

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE DE SAAD DAHLEB BLIDA  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE



Mémoire de fin d'étude en vue d'obtention  
du diplôme de Master en Biologie  
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie-Bactériologie

Thème

**ETUDE MICROBIOLOGIQUE DES PRELEVEMENTS  
RESPIRATOIRES DANS LES UNITES DE SOINS INTENSIFS AU  
CHU DE BENI MESSOUS**

Présenté par :

ATTIG Rahima

Devant les membres du Jury :

-M <sup>me</sup> KHALDOUN H.	M.C.B université de Blida 1	Présidente
-M <sup>me</sup> MEKLAT A.	M.C.A université de Blida 1	Examinatrice
-M <sup>me</sup> TOUATI D.	Maitre assistante	Promotrice
-MR KAIS H.	Vacataire	Co-promoteur

Année universitaire 2016-2017

# Remerciements

Tout d'abord je remercie Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

Ma plus grande gratitude va à ma promotrice docteur TOUATI pour avoir accepté de m'encadrer pour mon projet de fin d'études, pour sa disponibilité et sa rigueur, la confiance qu'elle m'a accordée. J'ai profité pendant mon stage du savoir et du savoir-faire dont j'ai pu bénéficier au cours de nombreuses discussions. J'aimerais aussi la remercier pour l'autonomie qu'elle m'a accordée, et ses précieux conseils et ses critiques qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je suis tout particulièrement reconnaissante envers mon co-promoteur monsieur KAIS qui m'a chaleureusement accueillie dans son équipe de recherche et qui m'a soutenue et a été présent tout au long de ce de travail.

J'adresse mes sincères remerciements à tous les professeurs, intervenants et tout le personnel du laboratoire central du CHU de Béni Messous qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé mes réflexions et ont accepté à me rencontrer et répondre à mes questions durant mes recherches.

Je voudrais également remercier les membres du jury M<sup>me</sup> KHADLOUN et M<sup>me</sup> MEKLAT pour l'intérêt qu'elles ont porté à ce travail et pour avoir accepté de l'évaluer.

J'exprime toute ma reconnaissance et gratitude à l'administration et à l'ensemble du corps enseignant de l'Université de SAAD DAHLAB BLIDA 1 pour leurs efforts à nous garantir la continuité et l'aboutissement de ce programme de Master.

# Dédicaces

Que ce travail témoigne de mes respects :

A mes très chers parents Brahim et Aicha qui ont toujours été là pour moi, «Vous avez tout sacrifié pour vos enfants n'épargnant ni santé ni efforts. Vous m'avez donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. Je suis redevable d'une éducation dont je suis fier»

A mes Sœurs Sekoura, Sawsen, Chahinez, Radia et Asma pour leur encouragement leur aide et leur présence.

A mes amis Yacine, Sonia, Abir Widad, Ibtissem, Djami, Chahinez, Radia, Chaimaa, Saliha, Ikram et Nawel pour leur soutien inconditionnel, leur encouragement, leur sincère amitié et confiance, et à qui je dois ma reconnaissance et mon attachement.

## Résumé

Les pneumopathies nosocomiales sont des infections pulmonaires acquises après 48 heures au moins d'hospitalisation. Elles figurent au deuxième rang des infections acquises en milieu hospitalier, et en premier rang en réanimation.

Ce travail a pour but d'identifier les bactéries responsables des pneumopathies nosocomiales chez les patients hospitalisés dans les services de réanimation médicale au CHU de Beni Messous et de déterminer leur résistance aux antibiotiques.

Il s'agit d'une étude rétrospective, portant sur 67 patients représentés majoritairement par le sexe masculin, Durant la période de cette étude 113 prélèvements respiratoires sont reçus représentés principalement par 95 PDP, le résultat de la culture était positif pour 62 prélèvements. Les agents responsables isolés sont essentiellement des bactéries à Gram négatif (90%), En tête de liste *Acinetobacter Baumannii* (47%), dont les souches isolées étaient multi-résistants (98%).

Au cours de cette étude, nous avons notés une prolongation de la durée d'hospitalisation en réanimation et de la durée de ventilation associée à un surcoût médical important.

