vu de la prévalence d'*E.coli* dans ces infections (Monnet, 2011).

2.1.1.2. *Klebsiella*

Les *Klebsiella* sont des bactéries immobiles et capsulées. On distingue 5 espèces dans le genre qu'on peut différencier par des caractères biochimiques. Elles expriment des antigènes K, capsulaires utilisables comme marqueurs épidémiologiques. L'espèce type est *Klebsiella pneumoniae*. Elles sont responsables d'infections urinaires au 2ème rang après *E.coli* d'infections respiratoires (*Klebsiella pneumoniae* est appelée "pneumobacille de Friedlander"), de bactériémies et d'infections neuro-méningées post traumatiques ou post chirurgicales. Les isollements sont beaucoup plus fréquents à l'hôpital et singulièrement dans les services de réanimation -qu'en ville (Khayar, 2011). Sur les milieux classiques d'isolement pour entérobactéries (Drigalski, EMB, Hektoen, Mac Conkey), les colonies de *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella oxytoca* sont lactose positives, bombées, muqueuses, parfois filantes à l'anse de platine, d'un diamètre de 3 à 4 mm en 18-24 h à 37 °C (Kone komba, 2010).

➤ Résistance aux antibiotiques

K.pneumoniae est naturellement résistante aux **aminopénicillines (amoxicilline, ticarcilline)** par production d'une **lactamase**.

De nombreuses souches de *K. pneumoniae* résistent aux inhibiteurs des **bêta-lactamases** (des **bêta-lactamases** de classe A de type IRT insensibles à l'acide clavulanique) (**Heaggman, 1997**).

2.1.1.3. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est un bacille oxydatif, Il a été isolé pour la première fois en 1882 par Gessard. Au cours des dernières décennies, *Pseudomonas aeruginosa* est imposé comme un pathogène hospitalier très important du fait du nombre et de la gravité des infections causées. L'enquête nationale de prévalence de 2006 attribue à *P.aeruginosa* la responsabilité de 10 % de l'ensemble des infections nosocomiales en France, le plaçant ainsi au 3ème rang des espèces isolées juste après *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*(**Choley, 2010**).

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont principalement retrouvées dans l'environnement mais aussi en milieu hospitalier(**Sheretrz et Basseti, 2001**).

Ils sont donc difficiles à éradiquer dans les endroits contaminés, c'est à dire les chambre d'hôpital, les dispensaires, les salles d'opération, et certains équipement médicaux comme les appareils d'assistance respiratoire, ils peuvent même survivre dans certain solution antiseptiques utilisés dans la désinfection des instruments et des endoscopes(**Moselio et al., 1993**). Cette bactérie est catalase positive et oxydase positive.

Elle possède une versatilité nutritionnelle remarquable pouvant utiliser une variété de sucres simples et complexes, d'alcools et d'acides aminés comme seule source de carbone(**Elmeskini, 2011**). Comme la plupart des espèces appartenant au genre *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* n'exige aucun facteur de croissance.

C'est une bactérie hautement versatile dotée d'une grande adaptabilité nutritionnelle et métabolique. Par conséquent, elle peut être isolée en culture sur des milieux ordinaires ou sur des milieux rendus sélectifs par addition d'inhibiteur, tel que le cétrimide. Elle est strictement aérobie et sa température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37°C. Les cultures de *P.aeruginosa* dégagent une odeur caractéristique, et produisent le plus souvent des pigments de pyocyanine et de pyoverdine(**Chanfir, 2016**).

➤ Résistante aux antibiotiques

Pseudomonas aeruginosa possède une résistance naturelle à un grand nombre d'antibiotiques en raison de la production d'une **bêta-lactamase** qui n'est pas inhibé par le clavulanate, et une mauvaise perméabilité membranaire.

Pseudomonas aeruginosa est donc naturellement résistant aux **pénicillines**, à la plupart des **céphalosporines** de troisième génération.

Pseudomonas aeruginosa est aussi résistant à **lakanamycine** (Poole, 2004).

A-côté de la résistance naturelle existe aussi la résistance acquise. Cette résistance ne concerne que quelques ou de nombreuses souches d'une espèce donnée. Ces souches dérivent de bactéries initialement sensibles (phénotype résistance).

Elle résulte de changements dans le génome bactérien par une mutation soit l'acquisition des informations génétiques étrangères (Mulvey et Simor, 2009).

2.1.2. Bactéries à Gram positif

2.1.2.1. Les *Staphylocoques*

Le genre *Staphylococcus* appartient à la famille des *Micrococcaceae*, et comprend plus de 30 espèces différentes qui peuvent être pathogènes pour l'Homme.

Les *Staphylocoques* sont des bactéries à Gram positif inconstamment encapsulées, aéro-anaérobies facultatives, ubiquitaires.

Ils se présentent le plus souvent sous l'aspect de coques rassemblées en amas irréguliers, ils sont parfois isolés, par paires ou en très courtes chaînes. Ainsi on distingue l'espèce *Staphylococcus aureus* à coagulase positive appelée également staphylocoque doré (élaboration d'un pigment caroténoïde donnant une couleur dorée à la colonie) qui est le germe le plus fréquemment rencontré dans toutes les infections des sites opératoires (Birgand, 2014). Des autres espèces de staphylocoques à coagulase négative (SCN) que l'on regroupe aussi sous le nom de staphylocoques blancs (par opposition au doré): *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. capitis* (Cécile, 2012).

La dénomination officielle est *S. aureus*. *Staphylococcus* vient du grec : Staphulé (grain de raisin) et kokkos (graine), il se cultive facilement sur milieux ordinaires en aérobiose comme en anaérobiose sur tous les milieux usuels, à des conditions de pH et de température variables.

S.aureus donne des colonies sur milieu usuel, lisses, rondes, bombées et brillantes. Certaines souches sont pigmentées en jaune doré.

Il pousse et fermente le mannitol sur milieu de Chapman, faisant virer le rouge de phénol au jaune. Ce milieu contient une concentration de 7.5 % de NaCl qui inhibe la plupart des autres germes(**Ghernout, 2013**).

De nombreuses études ont permis de dresser des profils métaboliques pour la plupart des espèces de *Staphylocoque*.

Les principaux caractères biochimiques pris en compte sont la production de catalase, la capacité à métaboliser les sucres et la production d'arginine dihydrolase (ADH) (**Yves,2009**).

La plupart des infections à staphylocoques sont des infections graves, soit du fait de leur localisation, soit du terrain sur lequel elles surviennent :

- Les infections cutanées à *Staphylocoques* sont les plus fréquentes, elles concernent essentiellement *S.aureus*.
- Les bactériémies elles sont communautaires à partir d'un foyer profond dans 70 % des cas pour *S.aureus* et nosocomiales pour 30 % des cas Les endocardites bactériennes à *Staphylocoques*.
- Les pneumopathies à *Staphylocoques* sont exceptionnellement communautaires, mais le plus souvent nosocomiales.
- Les médiastinites complication rare, mais majeure de la chirurgie cardiaque, cette infection nosocomiale reste grevée d'une morbidité et d'une mortalité importante Infections neuro-méningées infections sur cathéter Infections ostéo-articulaires et Autres infections(**Boyce et al., 1997**).

➤ Résistance aux antibiotiques

Comme toutes les bactéries Gram positif, *Staphylococcus aureus* présente une résistance naturelle à l'**aztréonam, colistine** et à l'**acidenalidixique**. Sa particularité est d'avoir une résistance naturelle à **laceftazidime** uniquement parmi les céphalosporines. La résistance à **laméticilline** est un problème majeur de santé publique. Ces staphylocoques ont acquis le gène mec qui permet la synthèse d'une enzyme (PBP2a ou PBP2') n'ayant qu'une affinité très faible pour **les lactamines**, qui ne peuvent plus exercer leur action inhibitrice.

La plupart de ces *Staphylocoques* sont également résistants aux quinolones et aux macrolides. Les staphylocoques communautaires sont habituellement sensibles à la **méticilline**.

Les *Staphylococcus aureus* résistants à **laméticilline** (SARM) sont principalement observés en milieu hospitalier. Les souches hospitalières sont caractérisées par leur résistance aux antibiotiques notamment aux **Bêta -lactamines**(Ahamogbe, 2014).

2.1.2.2. Les *Streptocoques*

Les espèces de genre *Streptococcus* sont des Cocci à Gram positif les plus impliqués en pathologie humaine, on distingue : Les *Streptococcus pyogenes* qui sont associés en paire et /ou en chaînettes. Dénommé aussi « *Streptocoque* de groupe A », Elle responsable d'infections invasives et d'autres non invasives. Elle rencontrée chez l'homme dans le pharynx ou sur la peau. La transmission est essentiellement interhumaine par contact direct à partir d'une personne infectée ou porteuse asymptomatique (François *et al.*, 2007).

Le risque de contamination est plus élevé en milieu hospitalier, et tout particulièrement lors de la prise en charge de malades atteints de pneumopathie nécrosante et de malade nécessitant une ventilation invasive, et *Streptococcus pneumoniae* présentent un aspect de diplocoque ou en courte chaînette (Albert *et al.*, 1991).

C'est une bactérie commensale de voies aérienne supérieure de l'homme cette espèce est transmise par voie aérienne tant que les sécrétions buccales et nasales contiennent un nombre important de pneumocoques virulents.

La transmission directe de fait par contact avec les sujets hébergeant les germes (propagation de gouttelettes de salive par contact oral direct, par des Objets fraîchement souillés de sécrétion respiratoire (Sherertz et Bassetti, 2001).

➤ **Résistance aux antibiotiques**

Les *Streptocoques* sont responsables de très nombreuses infections dont font partie les maladies suivantes : angine bactérienne, scarlatine, infections cutanées notamment impétigo ou érysipèle, infections des voies respiratoires comme les pneumopathies, certaines méningites, des infections généralisées. Les streptocoques sont généralement sensibles aux antibiotiques, dont les plus utilisés à son encontre sont **les pénicillines**.

Les *Streptocoques* sont sensibles aux pénicillines et aux macrolides. Ils sont résistants aux **polymyxines** et souvent aux **quinolones**. Il existe une résistance naturelle aux aminosides

(résistance de bas niveau) qui sont inactifs seuls, mais qui deviennent actifs grâce à un effet synergique avec **les pénicillines**.

Il existe des souches des *S.pneumoniae* présentent une sensibilité réduite à la **pénicilline G**, cela est lié à une modification des protéines liant des pénicillines (PLP)(**Jacque, 2014**).

2.2.Champignons

2.2.1.Moisissures

Les champignons, dont font partie les moisissures, sont des organismes Eucaryotes aérobies, ni plantes ni animaux, ils constituent un règne à part (Eumycota) dans le monde vivant.

Ils émergent comme agents pathogènes majeurs dont la fréquence ne cesse d'augmenter ces dernières années. Deux genres sont fréquemment rencontrés, à savoir les *Aspergillus* dont l'origine est exogène, puisque des millions de spores ou conidies sont véhiculées en permanence par l'air, et les *Candidas* dont les sources peuvent être digestives ou provenant de solutions contaminées (collyres, liquide d'alimentation...etc. (**Meryem, 2016**).

De nombreux champignons sont des agents opportunistes et provoquent des infections. En cas de traitement antibiotique prolongé et d'immunodépression sévère (*Candida albicans*, *Aspergillus spp*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptosporidium*).

Ils sont une cause majeure d'infection généralisée chez les patients immunodéprimés.

La contamination de l'environnement par des germes aéroportés comme *Aspergillus.sp* présent dans les poussières et le sol est également préoccupante, en particulier lors de la construction d'hôpitaux(**Ducel, 2002**).

La présence de moisissures sur les surfaces de travail et dans l'air au niveau du laboratoire de mycologie de l'hôpital de Dijon en France. Le laboratoire a une superficie de 70 m² comprenant deux pièces communicantes. Le prélèvement a été réalisé à hauteur de travail. Les prélèvements ont été réalisés deux fois par semaines à 7 heures et 11 heures du matin. Il a été constaté que le taux de moisissures dans l'air est plus élevé (deux fois plus) en fin de matinée que le matin (2,27 CFU/m³), par contre le taux sur les surfaces n'est pas différent.

Le taux de moisissures dans l'air est moins important dans la période froide (octobre à mars) comparé à l'été (avril à septembre),les *Aspergillus* représentent 53 % des isolats provenant des prélèvements réalisés au sein du laboratoire.

Chapitre II : Les principaux microorganismes rencontrés dans les milieux hospitaliers

La présence de moisissures dans l'air de différents endroits, équipés de systèmes d'air conditionné. Les moisissures isolées ont été testés sur 75 individus souffrant d'allergies (rhinites, toux, nez bouché, urticaire et asthme) pour leur capacité à provoquer des allergies.

Parmi les 12 espèces de moisissures trouvées, sept types d'*Aspergillus* ont été identifiés : *A.niger*, *A.oryzae*, *A.fumigatus*, *A.terreus*, *A.nidulans*, *A.versicolor* et *A.parasiticus*.

A.niger représente 80 % des moisissures.

D'autres champignons sont présents comme le *Penicillium citrinum*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma viride*, *Neurospora crassa* et le *Alternaria alternata*.

Trois moisissures trouvées sont allergènes: *A.fumigatus*, *A.niger* et *P.citrinum*. *A.fumigatus* est le plus fréquent dans les salles informatiques, les laboratoires hospitaliers, les salles d'opération, l'infirmerie et le scanner.

D'autres moisissures non allergènes mais productrices de mycotoxines ont été répertoriées, les *Fusaria* sont productrices de fumonisine et de zéaralénone, les *Alternaria* d'alternariol, d'altertoxine et d'acide ténuazonique responsables d'asthme et de rhinites allergiques.

Les *Trichoderma* génèrent des trichothécènes et de la glioxine provoquant des dommages pulmonaires et des péritonites surtout chez les dialysés. Quant à *Penicillium citrinum*, il est associé à des infections urinaires vraisemblablement dues à la synthèse de citrinine. L'arrêt des systèmes de climatisation durant 6 à 12 heures pendant la nuit contribue à augmenter les risques de contamination en moisissures car cela entraîne une augmentation de l'humidité relative qui est favorable au développement des moisissures. D'autre part, il a aussi été montré que les filtres sont peu changés et constituent de ce fait un réservoir(Khan *et al.*, 2009).