**Mots clés :** pneumopathie nosocomiale, infection respiratoire, *Acinetobacter baumannii* antibiorésistance.

## Abstract

Nosocomial pneumonia are pulmonary infections acquired after at least 48 hours of hospitalization. They are the second most common infections acquired in hospitals, and first in intensive care.

This work aims to identify the bacteria responsible for nosocomial pneumonia in patients hospitalized in intensive care unit at the CHU of Beni Messous and to determine their resistance to antibiotics.

This was a retrospective study involving 67 patients, most of whom were male. During the study, 113 respiratory specimens were received, mainly represented by 95 PDPs, the result of the culture was positive for 62 samples. The isolated causative agents are essentially Gram-negative bacteria (90%), at the top of the list *Acinetobacter Baumannii* (47%), whose isolated strains were multi-resistant (98%).

In this study, we noted an extension of the duration of hospitalization in intensive care and the duration of ventilation associated with a significant medical cost.

Keywords: nosocomial pneumonia, respiratory infection, *Acinetobacter baumannii*, antimicrobial resistance

## ملخص

الالتهاب الرئوي نوسوكوميال هي الالتهابات الرئوية المكتسبة بعد 48 ساعة على الأقل من دخول المستشفى. وهي ثاني الإصابات شيوعا المكتسبة في المستشفيات، والأولى في العناية المركزة

الهدف الرئيسي من هذا العمل هو التعرف على البكتيريا المسؤولة عن الالتهاب الرئوي للمرضى الذين يدخلون مصلحة الإنعاش بالمستشفى الجامعي بني مسوس (الجزائر) وتحديد مقاومتهم للمضادات الحيوية.

يتمثل هذا العمل في دراسة استعادية ل 67 مريضا، معظمهم ذكور، من 1 فبراير إلى 31 جويلية 2017. خلال هذه فترة تم تلقي 113 عينة تنفسية تمثل أساسا PDP 95. كانت النتيجة إيجابية ل 62 عينة، العصيات السلبية الغرامية هي المسبب الرئيسي (90%) مع سيادة *Acinetobacter baumannii* (47%) وكانت هذه الأخيرة متعددة المقاومة (98%)

في هذه الدراسة، لاحظنا تمديد فترة الاستشفاء في العناية المركزة ومدة التهوية المرتبطة بتكلفة طبية كبيرة

في نهاية هذا العمل نقترح تدابير وقائية للالتهابات الرئوية (قفازات، تعقيم المعدات، وتدريب العاملين في المجال الطبي (...)، كوسيلة للمكافحة

كلمات مفتاحية : الالتهاب الرئوي مستشفوي، عدوى الجهاز التنفسي، *Acinetobacter baumannii* , ومقاومة مضادات الميكروبات

## *Liste des tableaux*

Tableau I	Facteurs de risques de la pneumonie nosocomiale.	5
Tableau II	Caractères biochimiques des Entérobactérie	7
Tableau III	Résistance naturelle aux antibiotiques des entérobactéries	7
Tableau IV	Les différents types de prélèvements respiratoires	15
Tableau V	Interprétation de l'examen direct des expectorations	17
Tableau VI	Démarche de l'identification bactérienne	20
Tableau VII	La description des galeries API.	21
Tableau VIII	Valeurs des diamètres des zones d'inhibition	24
Tableau IX	Répartition des patients selon les tranches d'âge	28
Tableau X	Répartition des signes cliniques selon les facteurs de risque	29
Tableau XI	Résultat de l'examen direct.	32
Tableau XII	Culture poly-bactérienne	34
Tableau XIII	Fréquences des bactéries isolées aux services de réanimations des différentes études.	37
Tableau XIV	Profil de résistance aux antibiotiques de <i>K. pneumoniae</i>	40
Tableau XV	Profil de résistance aux antibiotiques d' <i>Enterobacter cloacae</i>	41
Tableau XVI	Profil de résistance aux antibiotiques de <i>S. aureus</i>	42
Tableau XVII	Étapes de la coloration Gram	Annexe

## *Liste des figures*

Figure 1	Structure des voies respiratoires; alvéoles et coupe transversale des poumons	3
Figure 2	Physiopathologie des pneumopathies nosocomiales	4
Figure 3	Aspect macroscopique d'un PDP	16
Figure 4	Coloration bleu de méthylène	17
Figure 5	Aspect des colonies d' <i>A. baumannii</i>	18
Figure 6	Test de satellitisme	22
Figure 7	Coagulation du plasma	22
Figure 8	Test de trèfle positif d' <i>A. baumannii</i>	26
Figure 9	Répartition des patients selon le sexe	27
Figure 10	Répartition des patients selon l'âge	28
Figure 11	L'antibiothérapie initiale	30
Figure 12	Nature des prélèvements pulmonaires	31
Figure 13	Aspect des prélèvements	32
Figure 14	Taux de positivité des cultures	33
Figure 15	Représentation des résultats selon les types de cultures	34
Figure 16	Répartition des micro-organismes selon le résultat de la culture	35
Figure 17	Répartition des bactéries selon leur fréquence	36
Figure 18	Répartition des entérobactéries	37
Figure 19	Culture de <i>K. pneumoniae</i> sur milieu Hektoen	38
Figure 20	Profil de résistance aux antibiotiques d' <i>A. baumannii</i>	39
Figure 21	Profil de résistance aux antibiotiques de <i>P. aeruginosa</i>	40

Figure 22	Vortex	Annexe
Figure 23	Densitomètre	Annexe
Figure 24	Étuve	Annexe
Figure 25	Étuve à CO <sub>2</sub>	Annexe
Figure 26	Autoclave	Annexe
Figure 27	Bain-marie	Annexe
Figure 28	Technique d'ensemencement	Annexe

## *Liste des abréviations*

AGP : Absence de germes pathogènes

ATCC : American Type Culture Collection

BBP : Brossage bronchique protégé

BGN : Bactérie à Gram négatif

BLSE : Bêtalactamases à spectre élargi

BPCO : Bronchopneumopathie chronique obstructive

C3G : Céphalosporine de 3eme génération

CHU : Centre hospitalier universitaire

CLSI : Clinical & Laboratory Standards Institute

CMI : Concentration minimale inhibitrice

FMP : flore microbienne polymorphe

GB : Globule blanc

GSC : Gélose au sang cuit

GSF : Gélose au sang frais

LBA : Lavage Broncho-Alvéolaire

LP : liquide pleural

LPS : Lipopolysaccharide

MF : McFarland

MH : Mueller-Hinton

NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide

ONPG : Ortho-Nitro-Phényl-Galactopyranoside

PDP : Prélèvement distal protégé

PN : Pneumopathie nosocomiale

PNAVM : Pneumonie nosocomiale acquise sous ventilation mécanique

SARM : Staphylococcus aureus résistant à la méticilline

SDRA : Syndrome de détresse respiratoire aiguë

USI : Unité des soins intensifs

# Tables des matières

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	1

## **Première partie : Partie bibliographique**

<b>CHAPITRE I. GÉNÉRALITÉS SUR LES INFECTIONS RESPIRATOIRES</b>	<b>3</b>
<b>I.1- Rappel Anatomique et physiologique de l'appareil respiratoire</b>	<b>3</b>
<b>I.2-Physiopathologies des pneumopathies nosocomiales</b>	<b>4</b>
<b>I.3- Épidémiologie des pneumopathies nosocomiales</b>	<b>4</b>
<b>I.4- Facteurs de risque des pneumopathies nosocomiales</b>	<b>5</b>
<b>CHAPITRE II. ÉTIOLOGIE DES PNEUMOPATHIES NOSOCOMIALES</b>	<b>6</b>
<b>II.1-Bactéries à Gram-négatif</b>	<b>6</b>
<b>II.1.1- Entérobactérie</b>	<b>6</b>
<b>II.1.2-<i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	<b>7</b>
<b>II.1.3- <i>Acinetobacter baumannii</i></b>	<b>8</b>
<b>II.1.4-<i>Stenotrophomonas maltophilia</i></b>	<b>9</b>
<b>II.1.5-<i>Burkholderia cepacia</i></b>	<b>10</b>
<b>II.1.6-<i>Haemophilus influenzae</i></b>	<b>10</b>
<b>II.2- Bactéries à Gram positif</b>	<b>10</b>
<b>II.2.1- <i>Streptococcus pneumoniae</i></b>	<b>11</b>
<b>II.2.2- <i>Staphylococcus aureus</i></b>	<b>12</b>
<b>CHAPITRE III. DIAGNOSTIC DES PNEUMOPATHIES NOSOCOMIALES</b>	<b>13</b>
<b>III.1- Diagnostic microbiologique</b>	<b>13</b>