➤ Pouvoir pathogène :

Parmi les principaux éléments qui participent au pouvoir pathogène de ces champignons, on retrouve :

- La petite taille des spores (2 à 3 µm de diamètre pour *A.fumigatus*) leur donnant la possibilité d'atteindre les alvéoles pulmonaires.
- La thermo tolérance (jusqu'à 55°C pour *A.fumigatus*) permettant leur développement chez leur hôte à 37°C.

- La capacité d'adhérence à la membrane basale (via le fibrinogène, la laminine, la fibronectine, etc.) et la capacité d'induire des microlésions et des ulcérations vasculaires par le biais de toxines nécrosantes.
- Le tropisme vasculaire (en particulier pour les *Aspergillus*; les *Fusarium* et les mucorales).
- La production de mycotoxines impliquées dans des processus de sensibilisation responsables de manifestations allergiques(Anoffel, 2014).

2.2.2.Levures

Les levures sont des champignons microscopiques qui se multiplient par bourgeonnement ou scissiparité. Le genre *Candida*, le plus représenté en pathologie humaine, compte plus de 150 espèces. Ce genre regroupe des levures productrices (exemple: *C.albicans*) ou non productrices (exemple : *C.glabrata*) des filaments, et donnant des colonies blanches crémeuses en culture sur gélose(Develoux, 2005).

Les infections à levures, de plus en plus fréquentes et responsables d'une augmentation non négligeable de la morbi-mortalité, sont un enjeu majeur de prise en charge des patients de réanimation. Le tableau clinique peut varier considérablement allant d'une atteinte cutanéomuqueuse localisée jusqu'à une candidose invasive et disséminée dont le pronostic est particulièrement sombre. Cette entité nosologique ne recouvre pas l'ensemble des infections fongiques qui comprennent, en plus des infections à levures (*Candida spp.*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Geotrichum*, ...)(Ascioglu et al., 2002).

Parmi les infections à levures, seules seront abordées les infections à *Candida spp.* de loin les plus fréquentes en réanimation. Ces 10 dernières années ont été marquées par l'apparition de nouveaux antifongiques et par une évolution significative des modalités diagnostiques.

La candidose invasive correspond à la présence d'une levure dans un site normalement stérile. Parmi celles-ci, la candidémie est définie comme une infection prouvée par la présence d'une ou plusieurs hémocultures positives à *Candida*.

La candidose disséminée, quant à elle, correspond à la présence d'un *Candida* dans au moins 2 organes ou sites non contigus(Eggimann et al., 2003).

2.3.Virus

On admet qu'au moins 5% de toutes les infections hospitalières sont causées par des virus. Il paraît que leur importance est encore sous estimée. Sont avant tout les services de pédiatrie qui sont les plus affectés où le virus respiratoire syncytial, du fait de sa contagiosité extrême et prolongée, est responsable des épidémies nosocomiales. D'autres virus, notamment celui de l'hépatite B, le cytomégalovirus et le virus de l'immunodéficience humaine, du fait de leur transmission à partir du sang et des autres liquides biologiques, peuvent être responsables d'infections nosocomiales (Malek, 1996).

Il existe une possibilité de transmission nosocomiale pour de nombreux virus, notamment ceux des :

- Hépatites B et C (transfusions, dialyse, injections, endoscopie).
- Le virus respiratoire syncytial, les rotavirus et les entérovirus (transmis par contact main bouche et par voie féco-orale).
- D'autres virus comme le cytomégalovirus, le VIH, le virus Ebola, les virus grippaux, les virus de l'herpe et le virus varicellezou, sont également transmissibles (Ducel, 2002).

2.4.Parasites

Les parasites les plus rencontrés au cours des infections nosocomiales sont le Plasmodium lors des transfusions, le *Sarcoptes scabies* agent de la gale et le *Pneumocystis jiroveci* qui est un agent opportuniste responsable de pneumopathies nosocomiales chez les immunodéprimés. (Malek, 1996).

Certains parasites (par exemple *Giardia lamblia*) se transmettent facilement chez l'adulte et l'enfant.

Sarcoptes scabies (agent de la gale) est un ectoparasite qui provoque régulièrement des flambées épidémiques dans les établissements de santé (Ducel, 2002).

Matériels et Méthodes

1.Lieu d'étude

Le travail a été effectué, dans les services réanimation et chirurgie de l'Etablissement Hospitalier Spécialisé De Pédiatrie Mansourah Constantine durant trois mois (17 février au 28 mai 2020) Notre travail vise à rechercher les micro-organismes (bactéries et champignons) qui se trouvent dans le milieu hospitalier afin de :




- Vérifier le niveau d'hygiène atteint dans ces services.
- Evaluer le degré de bio contamination, d'identifier la flore bactérienne et fongique, sa localisation et sa voie de transmission.
- Montrer la relation entre l'environnement et le patient.

2.Techniques de prélèvement

2.1.Prélèvement à partir des surfaces

La surface suspectée d'être contaminée par des microorganismes est prélevée à l'aide d'un écouvillon stérile préalablement humidifié de sérum physiologique(French *et al.*,2004). Le changement des écouvillons entre chaque échantillonnage est important afin d'éviter les contaminations d'un autre lieu avec celui tout juste échantillonné. nous avons effectué les prélèvements de surface des différents points sensibles ayant une incidence directe ou indirect sur les patients du service, sur une surface de 25cm²(Tableau 01)(Boulestreau *et al.*, 2016).




Tableau N° 01: Les sites des prélèvements d'environnement hospitalier

Numéro de prélèvement	Site de prélèvement	Lieu de prélèvement
01	Respirateur mobile 	Réanimation
02	Chariot 	Salle de soin
03	Déchoquage	Bloc opératoire
04	Robinet 	Réfectoire

Matériels et Méthodes

05	Appareil d'anesthésie  A photograph of a medical anesthesia machine, specifically a Taema model, with various dials, screens, and connected tubes.	Bloc opératoire
06	Radiateur	Salle de malades
07	Lit  A photograph of a hospital bed with a black mattress and a metal frame, positioned in a room.	Salle de soin
08	Mure	Salle de soin
09	Filtre d'air  A photograph of a square air filter mounted on a ceiling, with a metal grille and a white frame.	Réanimation

Matériels et Méthodes

10	Couveuse 	Réanimation
11	Scialytique 	Bloc opératoire
12	Table d'instrumentation 	Bloc opératoire

2.2.Prélèvement à partir de l'atmosphère hospitalière

Nous avons procédé au prélèvement d'air en déterminant plusieurs points du service de réanimation et de la chirurgie qui peuvent avoir un impact significatif sur le patient. En absence de biocollecteur, l'acte de prélèvement a été effectué par la technique de sédimentation cette technique qui est ancienne, a été rependue et a constituée une approche simple de l'aéro contamination (**Boulestreau *et al.*,2016**).

3.Isolement

3.1.Isolement des germe prélevés à partir des surfaces

3.1.1.Isolement des bactéries

L'isolement est effectué par ensemencement par stries sur les trois milieux Chapman , Hektoen , Gélose au sang cuit (gélose chocolat) en utilisant l'écouvillon (**Vandepitte *et al.*, 1991**).Les boites sont incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures.



Figure01 : Les milieux de cultures utilisés en bactériologie

3.1.2.Isolement des champignons

La mise en culture est réalisée par des stries avec les écouvillons utilisés pour les prélèvements sur milieu Sabouraud afin d'isoler le maximum de champignons qui peuvent être présents (**Pigasse, 2000**).Les écouvillons sont coupés, en éliminant la tige et le morceau de coton qui reste est déposé dans la boîte, les échantillons sont centrifugés à 3100 rpm pendant 2 minutes. Le surnageant est délicatement éliminé alors que le culot qui contient les spores des champignons est ensemencé immédiatement sur la boîte déjà coulée par Sabouraud, cette technique est utilisée plutôt comme complément pour récupérer les spores (**Gerald *et al.*,2018**). Les boites sont incubées à 37°C pendant 48 heures puis à 28°C pendant une semaine.

3.2. Isolement des germes prélevés à partir de l'atmosphère hospitalière

La méthode de sédimentation nous a permis de réaliser les prélèvements d'air et cela selon les étapes suivantes :

- Nous avons travaillé avec la gélose nutritive pour l'étude bactériologique et la gélose Sabouraud+ Chloramphénicol pour l'étude fongique.
- Les lames destinées aux prélèvements doivent être neuves, parfaitement propres, flambées au bec Bunsen et complètement refroidies avant l'emploi.
- Avec une pince stérile, on trempe la lame dans la gélose maintenue à 60°C. La lame est ensuite déposée sur un support en verre au fond de la boîte.
- Quand le nombre de boîtes nécessaires est préparé, on introduit à la pipette 5 ou 6 centimètres cubes d'eau physiologique stérile.
- Nous avons déposé les boîtes de sédimentation ouvertes dans chaque service, deux essais au moins seront effectués, deux avec la gélose nutritive et deux autres avec le milieu Sabouraud+Chloramphénicol.

Les fenêtres et les portes de la pièce étudiée devront être fermées afin d'éliminer l'interférence de l'air extérieur. Après 72 heures, nous avons récupéré les boîtes, pour les incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures pour la gélose nutritive et 28°C pendant une semaine pour Sabouraud + Chloramphénicol.

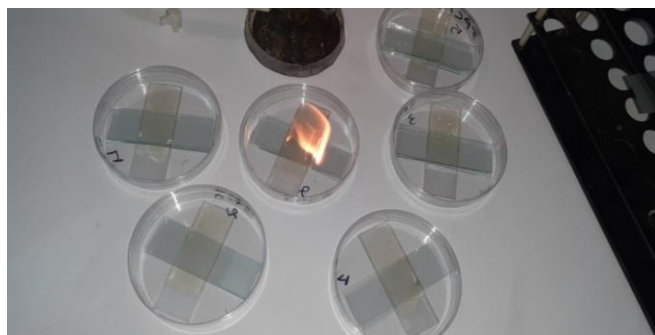


Figure 02: Préparation des boîtes de sédimentation

4.Purification des microorganismes

4.1.Purification des bactéries

Nous avons effectué une série d'ensemencement par la méthode des stries sur boites des culture déjà coulé de milieux sélectifs (Chapman, Hektoen, Gélose chocolat), pour but d'avoir des cultures pures. L'opération est renouvelée en prenant chaque fois au hasard une colonie isolée. Jusqu'à l'obtention de colonies de même taille, même forme et même couleur renseignant sur le pureté des souches (**Idoui et al., 2009**).

4.2.Purification des champignons

On procède à la purification des souches isolées à l'aide d'une série de repiquage qui consiste à transférer aseptiquement un microorganisme pour le maintenir en culture pure(**Botton et al., 1990**). Cette opération a pour but de faciliter l'identification des champignons. Une fois que les colonies sont bien différenciées (**Bourgeois et Leveau, 1980**).

Le repiquage des champignons se fait comme suit:

- Nous avons prélevé à l'aide d'une anse de platine stérile, au bord de la colonie, un fragment mycélien et le déposer au centre de la nouvelle boite de pétrie contenant le même milieu de culture (gélose Sabouraud).
- L'incubation des cultures est effectuée en maintenant les mêmes conditions que précédemment(28°C pendant une semaine).

5.Identification des microorganismes

5.1.Identification des bactéries

5.1.1.Identification macroscopique

Après incubation pendant 24 heures, nous avons procédé à un examen macroscopique pour l'étude de l'aspect des colonies qui dépend du milieu utilisé, de la durée et la température d'incubation(**Delarras,2008**), en désignant les colonies bien isolées en tenant compte de:

- La taille de la colonie.
- La forme: **Allure de contours:** lisse, dentelés, irréguliers, **Centre:** parfois surélevé, parfois en creux , **Relief:** surface bombée, plate, **l'aspect de la surface:** lisse, rugueux..., **l'opacité:** opaque, translucide, transparente, **la consistance:** crémeuse, sèche ou muqueuse et **la couleur ou pigment.**

5.1.2. Identification microscopique

L'observation microscopique permet de faire une étude des cellules d'une espèce microbienne. Elle comprend l'examen à l'état frais (examen entre lame et lamelle des bactéries vivantes) et l'examen après coloration (le plus souvent sur frottis séchés et fixés) (**Francias, 2002**). Le but et les méthodes d'examen microscopiques peuvent être résumés dans le tableau 02.

Tableau 02: Le but et les méthodes d'examen microscopique

Examen	Examen direct à l'état frais (Francias, 2002)	Examen direct après coloration de Gram (Bent Mohamed <i>et al.</i>, 2008).
Le but d'examen	-Permet d'apprécier à la fois la forme, le mode de regroupement et la mobilité des bactéries isolées.	-Permet de déterminer l'aspect microscopique de bactérie et la nature de sa paroi (Gram positif colorées en violet foncé , et les bactéries à Gram négatif colorées en rose). -Permet d'observer la disposition des bactéries et leur morphologie (cocci, bacille, cocobacille).

La méthode	<ul style="list-style-type: none">- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame.-Prélever à l'aide d'une anse de platine stérile une fraction de la colonie isolée sur milieu gélosé.- Effectuer une suspension homogène dans la goutte d'eau physiologique.- Recouvrir d'une lamelle en évitant la formation de bulles d'air.- Observer au microscope à faible luminosité à l'objectif X40.	<ul style="list-style-type: none">-Réaliser un frottis et le fixer à la flamme.-Verser le Violet de Gentiane sur la lame ; laisser en contact 1 minute.-Rincer à l'eau courante.-Ajouter le Lugol et laisser agir pendant 1 minute.-Rincer à l'eau courante et faire couler de l'alcool sur la préparation ; rincer immédiatement à l'eau.- Recolorer la préparation avec la fuchsine , laisser agir pendant 30 secondes ; laver abondamment.-Sécher au dessus de la flamme de bec Bunsen.-Observer au microscope à l'immersion (X100).
-------------------	--	--

5.1.3.Etude des caractères biochimiques


5.1.3.1.La galerie biochimique classique

Après incubation des boîtes, nous avons fait une coloration de Gram des germes isolés, après laquelle nous avons effectué une galerie biochimique classique à partir d'une suspension mère préparée en émulsionnant 2 à 3 colonies dans 9 ml d'eau physiologique stérile(tableau03 et figure03).





Figure03: La galerie biochimique classique


Tableau 03: Les caractéristiques de la galerie biochimique classique.

Milieux	Ensemencement	Caractères recherchés	Résultats attendus
<p>TSI</p>	<p>Ensemencer abondamment la surface par des stries serrées, puis le culot par simple pique. -Mettre à l'étuve à 37°C pendant 24 à 48 heures. (Harley et al.,2010).</p> 	<ul style="list-style-type: none"> -Utilisation du glucose . -Utilisation du saccharose. -Utilisation du lactose. -Production H2S. -Production du gaz. 	<ul style="list-style-type: none"> -Virage de la couleur vers le jaune: glucose, lactose et saccharose positif (+). -Formation de tache noire: H2S(+). -Bulles de gaz dans le culot, parfois même une surélévation de la gélose: Gaz (+).
<p>Citrate de Simmons</p>	<p>-L'ensemencement de la pente ce fait par une strie longitudinal au fil droit, à partir d'une suspension bactérienne. -Ne pas visser le bouchon à fond afin de permettre les échanges gazeux. -Incuber à 37°C pendant 24 à 48 heures.(Harley et al.,2010).</p>	<p>-Utilisation du citrate comme unique source de carbone est une utilisation aérobie et se traduira par une alcalinisation du milieu.</p>	<p>-Virage de l'indicateur de pH au bleu.</p>

Matériels et Méthodes

			
<p>Mannitol-mobilité</p>	<p>-Ensemencer par piqure centrale à l'aide d'un fil droit.</p> <p>-Incuber à 37°C pendant 24 à 48 heures.(Singleton, 1999).</p> 	<p>-Mannitol.</p> <p>-Mobilité.</p>	<p>-Caractère mannitol: virage de la couleur du milieu du rouge au jaune (mannitol +)</p> <p>-La mobilité: les bactéries très mobiles peuvent se déplacer dans la gélose molle (formation d'un voile autour de la piqure).</p>
<p>Test ONPG</p>	<p>-Réaliser une suspension bactérienne dans l'eau physiologique stérile.</p> <p>-Ajouter avec une pince flambée mais refroidie un disque imprégné d'ONPG.</p> <p>-Incuber à 37°C pendant</p>	<p>-Une β-galactoside perméase Membranaire qui permet au lactose de pénétrer dans la bactérie.</p> <p>-Une β-galactosidase</p>	<p>-Milieu jaune: ONPG positif(+).</p> <p>-Milieu sans couleur: ONPG négatif (-).</p>

Matériels et Méthodes

	<p>24 heures.(François et al.,2016).</p> 	<p>qui catalyse l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose.</p>	
<p>Test catalase</p>	<p>-Avec une pipette boutonnée, prélever une colonie bactérienne et la déposer dans un tube à hémolyse stérile contenant des goutte d'eau oxygénée. -Observer immédiatement. (Joffin et Leryol, 2001).</p>	<p>-La catalase: ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram+. -Un critère de différenciation entre les staphylocoque (catalase+) et les streptocoque (catalase-).</p>	<p>-Dégagement gazeuse de dioxygène: catalase positive (+). -Pas de bulles: Catalase négative (-).</p>

5.1.3.2.Test Coagulase (identification des Staphylocoques)

❖ Principe

La coagulase est une enzyme capable de faire coaguler le plasma sanguin. La mise en évidence d'une activité coagulase libre chez une souche de *Staphylococcus sp* est un des critères d'identification de *Staphylococcus aureus* en médecine humaine(**Andre et al., 2008**).

❖ Technique

- Préparer une suspension de la souche a étudiée en émulsionnant 2 à 3 colonies dans l'eau physiologique stérile.

- Dans un tube à hémolyse stérile, 50µl du plasma et 50µl de la suspension bactérienne sont introduit.
- Le tube est homogénéisé puis incubé à 37°C pendant 2 heures.

5.2. Identification des champignons

5.2.1. Identification des moisissures

L'identification reste l'opération la plus difficile dans le domaine de la mycologie, elle a pour but de classer les souches fongiques par genres et espèces selon les critères d'identification. Elle est basée sur les deux aspects: macroscopiques et microscopiques (**Botton *et al.*, 1990**).

5.2.1.1. Identification macroscopique

L'examen des boites s'effectue à l'œil nu. On observe attentivement, dans un endroit bien éclairé, l'aspect du champignon, en vérifiant que toutes les colonies soient identiques, il faut noter:

- **La consistance de la colonie:** duveteuse, laineuse, cotonneuse, floconneuse, poudreuse,...etc.
- **La couleur:** du recto et du verso de la boîte de pétrie.
- **La taille:** en mesurant le diamètre de la colonie.
- **La pigmentation:** présence ou absence d'un pigment diffusible dans le milieu.
- **La forme du contour:** régulier, irrégulier; lobé, dentelé, filamenteux,...etc.
- **La surface:** plane, plissée, cérébriforme.
- **La vitesse de croissance:** rapide, modéré, lente.

5.2.1.2. Identification microscopique

L'examen microscopique est basé sur les caractères morphologiques : les organes de fructifications, type de spores, aspect du thalle, aspect, taille, couleur et disposition des spores (**Bourgeois et Leveau, 1980**).

Dans les conditions d'hygiène et d'asepsie, la préparation du matériel fongique pour l'observation microscopique à l'état frais est réalisée par la méthode suivante:

- ✓ Prélever un fragment du thalle de la colonie à l'aide d'une anse de platine stérile, puis le déposer dans une goutte de lactophénol sur une lame stérile.

- ✓ Dilacérer le fragment mycélien avec l'anse de platine pour le rendre moins dense et mieux observable, sans pour autant l'abîmer complètement.
- ✓ Recouvrir la préparation à l'aide d'une lamelle.
- ✓ L'observation microscopique est réalisée au grossissement (X40).

5.2.2. Identification des levures

5.2.2.1. Observation macroscopique

Après incubation des cultures pendant 02-03 jours à 37°C sur milieu gélosé (Milieu Sabouraud), une observation macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies (taille, pigmentation, contour, viscosité..)(tableau 04).

Tableau 04: Ensemble des caractères macroscopique (Callon, 1997)

La forme	Ronde
Le relief	Bombé ou plat
Le contour	Régulier ou irrégulier
La taille	Moyenne, petite, grosse
La surface	Lisse ou rugueuse
La couleur	Blanche ou opaque
Autres caractères	La consistance ou l'odeur

5.2.2.2. Observation microscopique

L'observation microscopique permet de confirmer l'aspect macroscopique des levures, de définir la forme, l'arrangement et le mode de division des cellules.

L'examen à l'état frais: Cette technique se fait en déposant une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame propre, puis on prélève une ose de la colonie de levure et la dissociée dans la goutte, ensuite le tout est recouvert par une lamelle en évitant la formation des bulles d'air. Enfin, on observe sous microscope optique au grossissement (X40), ce qui nous permet d'observer les levures à l'état viable et de préciser leur morphologie(Singleton, 2005).

5.2.2.3. Tests d'identification des levures

Pour l'identification des levures, nous avons utilisé trois tests : Test de Blastèse, test de chlamydosporulation et la galerie api 20 C AUX.

- a. **Le test de Blastèse:** Appelé aussi le test de filamentation en sérum, il est réalisé en déposant une colonie de levure dans 1ml de sérum humains frais. Cette suspension préparée doit être incubée à 37°C pendant 3 heures. La détection de tube germinatif affirme la présence de *Candida albicans* (**Menan, 2008**).

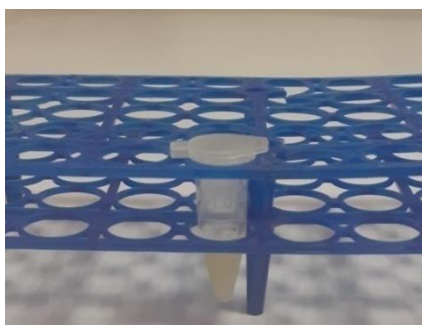


Figure04: Le test de Blastèse

- b. **Le test de chlamydozoaires:** Le but est la différenciation de *Candida albicans* d'autres *Candida sp*, sur la base de la formation des chlamydozoaires. Pour cela, une goutte de suspension de levure estensemencée sur milieu Rice-Cream (gélose à l'extrait de riz) puis incubation à 28°C pendant 24 à 48 heures(**Anonyme, 2003**).
- c. **Galerie api 20 C AUX :** C'est un système d'identification précise des levures les plus couramment rencontrées(tableau 05).

Tableau 05: Système d'identification des levures (Bergan *et al.*, 1982)

Principe	Mode opératoire	Lecture et interprétation
<p>-La galerie API 20 C AUX est constituée de 20 cupules contenant des substrats déshydratés qui permettent d'effectuer 19 tests d'assimilation.</p> <p>-Les cupules sont inoculées avec un milieu minimum semi-gélosé et les levures poussent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.</p> <p>-La lectures de ces réactions se fait par comparaison aux témoins de croissance et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.</p>	<p>*Préparation de la galerie:</p> <p>-Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillée ou déminéralisée dans les alvéoles du fond pour créer une atmosphère humide.</p> <p>-Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.</p> <p>-Retirer la galerie de son emballage individuel et la déposer dans la boîte d'incubation.</p> <p>*Préparation de l'inoculum:</p> <p>-Ouvrir une ampoule d'API Suspension Medium (2ml) ou une ampoule d'API NaCl 0,85% Medium (2ml), ou un tube contenant 2ml de la même solution sans additif.</p> <p>-A l'aide d'une pipette, prélever une fraction de colonie par aspiration ou par touches successives. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).</p>	<p>*Lecture de la galerie:</p> <p>-Après 48 heures d'incubation, ou 72 heures (si les tests, en particulier le glucose, ne sont pas très nets après 48 heures), observer la croissance des levures comparativement à la cupule 0, "témoin négatif".</p> <p>- Une cupule plus trouble que le témoin indique une réaction positive (+) à noter sur la fiche de résultats.</p> <p>-afin d'éviter toute contamination lors d'une ré incubation, ôter le couvercle uniquement pendant la période de lecture.</p> <p>*Interprétation:</p> <p>L'identification est obtenue à partir du profil numérique.</p> <p>-Détermination du profil numérique:</p> <p>Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1,2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe de valeur correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres qui constituent le profil numérique.</p>

Matériels et Méthodes

	<p>-Réaliser une suspension de levures de turbidité égale à 2 de McFarland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.</p> <p>-Ouvrir une ampoule d'API C et y transférer environ 100µl de la suspension précédente. Homogénéiser avec la pipette en évitant la formation des bulles.</p> <p>*Inoculation de la galerie:</p> <p>- Remplir les cupules avec la suspension obtenue dans un API Medium. Eviter la formation de bulles en posant la pointe de la pipette sur le côté de la cupule.</p> <p>-Refermer la boîte d'incubation et incubé 48-72 heures à 29°C± 2°C .</p>	<p>- Identification:</p> <p>Elle est réalisée à partir de la base de données(V4.0)</p> <p>•à l'aide du Catalogue Analytique: Rechercher le profil numérique dans la liste des profils.</p> <p>•à l'aide de l'automate ATB™ , du mini API, ou du logiciel d'identification apiweb™ :</p>
--	---	---

6. Etude de la sensibilité des souches

6.1. Etude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques

6.1.1. L'antibiogramme

L'antibiogramme permet d'étudier la sensibilité et la résistance des germes aux antibiotiques. Dans notre étude, l'antibiogramme à été réalisé par la méthode de diffusion sur gélose, elle est appelée aussi la méthode des disques. La technique est appliquée sur trois souches (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*) par 13 disques d'antibiotiques (tableau 06).

Tableau 06: Les antibiotiques testés contre les bactéries isolées

Antibiotique	Abréviation	La charge (µg)	La famille
Amoxiciline	AM	10	β-lactamine
Ticarciline Aclavulanique	TIM	85	β-lactamine
Céftazidime	CAZ	30	Céphalosporine
Céfotaxime	CTX	30	β-lactamine
Céfazoline	CZN	30	β-lactamine
Céfoxitine	FOX	30	β-lactamine
Ciprofloxacine	CIP	05	Fluoroquinolones
Gentamicine	GMN	10	β-lactamine
Sulfamethoxazole +Trimethoprime	SXT	25	Sulfamides et diaminopyrimidines

Matériels et Méthodes

Colistine	COL	10	Polymyxine
Imipeneme	IPM	10	β-lactamine
Amikacine	AN	30	Aminoside
Chloramphenicol	CHL	30	Phénicolés

6.1.2.Principe général

Pour réaliser l'antibiogramme par la méthode des disques, la culture bactérienne jeune est effectuée à la surface d'une gélose spécialement étudiée, la gélose de Muller-Hinton. Des disques prêts à l'emploi sont déposés à la surface de la gélose. L'antibiotique diffuse à partir du disque en créant un gradient de la concentration minimale inhibitrice. Les caractères de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne en seront déduits (**Bingenet *et al.*,2011**).

6.1.3.Milieu pour antibiogramme

La gélose de Müller Hinton a été formulée à l'origine comme un milieu gélosé transparent simple servant à la culture des *Nessiseria* pathogènes et à la réalisation de l'antibiogramme (**Guezlan *et al.*, 2008**).Le milieu doit être coulé en boîte de pétri sur une épaisseur de 4mm. La gélose doivent être séchée avant l'emploi(**Bingen *et al.*,2011**).

6.1.4.Préparation de l'inoculum

- A partir d'une culture pure de 18à 24 heures sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'une anse de platine stérile quelques colonies bien isolée et parfaitement identique.
- Décharger bien l'anse dans 5 à 10ml d'eau physiologique stérile.
- Homogénéiser bien la suspension bactérienne (**EUCAST, 2018**).

6.1.5. Inoculation des géloses

- L'inoculum bactérien doit idéalement être employé dans les 15min, qui suivent sa préparation.
- Plonger un écouvillon en coton stérile dans la suspension bactérienne et éliminer l'excès de liquide en tournant l'écouvillon sur les parois du tube.
- Il est important de rejeter l'excès de liquide pour éviter une sur-inoculation des boîtes, en particulier pour les bactéries à Gram négatif.
- Ecouvillonner sur la totalité de la surface de la gélose dans trois directions.
- Déposer les disques d'antibiotiques (il est préférable de ne pas mettre plus de 7 disques sur une boîte de 90mm) à la surface de la gélose inoculée et séchée, le contact avec la surface doit être étroit.
- Les disques une fois déposés ne peuvent être déplacés car la diffusion des antibiotiques est rapide (figure 05) (EUCAST, 2018).

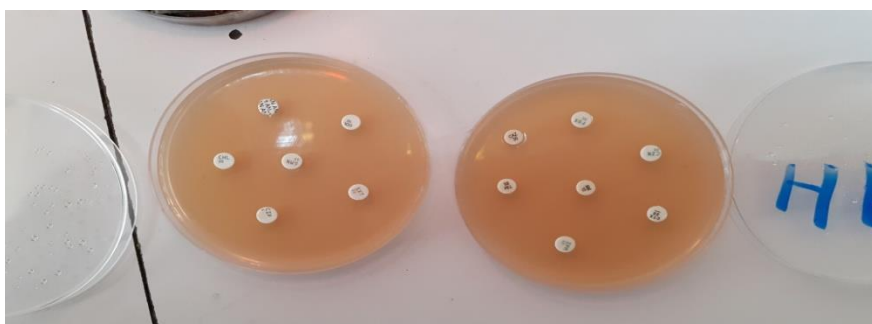


Figure 05: Le test d'antibiogramme

6.1.6. Conditions d'incubation

Les boîtes sont idéalement incubées dans les 15 min, qui suivent le dépôt des disques, sans dépasser 30min, l'atmosphère et la durée d'incubation recommandée pour chaque bactérie (tableau 07).

Tableau 07: Les conditions d'incubation des bactéries isolées

Microorganisme	Conditions d'incubation
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35±2°C en aérobiose 16 à 24heures.
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	35±2°C en aérobiose 16 à 24 heures.

6.1.7.Lecture

Nous avons mesuré avec précision les diamètres et les zones d'inhibition en millimètre en procédant par transparence à travers le fond de la boîte de pétri. Puis nous avons comparé les résultats obtenus et classé la bactérie dans l'une des catégories S (sensible), R (résistante) ou I (intermédiaire).

6.2.Etude de la sensibilité des champignons aux antifongiques

La recherche d'antifongique passe généralement par l'établissement *in vitro* d'antifongigramme vis-à-vis de souches fongiques cibles. Cette étude doit être conduite en rapport avec une détermination de la sensibilité des champignons pathogènes aux antifongiques utilisés en thérapeutique selon des techniques rapides, précises et normalisées (Steimen *et al.*, 1988).

6.2.1.L'antifongigramme

L'antifongigramme est un test qui a pour but de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) d'une souche fongique vis-à-vis de divers antifongiques. Par définition, la Concentration Minimale Inhibitrice est la plus faible concentration d'antifongique capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une souche donnée après une certaine période d'incubation. La fiabilité d'un antifongigramme est influencée par de nombreux paramètres qui doivent être rigoureusement contrôlés.

6.2.2.Principe général

Dans notre étude l'antifongigramme est réalisé par la méthode des disques. Cette méthode, par diffusion, utilise des disques dont la charge en principe actif et variable selon l'antifongique testé sont déposés sur un milieu de culture gélosé,ensemencé par écouvillonnage. L'antifongique diffuse dans la gélose créant une zone d'inhibition de croissance de germe autour du disque, en fonction du diamètre de cette zone les souches peuvent être classées en sensibles (aucune pousse), intermédiaires(pousse dans la cupule faiblement dosée en antifongique) ou résistantes(pousse dans les deux cupules) (**Linas *et al.*, 2001**). La technique est appliquée sur les souches fongiques avec 06 disques d'antifongiques (tableau 08).

Tableau 08: Les antifongiques testés contre les souches fongiques

Antifongique	Abréviation	La charge (µg)	La famille
5-Fluorocytosine	5FC 1	01	Pyrimidines
Amphotéricine B	AB 100	100	Polyènes
Voriconazole	VOR 50	50	Azolés
Itraconazole	ITR50	50	Azolés
Posaconazole	POS 50	50	Azolés
Ketoconazole	KET 50	50	Azolés

6.2.3.Préparation de l'inoculum

6.2.3.1.Les levures

A partir d'une culture pure, nous avons utilisé un écouvillon stérile. 3 à 4 colonies bien isolées, sont prélevées et émulsionnées dans 10ml d'eau physiologique stérile pour assurer une suspension homogène (pas de cellules agglomérées).

6.2.3.2. Les champignons filamenteux

A partir d'une culture pure d'*Aspergillus* l'utilisation et avec une pipette Pasteur stérile, nous avons gratté délicatement la surface de la colonie avec l'eau physiologique stérile et une goutte de Tween 20 comme agent émulsionnant pour aider les conidies à se disperser.

Pour les filamenteux, qui ne sporulent pas abondamment, nous avons ajouté une goutte de l'agent émulsifiant Tween 20 à l'eau physiologique stérile puis agité les champignons au vortex pour avoir une solution appropriée et après nous avons laissé la suspension au repos pendant quelques minutes afin que les grand segments hyphes aient le temps de s'installer, puis utiliser la couche homogène absolue pour obtenir la densité désirée de l'inoculum.

6.2.4. Inoculation des géloses

Selon les étapes suivantes :

- Plonger un écouvillon en coton stérile dans la suspension et éliminer l'excès de liquide en tournant l'écouvillon sur les parois du tube.
- Ecouvillonner sur la totalité de la surface de la gélose Sabouraud dans trois directions.
- Déposer les disques d'antifongiques (il est préférable de ne pas mettre plus de 7 disques sur une boîte de 90mm) à la surface de la gélose inoculée et séchée, le contact avec la surface doit être étroit.
- Les disques une fois déposés ne peuvent être déplacés car la diffusion des antifongiques est rapide.

6.2.5. Conditions d'incubation

Le tableau 09 présente l'atmosphère et la durée d'incubation recommandée pour chaque souche fongiques.

Tableau 09: Les conditions d'incubation des champignons isolés

Microorganisme	Conditions d'incubation
Les levures	35±2°C en aérobiose 2 à 3 jours
Les moisissures	25±2°C en aérobiose 5 à 7 jours

6.2.6.Lecture

- Les résultats sont interprétés par la mesure des diamètres des zones d'inhibition en millimètre.
- Comparer les résultats obtenus, classer la souche fongique dans l'une des catégorie S(sensible),R(résistante)ou I(intermédiaire).

Résultats


1. Identification des microorganismes isolés à partir des surfaces

1.1. Identification des bactéries




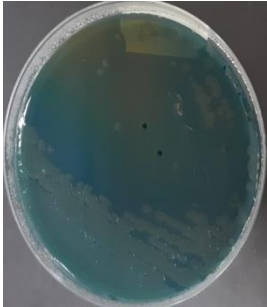
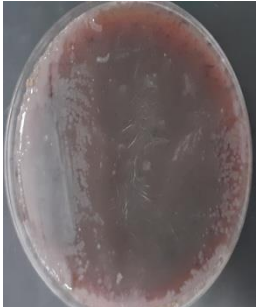
1.1.1. Etude des caractères macroscopiques des bactéries

Après un 24 heures d'incubation à 37°C, l'examen macroscopique sur les milieux utilisés Chapman, Hektoen et Gélose Chocolat a montré les différents caractères cultureux des colonies obtenus. Les résultats sont résumés dans le tableau(10) suivant:

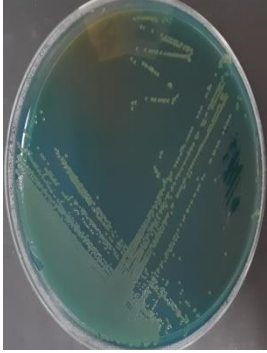


Tableau 10 : Résultats d'isolement des différents prélèvements effectués

Milieu N° De prélèvement	Chapman	Hecktoen	Gélose chocolat
01	x	x	x
02	x	x	x
03	x	x	Petites colonies blanchâtres Lisses, bombées 
04	x	x	x
05	x	x	x

Résultats

<p>06</p>	<p>Petites colonies pigmentées jaunes dorées ,lisses.</p> 	<p>x</p>	<p>Petites colonies blanches- jaunâtres Lisses</p> 
<p>07</p>	<p>x</p>	<p>x</p>	<p>Petites colonies blanchâtres, lisses.</p> 
<p>08</p>	<p>x</p>	<p>Colonies de taille moyenne vertes, lisses. Virage du milieu au jaune-vert.</p> 	<p>Petite colonies blanches, lisses.</p> 
<p>09</p>	<p>x</p>	<p>x</p>	<p>x</p>
<p>10</p>	<p>x</p>	<p>Petites colonies vertes, lisses, bombées à contour régulier. Virage du milieu au</p>	<p>Petites colonies blanches, lisses.</p>

Résultats

		jaune-vert. 	
11	x	x	Petites colonies blanchâtres, lisses. 
12	x	x	x

(x): absence de culture

1.1.2. Etude des caractères microscopiques des bactéries

Pour toutes les cultures positives, nous avons réalisé des examens directs à l'état frais et la coloration de Gram. Les résultats sont résumés dans le tableau (11) suivant:

Résultats

Tableau 11: Résultats de l'examen microscopique à l'état frais et la coloration de Gram

N° de prélèvement	Etat frais	Coloration de Gram
03	Immobiles	Cocci à Gram positif (+)
06	Immobiles	Cocci à Gram positif (+)
07	Immobiles	Cocci à Gram positif (+)
08	Mobiles	Bacille à Gram négatif(-)
10	Mobiles	Bacille à Gram négatif(-)
11	Immobiles	Cocci à Gram positif (+)

1.1.3. Etude des caractères biochimiques des bactéries isolées

Nous avons distingué trois types de cellules bactériennes pour confirmer ces résultats, nous avons réalisé une galerie biochimique classique pour chaque type (tableau 12).

Tableau N°12: caractères biochimique des germes isolés à partir des surfaces

Prélèvement	H2S	Gaz	Glu	Lac	Sac	Citrate de Simons	Mannitol	Mobilité	ONPG	Catalase	Coagulase	Souche
08 et 10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
N06	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	<i>Staphylococcus aureus</i>
03, 07 et 11	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>







1.2. Identification des champignons

1.2.1. Identification des moisissures



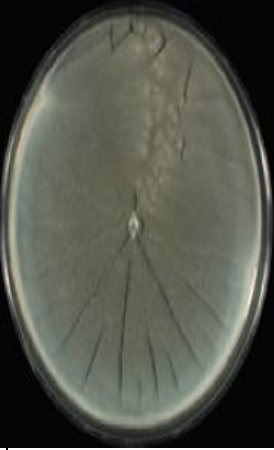




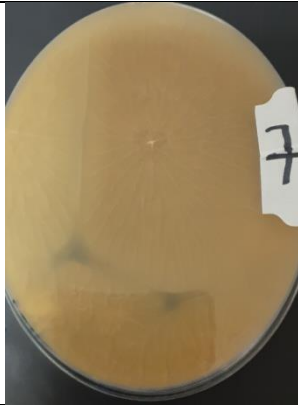




1.2.1.1. Etude des caractères macroscopiques

L'étude macroscopique a été réalisée par l'observation à l'œil nu pour distinguer les caractères culturaux (aspect de la colonie, couleur, revers et la vitesse de croissance). Les résultats obtenus ont été rassemblés dans le tableau ci-dessous (tableau 13).

Tableau 13: Caractères macroscopiques des souches fongiques

Prélèvement	Aspect macroscopique des isolats		Aspect macroscopique	Référence (Chabasse <i>et al.</i> , 2002).
	Surface	Revers		
01			Recto: colonie blanche au départ, devienne grise en vieillissant, a croissance rapide et extensive a une texture cotonneuse. Verso: incolore	
03			Recto: colonie grise au brun foncé, a croissance très rapide et extensive, a une texture laineuse. Verso: vert foncé à gris.	

Résultats

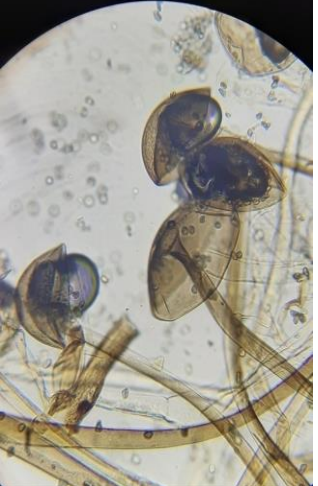

05			<p>Recto: colonie bleu-vert, veloutée, a croissance très rapide. Verso: brun-rouge.</p>	
06			<p>Recto: colonie granuleuse noire, a croissance rapide. Verso: jaune pâle.</p>	
07			<p>Recto: colonies duveteuses à poudreuses marron-gris, a croissance rapide. Verso: jaune pâle</p>	
11			<p>Recto: colonie extensive duveteuse à poudreuse d'abord blanche puis de couleur variée, jaunâtre, puis vert jaunâtre, a croissance lente Verso: jaune.</p>	

Résultats


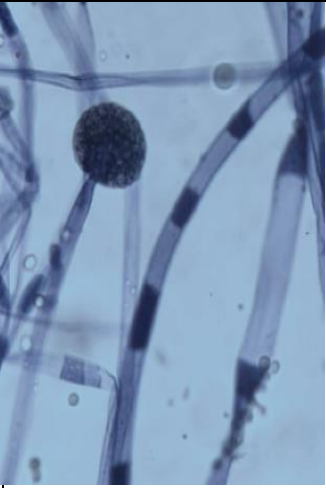
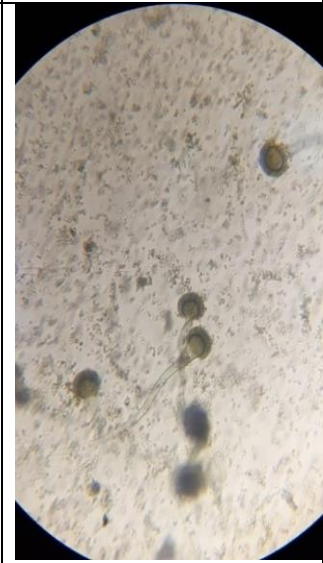

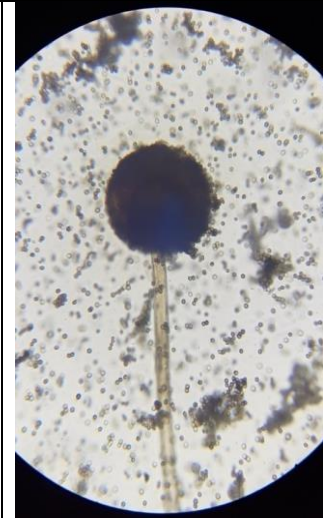

1.2.1.2. Etude des caractères microscopiques des moisissures

Toutes les moisissures isolées sont soumises à une identification microscopique réalisée par une observation au grossissement (X40). Cette identification étant fondée essentiellement sur l'étude morphologique de mycélium (absence ou présence des cloisons, couleur, différenciation) et des spores (forme, couleur, texture de parois). Les résultats obtenus ont été rassemblés dans le tableau (14).





Tableau N°14: Caractères microscopiques des souches fongiques isolées à partir des surfaces

N° De Prélèvement	Aspect microscopique X40	Photo microscopique de référence (Chabasse <i>et al.</i> , 2002).	Identification de la souche
01	<div style="display: flex;">  <div style="margin-left: 10px;"> <p>-Filaments de 06µm de large non septés.</p> <p>-Stolons, rhizoïdes et sporocystophores sont bien différenciés.</p> <p>-Les sporocystophores bruns sont disposés en bouquets.</p> <p>-Les sporocystes sont globuleux avec une columelle globuleuse, la columelle s'affaisse sur le sporocystophore (aspect en parapluie).</p> <p>-Les spores sont ovoïdes, isolés et disposés en chaînes.</p> </div> </div>		<i>Rhizopus sp</i>

Résultats

<p style="text-align: center;">03</p>		<ul style="list-style-type: none"> -Filaments large peu ou pas septés. -Pas de stolons ni rhizoïdes. -Tête vésiculaire glabre, la disposition des spores sur les trois quart. -Les spores rondes, lisses. 		<p style="text-align: right;"><i>Mucor sp</i></p>
<p style="text-align: center;">05</p>		<ul style="list-style-type: none"> -Conidiophore court, lisse et incolore avec un évasement progressif au sommet. -Vésicule hémisphérique. -Phialides directement portées par la vésicule, dressées, densément groupées. -Conidies petites, globuleuses, vertes, échinulées. -Tête aspergillaire unisériée, en colonne compacte, assez grande 		<p style="text-align: right;"><i>Aspergillus fumigatus</i></p>
<p style="text-align: center;">06</p>		<ul style="list-style-type: none"> -Conidiophore brunâtre, lisse. -Vésicule globuleuse. -Phialides insérées sur la vésicule par l'intermédiaire de métules disposées sur tout le pourtour de la vésicule. -Conidies globuleuses, brunes, échinulées. -Tête aspergillaire bisériée radiée, noire. 		<p style="text-align: right;"><i>Aspergillus niger</i></p>

Résultats

07		<p>-Vésicule sphérique, disposition radiaire. -Conidie a une structure bicouche, fortement rugueuse, de 3 à 5µm . -Spores lisses de 02µm de diamètre.</p>		<i>Aspergillus tubingensis</i>
11		<p>Conidiophore 03µm de large, lisse, jaunâtre, généralement long. Tête aspergillaire globuleuse, disposition radiaire des métules. Spores de 04µm globuleuse en chaînette.</p>		<i>Aspergillus oryzae</i>

1.2.2. Identification des levures

1.2.2.1. Etude des caractères macroscopique des levures isolées

Les résultats obtenus montrent que :

- **Le Prélèvement N°04:**

Les colonies de levures apparaissent sur milieu Sabouraud avec les caractères suivants:

- Culture positif au bout de 48 heures.
- Colonies blanches, crémeuse et brillantes.
- Tailles moyenne et lisses
- Forme rondes et bombées.
- Odeur de levure.

Résultats

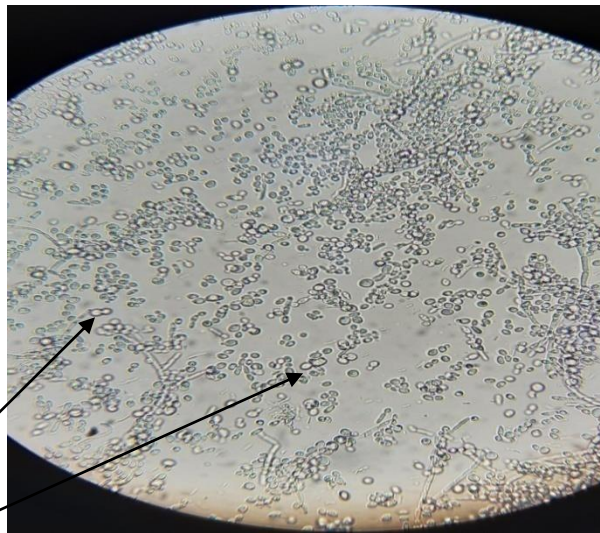
Les mêmes caractères morphologique des colonie de Candida ont été observés par (Kammalac, 2014) sur la gélose Sabouraud (figure06).



Figure 06: Aspect macroscopique des levures sur milieu Sabouraud.

1.2.2.2. Etude des caractères microscopiques des levures

- a. **Examen à l'état frais:** A l'état frais, les levures examinées apparaissent volumineuse, de forme ovulaire, ayant une mobilité moyenne et certaines sont bourgeonnantes (figure 07) .



Levures bourgeonnantes

Figure 07: Examen à l'état frais des levures vu au microscope optique (X40).

1.2.2.3. Identification des levures par le test Blastèse et Chlamydosporulation

Les résultats des tests de Blastèse et de chlamydosporulation des *Candida sp* isolées sont enregistrés dans le tableau ci-dessous (tableau 15).

Tableau 15: Résultats des tests de Blastèse et de chlamydosporulation

Prélèvement	Test de Blastèse	Test de chlamydoespores	Résultats
04	-	-	<i>Candida sp</i>

(-): Résultats négatifs.

D'après le tableau ci-dessus, on remarque que la souche isolée n'a pas formé des tubes germinatifs ni des chlamydoespores. Selon les deux tests négatifs, on peut prédire que la souche est une *Candida non albicans* (figure 08).

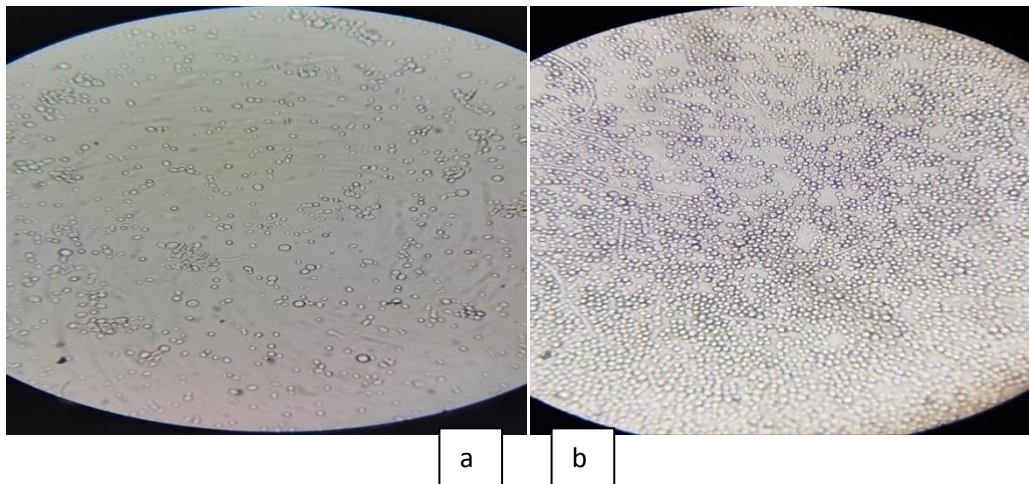


Figure 08: Identification des levures par le test Blastèse et Chlamydosporulation , a :Test de Blastèse, b : Test de chlamydoespores

Ces deux tests ne permettent pas la différenciation entre les espèces de *Candida*, c'est pour cela , nous avons complété l'identification par la galerie api 20C AUX.

Résultats

1.2.2.4. Identification par la galerie api 20C AUX

Sur la base des tests biochimique effectués par la plaque api 20C AUX, la lecture d'identification de la levure confirme au catalogue analytique api 20C, a révélé la présence du l'espèce *Candida famata* responsable de plusieurs pathologie (figure 09).

The image shows an API 20C AUX biochemical test strip. The strip is divided into two rows of wells: 48 h and 72 h. The wells are arranged in columns corresponding to different biochemical tests. The results are as follows:

Time	0	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADD	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	Hyphae/Pseudo-Hyphae
48 h	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
72 h	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Below the wells, there are boxes for "Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andre tests / Inne testy:" and "Ident. / Ταυτοποίηση :". The identification result is handwritten as *Candida famata* 95,6%.

Figure09: Résultats de la galerie biochimique api 20C AUX

2. Identification des microorganismes isolés à partir de l'atmosphère hospitalière

2.1. Identification des bactéries

Après incubation des boîtes de sédimentation à 37°C pendant 48 heures, les résultats sont révélés à 100% négatif (absence des colonies dans toutes les boîtes) (figure10).

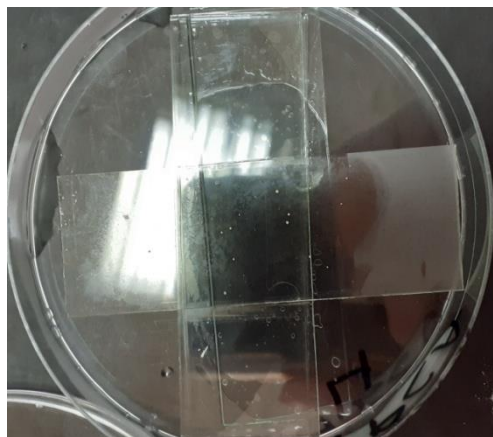
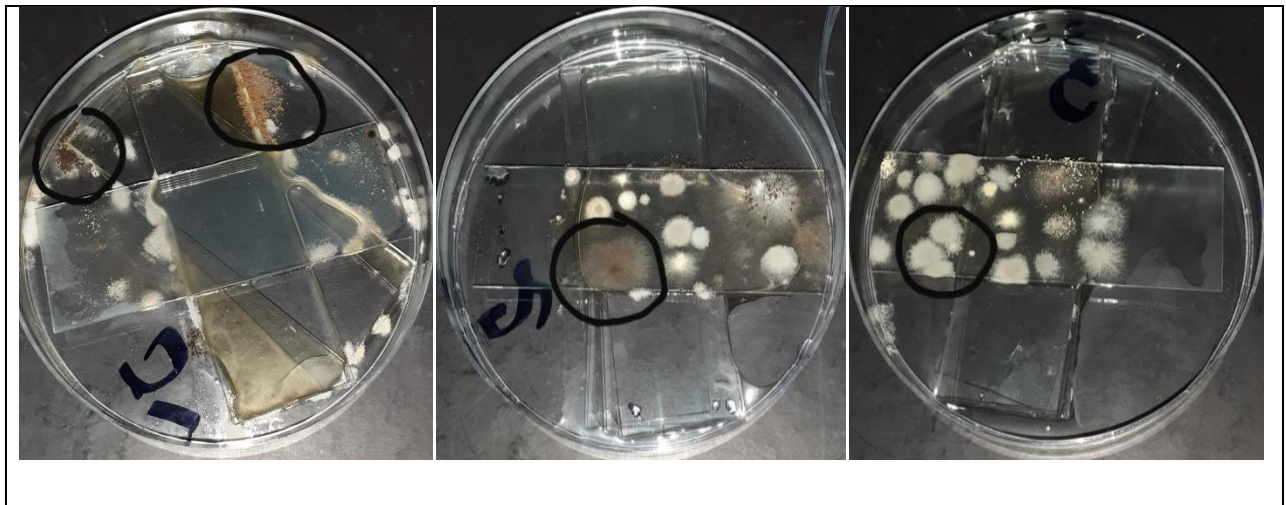


Figure 10: Résultats des prélèvements d'air

2.2. Identification des champignons

Après prolifération des moisissures sur milieu Sabouraud+Chloramphénicol pendant quelques jours, nous avons procédé à la sélection des différentes moisissures existantes, et pour cela nous nous sommes basé sur l'aspect macroscopique de la souche, et de là, nous avons déterminé 04 aspects qui ont été par la suites isolés et purifiés dans d'autres boites puis passés à l'identification macroscopique et microscopique (figure 11).






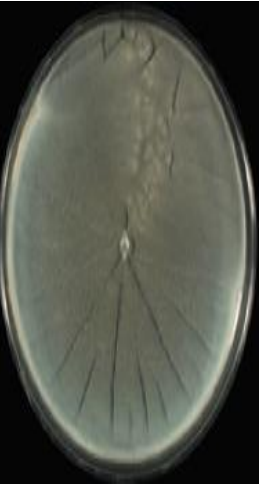


Figures 11: Moisissures sélectionnées







2.2.1. Etude des caractères macroscopiques des moisissures isolées à partir d'air:

Les moisissures isolées et purifiées sont identifiées par un examen macroscopique qui est effectué après une incubation de 07 jours à 28°C. Les résultats obtenus ont été rassemblés dans le tableau ci-dessous (tableau 16).

Tableau 16: Caractères macroscopiques des souches fongiques isolées à partir de l'atmosphère hospitalière

Lieu	Aspect macroscopique des isolats		Aspect macroscopique	Référence (Chabasse <i>et al.</i> ,2002).
	Surface	Revers		
Salle de soin (boite 01)			Recto: colonie de couleur jaune à chamois clair, a croissance rapide, présente une sorte de poussière dorées sur le milieu. Verso: jaune à brun.	
Réanimation (boite 02)			Recto: colonie bleu-vert, veloutée, a croissance très rapide. Verso: brun-rouge.	

Résultats

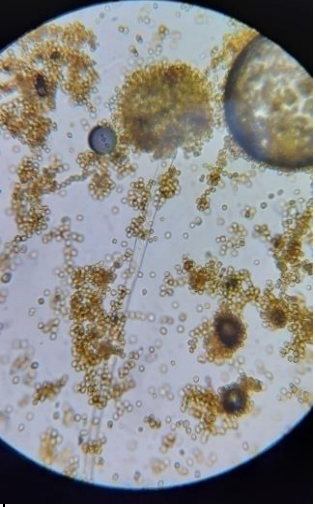

<p>Bloc opératoire (boite 03)</p>			<p>Recto: colonies duveteuses à poudreuses marron-gris, a croissance rapide. Verso: jaune pâle.</p>	
<p>Réanimation (boite 04)</p>			<p>Recto: colonie granuleuse noire, a croissance rapide. Verso: jaune pâle.</p>	

Résultats





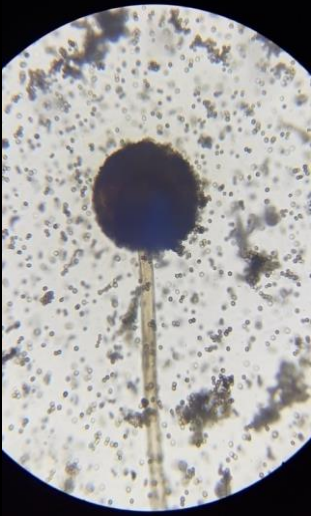

2.2.2. Etude des caractères microscopiques des moisissures isolées à partir d'air:

Après l'examen macroscopique, on passe à l'identification microscopique réalisée par une observation au grossissement (X40), les détails sont présentés dans le tableau (17).

Tableau N°17: Caractères microscopiques des souches fongiques isolées à partir de l'atmosphère hospitalières

N° De Boite	Aspect microscopique X40	Photo microscopique de référence (Chabasse <i>et al.</i> , 2002).	Identification de la souche
01 (salle de soin)	 <ul style="list-style-type: none"> -Tête sporifère jaune ochracé globuleuse puis dissociée en mèches à maturité. -Conidiophore rond rugueux, jusqu'à 1mm de long, pigmenté en jaune ou brun clair. -Visicule globuleuse, hyaline, le développement des phialides se fait sur l'ensemble de la tête conidienne. -Stérigmates bisériés. -Phialides formées sur des métules. -Conidies hyalines et globuleuses, finement rigeuses, 2,5-3µm 		<i>Aspergillus ochraceus</i>

Résultats

<p style="text-align: center;">02 (REA)</p>		<p>-Conidiophore court, lisse et incolore avec un évasement progressif au sommet. -Vésicule hémisphérique. -Phialides directement portées par la vésicule, dressées, densément groupées. -Conidies petites, globuleuses, vertes, échinulées. Tête aspergillaire unisériée, en colonne compacte, assez grande</p>		<p style="text-align: right;"><i>Aspergillus fumigatus</i></p>
<p style="text-align: center;">03 (Bloc opératoire)</p>		<p>-Vésicule sphérique, disposition radiaire. -Conidie a une structure bicouche, fortement rugueuse, de 3 à 5µm . -Spores lisses de 02µm de diamètre.</p>		<p style="text-align: right;"><i>Aspergillus tubingensis</i></p>
<p style="text-align: center;">04 (REA)</p>		<p>-Conidiophore brunâtre, lisse. -Vésicule globuleuse. -Phialides insérées sur la vésicule par l'intermédiaire de métules disposées sur tout le pourtour de la vésicule. -Conidies globuleuses, brunes, échinulées.-Tête aspergillaire bisériée radiée, noire.</p>		<p style="text-align: right;"><i>Aspergillus niger</i></p>

3. Etude de la sensibilité des souches isolées

3.1. Etude de la sensibilité des bactéries prélevées à partir des surfaces

3.1.1. Etude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques:

Le tableau 18 montre que les bactéries isolées (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) ont un effet considérable vis-à-vis aux antibiotiques utilisés:

- *Pseudomonas aeruginosa* présente une résistance naturelle de la plupart des β -lactamine, elle montre également une résistance aux SXT et CHL, et une sensibilité naturelle aux IMP, GMN, AN, CIP, COL (figure 12).
- *Staphylococcus aureus* présente une résistance naturelle aux β -lactamine (AM, CTX, GMN).
- *Staphylococcus epidermidis* sensible à la majorité des antibiotiques.

Tableau N°18: L'antibiogramme des bactéries isolées de l'environnement hospitalier

Germe	AM	TIM	CAZ	CTX	CZN	FOX	IPM	GMN	AN	CIP	SXT	COL	CHL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R
<i>Staphylococcus aureus</i>	R	/	/	R	/	/	/	R	/	/	/	/	S
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	/	/	S	/	/	/	S	/	/	/	/	S

(R):Résistante

(S): Sensible

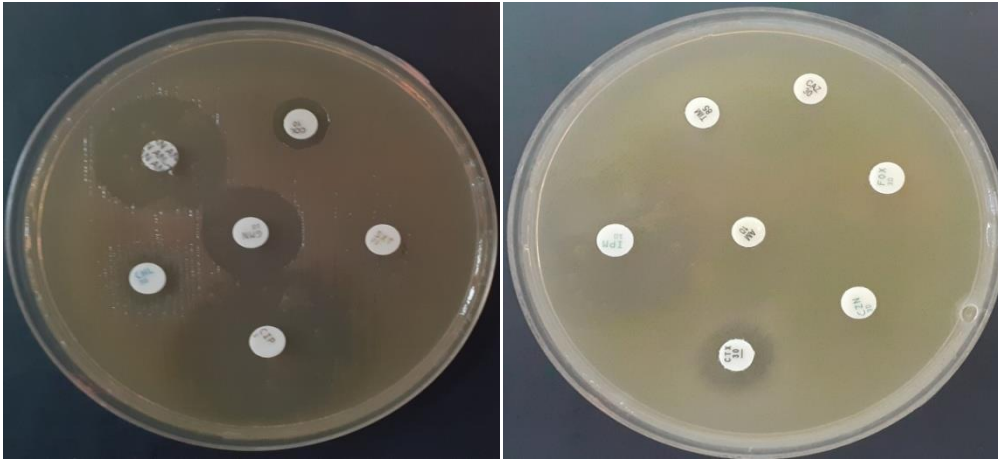


Figure 12: L'antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa*.

3.2. Etude de la sensibilité des champignons vis-à-vis les antifongiques:

Pour ce test nous avons privilégié 06 antifongiques dans le but de mettre à jour leur pouvoir inhibitrice contre trois souches fongiques.

Les résultats finals sont démontrés dans le tableau(19).

Tableau N°19: L'antifongigramme des souches fongiques isolées à partir de l'environnement hospitalier

Germe	AB	5FC	VOR	ITR	POS	KET
<i>Aspergillus fumigatus</i>	R	S	S	I	R	I
<i>Aspergillus niger</i>	R	I	S	R	I	I
<i>Candida famata</i>	S	S	S	S	I	S

(R): Résistante

(I): Intermédiaire

(S): Sensible

Discussion

Notre travail s'articule sur l'isolement et l'identification des bactéries et des champignons (moisissures et levures) et nous avons basé sur les caractères morphologiques, culturels et biochimiques.

1. Isolement à partir des surfaces

1.1. Bactéries

6 souches ont été isolées et identifiées au cours de la période d'étude représentant deux formes, les cocci à Gram positif prédominant avec un taux de 66,67% (4/6) et les bacilles à Gram négatif avec un pourcentage de 33,33% (2/6) des cas. Nos résultats sont différents au pourcentage rapporté par (**Boncana, 2007**), qui a trouvé un pourcentage de 33% pour les cocci à Gram positif et un pourcentage égal à 53% pour les Bacilles à Gram négatif

Les bactéries à Gram positif représentent 66,66% de l'ensemble des bactéries isolées avec une prédominance des *staphylococcus epidermidis* avec un taux de 75% (3/4), suivi des *staphylococcus aureus* avec un taux de 25% (1/4)

Toutes les bactéries à Gram négatif sont représentées par l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* avec un taux de 100% (2/2).

1.2. Champignons

1.2.1. Moisissures

Les résultats obtenus montrent que 6/11 prélèvements des surfaces ont été purifiés et identifiés. Le genre *Aspergillus* représente un nombre relativement élevé avec un taux de 66,66% (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus oryzae*). Ce résultat est relativement élevé par rapport à celui rapporté par (**Savy, 2005**), *Rhizopus sp* et *Mucor sp*, avec un taux de 16,67% pour chaque moisissure.

1.2.2. Levures

Nous avons basé sur les caractères biochimiques effectués par la plaque API 20C AUX, Une seule espèce de levure a été isolée et mise en évidence, c'est *Candida famata*.

Les candidoses restent les infections fongiques les plus fréquemment diagnostiquées. Elles représentent 7% des infections nosocomiales ce qui les place au sixième rang après les infections par les Entérobactéries, Staphylocoque à coagulase négative, *Staphylococcus aureus*, à Entérocoques et par *Pseudomonas*.

Les levures de genre *Candida* sont des saprophytes du tube digestif qui peuvent provoquer des infections superficielles touchant les muqueuses et la peau et des infections viscérales. Les candidas sont souvent responsables d'infections nosocomiales systémiques qui peuvent être la conséquence de contamination nosocomiales exogènes, souvent chez les patients ayant des cathéters intra vasculaires, ou bien ils peuvent être responsables d'infections consécutives au passage vers le sang et les organes profonds endogènes (**Cordonnier et Herbrecht, 2000**).

2. Prélèvements de l'air

2.1. Bactéries

La méthode de sédimentation ne mesure pas de concentration en micro-organismes dans l'air mais bien le nombre d'UFC sédimentées par unité de temps (**Pasquarella et al., 2008**).

Après incubation des boîtes de sédimentation pendant 48 h, nos résultats étaient à 100% négatif contrairement à celle trouvés par Abbas et Lekehal en 2017 qui montre que la plupart des souches isolées à partir de l'air proviennent du service de pédiatre avec un taux de 33.33%.

2.2. Champignons

2.2.1. Moisissures

En se basant sur l'aspect macroscopique et microscopique des souches isolées à partir de l'atmosphère de la salle de réanimation, du bloc opératoire et de la salle de soin, les résultats ont montré une présence d'une flore fongique pathogène du genre *Aspergillus* représentant 4 espèces : *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus tubingensis*. Un taux particulièrement élevé d'*A.fumigatus* (22 UFC/m³) a été relevé le 9 mai 2007.

Ceci était en fait dû à un problème sur le système de filtration de la hotte et le remplacement du filtre a conduit au retour à des valeurs normales.

Selon l'explication montrée par (**Beguin, 1995**), les spores fongiques en général, et celles d'*Aspergillus* en particulier, sont véhiculées par l'air et sédimentent ensuite sur les surfaces ou dans les poussières où elles restent viables fort longtemps. C'est ainsi que le genre *Aspergillus* est l'un des 3 genres de moisissures les plus communs dans les domiciles

Aussi d'autres résultats ont montrés que certaines spores rugueuses et stables dans l'air comme celles d'*Aspergillus fumigatus* peuvent se maintenir plusieurs heures dans l'air alors qu'*Aspergillus niger* (spores lisses) retombent rapidement (**Ljungqvist et Reinmüller, 2000**), c'est pour ça qu'en milieu hospitalier, *A.fumigatus* est l'espèce thermotolérante la plus fréquente dans l'air et sur les surfaces (**Lau et al., 2000**).

3.Résistance des souches isolées

3.1.Bactéries

Selon les résultats des antibiogrammes, nous avons noté une résistance allant jusqu'à 61,53% qui caractérise l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*, ce taux reste proche par rapport aux taux de résistance rapporté par (**Madi et Djema,2019**) qui ont trouvé un taux de 66,66%. Cependant, ce taux reste plus élevé par rapport aux taux rapportés en Algérie, 16,6% à Annaba (**Touati, 2013**), 38% au CHU d'Oran (cliniques et environnementales) (**Sefraoui, 2015**). Cette résistance est liée aux :

- Mécanisme enzymatique par hyperproduction des céphalosporine chromosomique de classe A (la superproduction de céphalosporines constitue le mécanisme de résistance à la céftazidime le plus fréquemment retrouvé chez les souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées dans divers pays de la Méditerranée (**Garcia-Rodriguez et jones,2002 ;kalai et al.,2004 ;Dubois et al.,2008 ;El-Mahdy,2013**)).
- modifications enzymatiques, les N-amino-acétyltarnsférasés (AAC 3')-I (Résistance à la gentamycine) et AAC (6')-Ib (résistance à la tobramycine et l'amikacine) sont les plus répandus chez les isolats de *Pseudomonas aeruginosa* (**Strateva et Yordanov, 2009**).
- Changements dans les enzymes ADN gyrase et topoisomérase IV qui représentent les cibles majeure pour les quinolones et l'efflux actif (**Lee et al., 2005; Nakajima et al.,2002**).

D'après les résultats montrés dans le tableau 18, nous avons noté que l'espèce *Staphylococcus aureus* se caractérise par un taux de résistance élevé allant jusqu'à 75% pour les Amoxicillines, céfotaxime et gentamicine. Ces résultats sont comparables à ceux rapporté en clinique par(**Ghernaout,2013**).

Cependant, nous avons noté que l'espèce *Staphylococcus epidermidis* présente un taux de résistance de 25% seulement pour les amoxicillines.

3.2. Champignons

Selon nos résultats, la sensibilité des souches fongiques aux: 5-fluorocytosine, voriconazole, itraconazole, posaconazole, ketoconazole, indiqué sur le tableau 21, explique l'utilisation de ces antifongiques pour le traitement médical:

- ✓ 5-fluorocytosine : la molécule pénètre dans la cellule fongique grâce à la cytosine perméase et devient active grâce à la cytosine désaminase.
- ✓ Voriconazole (Vfend): il s'agit de la seule molécule ayant clairement démontré à ce jour une supériorité dans le traitement de l'aspergillose invasive comparé à l'Amphotéricine B conventionnelle (**Stroman *et al.*, 2001**).
- ✓ Itraconazole (Sporanox) : il est actif sur les *Candida sp* et les *Aspergillus sp*.
- ✓ Posaconazole : c'est un azolé de dernière génération, à large spectre, utilisé pour le traitement de 2^{ème} intention de l'aspergillose invasive.
- ✓ Ketoconazole (Kétoderm) : sa bonne pénétration des tissus en particuliers au niveau de la peau en fait le traitement de choix de la condidose cutanéomuqueuse.

Conclusion

Conclusion

Notre travail a été réalisé au niveau de l'EHS De Pédiatre, Mansourah Constantine, pour rechercher la contamination fongique et bactérienne en milieu hospitalier.

Nous avons obtenus 22 prélèvements de différentes souches microbienne (bactéries, levures, moisissures), et ont été recueillis avec un total de 6 souches bactériennes et 16 souches fongiques (15 moisissures et 1 levure).

La première investigation a révélé la prédominance des Gram positifs (66,66%) par rapport au Gram négatifs (33,33%).

L'identification des souches fongiques a montré une prédominance du genre *Aspergillus* avec un taux de 80% (8/10) suivi par le genre *Mucor* avec un taux de 20% (2/10).

L'étude de la résistance des bactéries aux antibiotiques, nous avons permis d'enregistrer un taux de résistance de 61,53% pour *Pseudomonas aeruginosa*, qui a été testée en présence de 13 antibiotiques; à noter que cette dernière a été trouvée résistante vis-à-vis 8 ATB et sensible vis-à-vis 5 ATB.

Les résultats de l'antibiogramme des souches de *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* ont montré un taux de résistance de 75% et 25% respectivement.

Cependant aucune résistance n'a été détectée vis-à-vis de CHL ce qui maintient l'efficacité de cet antibiotique dans le traitement des infections dues à ces bactéries.

Les résultats de l'antifongique des 3 souches fongiques, nous avons permis d'enregistrer un taux de sensibilité importants vis-à-vis l'antifongique VOR ce qui maintient l'efficacité de cet antifongique dans la lutte biologique pour ces 3 souches.

Pour éviter toutes défaillance du coté hygiène et diminuer les risques infectieux dans le milieu hospitalier nous proposons les solutions suivantes:

- ❖ Impliquer l'administration hospitalière dans la lutte contre l'infection et le facteur favorisant
- ❖ Organiser des campagnes régulières pour sensibiliser les personnels concernant la lutte contre les infections nosocomiales et ces facteurs de risque.
- ❖ Organiser des stages de formation pour les agents de ménage.

Conclusion

- ❖ Obliger la direction de l'hôpital d'effectuer des prélèvements réguliers pour évaluer la qualité de l'air ambiant et des surfaces.
- ❖ Augmenter le chiffre financier destiné à l'hygiène, la désinfection, le réaménagement des services et la réparation des systèmes de traitement de l'air ambiant.
- ❖ Effectuer des visites régulières d'inspection.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques



- **Abbas L.,Lakehal Z. (2017).**Contrôle microbiologique de l'environnement hospitalier : cas de l'Etablissement Public Hospitalier Mohamed Boudiaf de la wilaya de Bouira.
- **Abraham D.(2018).** Identification des souches d'*Escherichia coli* dans les selles en rapport avec la malnutrition a DIORO .Thèse de doctorat en Pharmacie .BAMAKO : université des sciences, des techniques et des technologies de Bamako.P: 5.
- **Adeline SAVY.(2005).**Evaluation de la connaissance du risque fongique en milieu hospitalier -RENNES.
- **Ahamogbe K .A .L. (2014).**Résistance bactérienne en cas d'infection de plaies diabétiques : diagnostic et surveillance au laboratoire Rodolphe Mérieux de Bamako .Thèse de doctorat en pharmacie .Université des sciences des techniques et des technologies de Bamako. P:74.
- **Alain R. (2004).** Hygiène et soins infirmier. P:205.
- **Albert B et William J. H., keneth L. H. (1991).**Manual of clinical microbiology .5^{ème} édition, ASM. P:243.
- **Alpha A.(2013).** *Eschréchia coli* pathogène et résistantes aux antibiotiques dans les effluents d'origine humaine et animales : prévalance et caractérisation avant et après traitement épuratoire. Thèse de doctorat en Microbiologie, Toulouse : Université de Toulouse. P: 4.
- **Andre J., Katsanis G., BOIRIER J., Ctala M. (2007-2008).**Histologie : organes, Université Bière et Marie Curie. P:11-15.
- **Annie Pfohl-Leszkowicz.(2010).**Exposition à des moisissures dans le milieu hospitalier et dans des usines de production de biogaz-Intérêt des protections individuelles et collectives. Bulletin deveilles scientifiques (n°11). P: 59-62.
- **Anoffel. (2014).** Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie Aspergilloses et autres champignons filamenteux opportunistes.
- **Anonyme. (2003).** Mode d'emploi-Milieus en boites de pétri prêts à l'emploi. BD Mycosel agar BD Sabouraud with Chloramphénicol and cycloheximide.
- **Ascioglu S., Rex JH., De Pauw B., Bennett JE., Bille J., Crokaert Fet al.(2002).**Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. Clin Infect Dis. P: 7–14.

Références Bibliographiques

- **Audurier A et De Micco P.** (1998). Les CLINS et les unités d'hygiène hospitalière. In: Hygiène Hospitalière. Ed. Presses Universitaires de Lyon. Lyon. P : 135-156.

B

- **Barbut F., Neyme D.(2006)** .Les difficultés d'interprétation des contrôles microbiologiques environnementaux. Revue Francophone des Laboratoires. P:382.
- **Beguin H. (1995).** Mould biodiversity in homes. II. Analysis of mattress dust. Aerobiologia. P : 3-10.
- **Bent mohamed A., Mint Sida baba A. (2008).** Manuel de travaux pratique microbiologie. Université de nouakchott. P: 18-22.
- **Bertrou A., Chapuis C et Hajjar J. (2000).**Relations entre contamination et environnement hospitalier. In: Vigilance Environnementale: Contrôles microbiologiques de l'environnement hospitalier. Hygiènes. P : 142-146.
- **Bingen E., Courvalin P., Leclercq R.(2011).**L'Antibiogramme. Editions ESKA, BARRISSE. P:266.
- **Birgand G.(2014).** Infection de site opératoire : Approche originales du diagnostique et de la prévention. Thèse de doctorat en épidémiologie .Paris : université PIERRE ET MARIE.
- **Bosi C.(2000).**Analyse Bactériologique de l'Environnement Hospitalier. Précis de Bactériologies Clinique. Ed. ESKA. Paris. P: 408-437.
- **Boncana Abdourhamane., TRAORE M.(2007).** Les infections nosocomiales dans le service de chirurgie générale du CHU GABRIEL TOURE – MALI.
- **Botton B., Breton A., Fevre M., Ganthier S., Gux PH., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y et Veau P.(1990).** Moisissures utiles et nuisibles importances industrielles.2 Ed. Milan Barcelone mexico. Paris .P:120.
- **Boulestreau Hélène. (2016).**Surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé Guide de bonnes pratiques.
- **Bourgeois C., Leveau J.(1980).** Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaire, volume 3 : le contrôle microbiologique, collection Sciences et techniques agro-alimentaires. P: 331.
- **Boyce JM., Potter-Byone G., Chenevert C., King T.(1997).** Environnemental contamination due to methicillin-résistant *Staphylococcus aureus* : possible infection control implications. Infect Control HospEpidemiol. P: 18.

Références Bibliographiques

Ƨ

- **CAFM/EUCAST. (2018).**Société Française de Microbiologie Ed. P:07-13.
- **Callon C.(1997).** Les levures. In Larpent J-P. Microbiologie alimentaire Technique de laboratoire. Technique et Documentation. Paris. P: 472-564.
- **Cécile T. (2012).** Aspect clinique des infections cutanées à *Staphylococcus aureus* sécréteurs de Leucocidine Depanto Valentine à propose de 15 cas .Thèse de doctorat en Médecine Nancy : université de Lorraine Nancy. P:39.
- **Chabasse D., Bouchra J.P., Gentile L., Brun S and Penn P. (2002).**Cahier de formation biofarma : les moisissures d'intérêt medical. Labo Analyse De biomédicale.
- **Chanfir A. (2016).** Les pneumonopathies nosocomiales en milieu de réanimation à l'Hôpital militaire Avicenne Marrakech .Thèse de doctorat en Médecine. Université Cadi Ayyad. Marrakech. P: 92.
- **Choley P. (2010).** Analyse génétique des souches multi-résistantes de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'est de la France, apport prédictif potentiel sur le risque infectieux .Thèse dedoctorat en science de la vie et de la santé. Université de Franche –compte. Besancon .P:21.
- **Chouitar M.(2004).** Contribution au développement de l'hygiène hospitalière au Maroc, INAS. P: 67.
- **Cordonnier C., Herbrecht R. (2000).** Infection en hématologie, ed. Jhon Libbey Euro text; Paris. P:138

Ƨ

- **Dancer S. J. (2004).**How do we assess hospital cleaning: A proposal for microbiological standards for surface hygiene in hospitals. J Hosp Infect.P:56.
- **Delarras C.(2008).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Lavoisier édition Tec&Doc.
- **Develoux M., Bretagne S. (2005).** Encycl Méd Chir Maladies Infectieuses. P:120-122.
- **Ducel G. (2002).**Prévention des infections nosocomiales .organisation mondial de la santé, 2ème édition .Fondation Hygiène : Genève, suisse . P:80.

Références Bibliographiques

Æ

- **Eggimann P., Garbino J., Pittet D.(2003).** Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill nonimmunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis.* P: 685–702.
- **Elmeskini K.(2011).** Etude épidémiologique des infections à *pseudomonas aeruginosa*. Thèse de doctorat. Pharmacie. RABAT : Université Mohammed V. P:4.

F

- **Fikri Ben Brahim.(2006).**Cours d'hygiene hospitaliere, INAS.
- **Franche R. (2004).** Maladie infectieuses.Paris : Ed. Heure de France .Chapitre 6, les infections nosocomiales. P:144-156.
- **Francias N. (2002).** Analyses microbiologiques des aliments de l'eau : directives pour l'assurance qualité. Edition Tec et Doc. P: 87-134.
- **François D., Edouard B., Christian M., Maric C et Renald. (2007).**Bactériologie médical: Technique usuelles .2 end édition .Elsevier Masson. P:274.
- **François D., Vincent C., Christian M., Marie-Cécile P., Claire P.(2016).** Bactériologie Médical: Techniques Usuelles. 3ed édition. P:23P.

G

- **Garcia-Rodriguez J.A., Jones R.N. (2002).** Antimicrobial resistance in Gram-negative isolates from European intensive care units: data from the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) programme. *J. Chemother.* P: 25-32.
- **Gerald Karp., Janet IsaWa., Wallace Marshall. (2018).** Biologie cellulaire et moléculaire de Karp.4e édition. P:752.
- **Ghernout S.(2013).** Prévalence du portage nasal de *Staphylococcus aureus* : son rôle dans l'infection de site opératoire .Thèse de doctorat en science médicale .Tlemcen : université aboubeker Belkaid.P: 15- 68.
- **Guezlane-Tebibel N., Kahlouche B., Athmani-Guemouri S. (2008).** Microbiologie. Ed 1, Office des publications universitaires, Alger. P:99-100.

Références Bibliographiques

H

- **Haeggman S., Lofdahl S., Burman L.G. (1997).** An allelic variant of the chromosomal gene for class a beta-lactamase K2, specific for klebsiella pneumoniae, is the ancestor of shv-1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. P:2705-2709.
- **Harley E., Klein J.(2010).** *Microbiologie*. 3ème édition de Boeck, Bruxelles. P: 543, 578, 580.

I

- **Idoui T., Boudjerda J., Leghouchi E., et Karam N.E.(2009).** Lactic acid bacteria from "Sheep's Dhan", a traditional butter from sheep's milk: Isolation, identification and major technological traits. *Gr. Y. Aceites*, vol 60 n°2. P:177-183.

J

- **Jacque B.(2014).** *Le technicien d'analyse biomédicale* 2 eme édition. P:87.
- **Joffin J.N. et Leyrol G. (2001).** *Microbiologie Technique 1: dictionnaire des techniques*. 3ième éditions ; CRDP d'Aquitaine. des aliments. Paris: T 1, Tec et doc Lavoisier. P:230.

K

- **Khan AAH., Karuppayil SM., Manoharachary C et al. (2009).** Isolation, identification and testing for allergenicity of fungi from air-conditioned indoor environments. *Aerobiologia*. P: 25(2):119-23.
- **Khayar Y. (2011).** Comportement des entérobactéries isolées des urines vis-à-vis de
- **Kings S, et al.(1968).** A new plating medium for the isolation of enteric pathogens. II. comparison of hektoen enteric agar With SS and EMB agar. *Appl. Microbiol*. P:577-578.
- **Kone komba D.(2010)** .Fréquence d'isolement des *Klebsiella* au laboratoire de bactériologie Duchu Gabriel Toure de 2002 à 2007.Thèse de doctorat en Pharmacie. Université de L'Amoxiciline –Acide clavulanique l'imipeneme et l'ertapeneme. Thèse de doctorat.

Références Bibliographiques

I

- **Lau S., Illi S., Sommerfeld C et al. (2000).** Early exposure to house-dust mite and cat allergens and development of childhood asthma: a cohort study. Multicentre Allergy Study Group. P: 1392-1397.
- **Lee J.K., Lee Y.S., Park Y.K., Kim B.S. (2005).** Alterations in the GyrA and GyrBsubunits of topoisomerase II and the ParC and ParEsubunits of topoisomerase IV in ciprofloxacin-clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Int. J. Antimicrob. P: 290-295.
- **Le Heurt M., Gomila H., Guirot S. et Rifaoni M. J. (1995).** Hygiène. In. Nouveau Cahier de l'Infirmière. Ed. Masson. Paris. P:158.
- **Linass M.D., Cassaing S. (2001).** Méthodes d'évaluation in vitro des antifongiques: étude comparative des différents tests; Revue Française des Laboratoires. P:332.
- **Lionel H.(2003).** Hygiène et soins infirmiers.2eme édition.
- **Ljungqvist B., Reinmüller B. (2000).** Airborne viable particles and total number of airborne particles: comparative studies of active air sampling. PDA J PharmaSciTechnol. P : 112-116.
- **Lucet J. C., Astragneau P. (1998).** Transmission des infections nosocomiales. Principe et prévention. In: Infection nosocomiales et environnement hospitalier. Ed. Flammarion. Paris. P: 7-10.

M

- **Maddi S., Djema K. (2019).** Isolement et caractérisation des bactéries multi résistantes impliquées dans les infections nosocomiales et l'environnement hospitalier au niveau de l'hôpital de LAKHDARIA.
- **Malek K.,Mino Jc., Lacombe K.(1996).** Santé publique: médecine légale, médecine du travail Paris Éd. ESTEM. P:49-51.
- **Marchal N., Bourdon J.I et Richard C. (1982).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Biologie appliquée. Editions Douin, Paris. P:50-364.
- **Maryem L. (2016).** Les infections nosocomiales en réanimation pédiatrique .Thèse de doctorat en médecine .Université de Kaddy Ayyad .Faculté de médecine et de pharmacie .Marrakech. Pp:117.

Références Bibliographiques

- **Menan H., Ekaza E., Messou E., Adoubryn K., Yavo W., Kiki-Barro Pet Kouassi B.T. (2008).** Recherche de candida dubliniensis chez des patients VIH+ à Abidjan (Côte d'Ivoire). Journal de Mycologie Médical/Journal. P: 228-233.
- **Mereghetti L.(1998).** Surveillance et controle de l'environnement hospitalier. *In.* Hygiène Hospitalière. Ed. Presses universitaires de Lyon. Lyon. P. 337-346.
- **Monnet T. (2011).** Les infection nosocomiales :L'importance d'un suivi épidémiologique et de l'identification rapide des bactéries en cause. Thèse de doctorat en Pharmacie .Grenoble : Université Joseph Fourier. P: 21.
- **Moselio S., Gerald M et Barry E. (1993).** Microbiologie et pathologie infectieuse.2^{ème} édition. P:285.
- **Mulvey M., Simor R. (2009).** Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be? CMAJ 180(4): Pp 408-415.Pharmacie .Université Mohammed V. Rabat .P: 10-15.



- **Pasquarella C., Albertini R., Dallaglio P., Saccani E., Sansebastiano G.E et Signorelli C.(2008).** Air microbial sampling: the state of the art.P:79-120.
- **Pigasse C. (2000).** Proposition d'un protocole d'analyses microbiologiques de substrats thermaux utilisés dans le cadre d'application cutanée. Rédigé dans le cadre du projet de recherche en collaboration entre AFRETH (Association Françaises pour la Recherche Thermale)-Les établissements thermaux de Balaruc-les-bains-l'Université Paul Sabatier. P: 6-7



- **Rutala W. A., Weber D. J. (1999).** Infection control: the role of disinfection and sterilization. J Hosp Infect. P: 43-55.



- **Samou F. S. (2005) .** Les infections nosocomiales dans le service de chirurgie «B» de l'hôpital de point G .thèse de doctorat en Médecine. Université de Mali. P:33-57.
- **Sefraoui I. (2015).** Etude de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau de différents hôpitaux de l'ouest algérien. [Thèse]. Université Abou Baker Belkaied-Tlemcen(Algérie). P:78.
- **Sheretrez R.J et Basseti B.(2001).** «cloud» health-care workers. Emerge infect. P: 241-244.

Références Bibliographiques

- **Singleton P. (1999).**Bactériologie (cours 2ème cycle) ; DUNOD; 4eme édition, Paris.
- **Singleton P. (2005).** Bactériologie: pour la médecine, la biologie et les biotechnologies: cours. Dunod.
- **Steimen R., Seigle-Murandi F et Sage L.(1988).** L'antifongogramme des dermatophytes. Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. P: 139,485-491.
- **Strateva T., Yordanov D. (2009).** *Pseudomonas aeruginosa*.a phenomenon of bacterial resistance.J. Med. Microbiol. Pp:58: 1133-1148.
- **Stroman DW., Roland PS, Dohar J., Burt W.(2001).**Microbiology of Normal External Auditory Canal. The Laryngoscope. P:111(11):2054-9.

T

- **Touati M. (2013).** Antibio-résistance des bacilles à Gram négatif non fermentants isolés au niveau des services de réanimation - CHU Annaba. [Thèse]. Université Badji Mokhtar-Annaba (Algérie). P:137.

V

- **Vandepitte J et al. (1991).** Basic Laboratory procedures in Clinical Bacteriology. World Health Organization .Geneva. 1st edition.

Y

- **Yves L., Michel G. (2009).** *Staphylococcus aureus* .Paris : Lavoisier. P: 1-61.

Résumés

Résumé

Le travail présenté consiste à évaluer le niveau de contamination atteint dans les services réanimation et chirurgie de l'Etablissement Hospitalier Spécialisé De Pédiatrie Mansourah Constantine par l'isolement des bactéries et champignons à partir de plusieurs sites de l'environnement hospitalier pendant trois mois . A partir des prélèvements de surfaces, 06 souches bactériennes ont été isolées et identifiées représentant 3 espèces : *Staphylococcus epidermidis* est l'espèce la plus dominante avec un taux de 50% , suivie par *Pseudomonas aeruginosa* avec un taux de 33,33% et enfin *Staphylococcus aureus* avec un taux de 16,16%; 06 souches des moisissures ont été isolées et identifiées représentant 3 genres : *Aspergillus* avec un taux de 66,66%, suivie par *Rhizopus sp* et *Mucor sp* avec un taux de 16,67%, pour les levures, une souche de *Candida famata* a été isolée et identifiée. Par ailleurs , les résultats de prélèvement d'air ont montrés la présence d'une flore fongique des *Aspergillus*. Les tests de sensibilité aux antibiotiques et aux antifongiques ont été réalisés pour les souches isolées. La présence des microorganismes en grand nombre va permettre leur transmission directe ou indirecte au malade ce qui engendre l'apparition des infections nosocomiales.

Mot clés : Contamination, isolement, bactéries, champignons, sensibilité, les services réanimation et chirurgie.

Abstract

The work presented consists of assessing the level of contamination reached in the surgical and resuscitation departments of “l'Etablissement Hospitalier Spécialisé De Pédiatrie, Mansourah, Constantine” by isolating bacteria and fungi from several sites of the hospital environment for three months. From surface sampling, 06 bacterial strains were isolated and identified representing 3 species: *Staphylococcus epidermidis* is the most dominant species with a rate of 50%, followed by *Pseudomonas aeruginosa* with a rate of 33.33% and finally *Staphylococcus aureus* with a rate of 16.16%; 06 strains of mold were isolated and identified representing 3 genres: *Aspergillus* with a rate of 66.66%, followed by *Rhizopus sp* and *Mucor sp* with a rate of 16.67%, for yeast, a strain of *Candida famata* was isolated and identified. In addition, air sampling results showed the presence of a fungal flora of *Aspergillus*. Antibiotic and antifungal sensitivity tests were performed for the isolated strains. The presence of microorganisms in large numbers will allow their direct or indirect transmission to patients, which leads to the appearance of nosocomial or hospital-acquired infections.

Keywords: Contamination, isolation, bacteria, fungi, sensitivity, surgical and resuscitation departments.

ملخص

يتألف العمل المقدم من تقييم مستوى التلوث الذي تم الوصول إليه في أقسام الجراحة والإنعاش في "مستشفى طب الاطفال المختص ، بالمنصورة قسنطينة"، من خلال عزل البكتيريا والفطريات من عدة مواقع في بيئة المستشفى لمدة ثلاثة أشهر.

تم عزل وتحديد 06 سلالة بكتيرية من العينات السطحية تمثل 3 أنواع:

Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus epidermidis

بنسبة 50% (أكثر الأنواع انتشاراً) ، 33.33%، 16.16% على التوالي.

تم عزل وتحديد 06 سلالات من العفن تمثل 3 أنواع هي :

Rhizopus sp و Mucor sp, Aspergillus

بنسبة 66.66% و 16.67% على الترتيب، أما بالنسبة للخميرة فقد تم عزل وتحديد سلالة:

Candida famata

بالإضافة إلى ذلك ، أظهرت نتائج أخذ عينات الهواء وجود فطريات :

Aspergillus

تم إجراء اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية ومضادات الفطريات للسلالات المعزولة.

يسمح وجود الكائنات الحية الدقيقة بأعداد كبيرة بنقلها المباشر أو غير المباشر إلى المرضى مما يؤدي إلى ظهور عدوى المستشفيات أو العدوى المكتسبة من المستشفى.

الكلمات المفتاحية: التلوث، العزل ، البكتيريا ، الفطريات ، الحساسية ، اقسام الجراحة والإنعاش.

Annexes

ANNEXE N°01

Milieux et matériels utilisés dans notre travail

<p>Matériels utilisés</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Ecouvillons stériles. - Boîtes de Pétri. - Anse de platine. - Microscope. - Pipettes Pasteur. - Lames et lamelles. - Tubes à essai. - Portoirs. -2 Etuves réglée à 37°.et à 27° - Des disques d'antibiotiques. -Micropipette et des embouts. -Tubes à hémolyse. -Centrifugeuse.
<p>Milieux utilisés</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Gélose nutritive -Sabouraud -Sabouraud+chloramphénicol -Chapman -Hektoen -Gélose chocolat -Mueller-Hinton -Rice cream
<p>Milieux d'identification</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Galerie biochimique classique. -Galerie API 20C AUX

ANNEXE N°02

La composition des solution:

Solution	Composition	Quantité
Lugol	•Eau q.s. ad q.s. ad 100 g signifie "quantité suffisante pour obtenir 100 g de solution"	100g
Violet de Gentiane	•Violet de Gentiane • Phénol • Éthanol (90 °GL) • Eau distillée	-10g -20g -100ml -1 L
Fuchsine	• Fuchsine basique • Phénol • Éthanol • Eau distillée	-10g -50g -100ml -1L

ANNEXE N° 03

La composition des milieux de culture:

Milieu	Composition	Quantité
TSI	• Peptones de caséine • Peptones de viande • Extraits de viande • Peptones de levure • NaCl • Lactose • Saccharose • Glucose • Citrate ammoniacal de Fer (III) • Thiosulfate de sodium • Rouge de phénol 0,024 • Agar	-15g/l -5g/l -3g/l -3g/l -5g/l -10g/l -10g/l -1g/l -0,5g/l -0,5g/l -0,024g/l -12g/l
Citrate de Simmons	• Citrate de sodium • Bleu de bromothymole • Chlorure de sodium • Sulfate de magnésium • Hydrogénophosphate de potassium • Dihydroginophosphate d'ammonium • Agar	-1g -0,08g -5g -0,2g -1g -1g -15g

Annexes

	•PH 7,1.	
Mannitol-mobilité	<ul style="list-style-type: none"> •Peptone trypsique de viande • Agar • Mannitol • KNO₃ • Rouge de phénol à 1 •PH 7,6-7,8 	<ul style="list-style-type: none"> -20g/l -4g/l -2g/l -1g/l -4ml
Chapman	<ul style="list-style-type: none"> •Peptone •Extrait de sodium •Mannitol • Rouge de phénol • Agar •PH 7, 4. 	<ul style="list-style-type: none"> -10g/l -1g/l -10g/l -0,025g/l -15g/l
Hektoen	<ul style="list-style-type: none"> •Peptone-protéose •Extrait de levure •Lactose •Saccharose •Salicine • Citrate de fer 3 et d'ammonium • Sels biliaires • Fuchsine acide •Bleu de bromothymole • PH 7.5. 	<ul style="list-style-type: none"> -12g/l -3g/l -12g/l -12g/l -2g/l -1,5g/l -9g/l -0,065g/l -5g/l
Muller-Hinton	<ul style="list-style-type: none"> • Infusion de viande de boeuf • Amidon de maïs •Agar • Peptone de caséine • PH 7,4. 	<ul style="list-style-type: none"> -300g/l -1,5g/l -17g/l -17,5g/l
Gélose nutritive	<ul style="list-style-type: none"> • Extrait de viande • Extra de levure • Peptone • Chlorure de sodium • Agar • PH = 7 	<ul style="list-style-type: none"> -1g/l -2g/l -5g/l -5g/l -15g/l
Gélose Sabouraud	<ul style="list-style-type: none"> •Peptone •Glucose •Agar •PH=5,7 	<ul style="list-style-type: none"> -10g/l -40g/l -12g/l
Gélose Sabouraud+chloramphénicol	<ul style="list-style-type: none"> •Peptone de caséine •Peptone de viande •Glucose monohydraté •Chloramphénicol •Agar •PH =5,6 	<ul style="list-style-type: none"> -5g/l -5g/l -40g/l -0,5g/l -15g/l
Gélose Rice-Cream	<ul style="list-style-type: none"> •Riz blanc, extrait •Polysorbate 80 •Gélose •PH=6,6 	<ul style="list-style-type: none"> -5g/l -10ml -20g/l

ANNEXE N°04

La composition de la galerie api 20C AUX:

Tests	Substrats	Quantité(mg/cup.)
0	Aucun	-
GLU	D-Glucose	1,2
GLY	Glycérol	1,2
2KG	Calcium 2-céto-Glucane	1,2
ARA	L-Arabinose	1,2
XYL	D-Xylose	1,2
ADO	Adonitol	1,2
XLT	Xylitol	1,2
GAL	D-Galactose	1,9
INO	Inositol	2,36
SOR	D-Sorbitol	1,2
MDG	Méthyl- α D-Glucopyranoside	1,2
NAG	N-Acétyl-Glucosamine	1,2
CEL	D-Cellobiose	1,2
LAC	D-Lactose (origine bovine)	1,2
MAL	D-Maltose	1,2
SAC	D-Saccharose	1,2
TRE	D-Trehalose	1,2
MLZ	D-Mélézitose	1,2
RAF	D-Raffinose	1,2

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Filière : Sciences Biologique
Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

Titre
Contamination fongique et bactérienne notées dans les services de réanimation et de chirurgie de l'EHS de la Pédiatrie, Mansourah, Constantine

Résumé

Le travail présenté consiste à évaluer le niveau de contamination atteint dans les services réanimation et chirurgie de l'Etablissement Hospitalier Spécialisé De Pédiatrie Mansourah Constantine par l'isolement des bactéries et champignons à partir de plusieurs sites de l'environnement hospitalier pendant trois mois . A partir des prélèvement de surfaces, 06 souches bactériennes ont été isolées et identifiées représentant 3 espèces : *Staphylococcus epidermidis* est l'espèce la plus dominante avec un taux de 50% , suivie par *Pseudomonas aeruginosa* avec un taux de 33,33% et enfin *Staphylococcus aureus* avec un taux de 16,16%; 06 souches des moisissures ont été isolées et identifiées représentant 3 genres : *Aspergillus* avec un taux de 66,66%, suivie par *Rhizopus sp* et *Mucor sp* avec un taux de 16,67%, pour les levures, une souche de *Candida famata* a été isolée et identifiée. Par ailleurs , les résultats de prélèvement d'air ont montrés la présence d'une flore fongique des *Aspergillus*. Les tests de sensibilité aux antibiotiques et aux antifongiques ont été réalisés pour les souches isolées. La présence des microorganismes en grand nombre va permettre leur transmission directe ou indirecte au malade ce qui engendre l'apparition des infections nosocomiales.

Mot clés : Contamination, isolement, bactéries, champignons, sensibilité, les services réanimation et chirurgie.

Membre du jury :

Président du jury : M^{me} BENKAHOUL Malika.

Rapporteur: M^{me} ABDELAZIZ Ouided.

Examineur : M^{me} MEZIANI Meriem.

Présentée par :
GUERBAS Chourouk
BELAHOUER Mohammed
TURKI Rayene

Année universitaire : 2019 -2020