## **Deuxième partie : Partie expérimentale**

<b>Chapitre I. MATÉRIELS ET MÉTHODES</b>	<b>15</b>
<b>I.1- Matériel</b>	<b>15</b>
<b>I.2- Méthodes</b>	<b>15</b>
<b>I.2.1- Prélèvement</b>	<b>15</b>
<b>I.2.2- Conduite à tenir au laboratoire devant les prélèvements respiratoires</b>	<b>15</b>

I.2.2.1- Examen macroscopique	15
I.2.2.2- Examen microscopique	16
I.2.2.3-Mise en Culture	17
I.2.2.4-Identification bactérienne	19
1.2.2.5-Antibiogramme	23
<b>CHAPITRE II. RESULTATS ET DISCUSSION</b>	<b>27</b>
II.1-ETUDE DE LA POPULATION	27
II.1.1- Répartition des patients selon le sexe	27
II.1.2-Répartition des patients selon l'âge	28
II.1.3- Facteurs de risque	29
II.1.4- Antibiothérapie initiale	30
II.2- Diagnostique microbiologique	31
II.2.1-Nature des prélèvements	31
II.2.2-Aspect macroscopique	32
II.2.3-Aspect microscopique	32
II.2.4-Taux des prélèvements positifs	33
II.2.5- Résultats de la culture	33
II.2.5.1-Répartition des micro-organismes	35
II.2.5.1.1-Levures	35
II.2.5.1.2-Bactéries	35
II.3 Antibiorésistance	38
II.3.1-Résistance des BGN aux différents antibiotiques	38
II.3.1.1- <i>Acinetobacter baumannii</i>	38
II.3.1.2- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
II.3.1.3-Entérobactérie	40
II.3.1.4- <i>Haemophilus influenzae</i>	41
II.3.1.5- <i>Burkholderia cepacia</i>	41
II.3.2- Résistance des CGN aux différents antibiotiques	42
II.3.2.1- <i>Staphylococcus aureus</i>	42
II.3.2.2- <i>Streptococcus pneumoniae</i>	42
Conclusion	43
Référence bibliographique	
Annexe	

## Introduction

Les infections nosocomiales sont considérées comme des infections contractées par un patient dans un établissement de soins après son admission, les symptômes apparaissent pendant ou après son séjour. Ces infections surviennent après au moins 48h d'hospitalisation **(Astagneau et Ancelle, 2011)**.

La pneumopathie nosocomiale (PN) représente la deuxième infection nosocomiale la plus fréquente à un pourcentage de 20% après l'infection urinaire qui est à 40%. Son incidence est particulièrement élevée dans les unités des soins intensifs par rapport aux autres services hospitaliers **(Girault et al., 2006)**.

Les pneumopathies nosocomiales (PN) surviennent essentiellement chez les malades ventilés artificiellement par l'intermédiaire d'une prothèse endotrachéale **(Girault et al., 2006)**.

Les pneumonies nosocomiales acquises sous ventilation mécanique (PNAVM) ne concernent que celles acquises après 48 heures au moins de ventilation, elles représentent la forme la plus fréquente et la plus sévère malgré les progrès de l'antibiothérapie et la mise en œuvre de mesures de prévention **(Boydjiev et al., 2006, Trouillet et Chastre, 2000)**.

Leur importance en réanimation est liée au caractère invasif des procédures et à la fragilité du terrain des patients hospitalisés dans les structures de soins intensifs **(Philippart et al., 2012)**.

Les pneumopathies nosocomiales représentent encore l'une des principales causes de morbidité, de mortalité et de surcoût des soins en réanimation et sont à l'origine d'une prolongation de la durée du séjour hospitalier et d'un surcoût important **(Fartoukh et Ricard, 2009, Girault et al., 2006)**.

L'écologie bactérienne de ces infections est variable. Elle dépend du caractère précoce ou tardif de la PN et des facteurs de risque. Toutefois, on note la prédominance des bactéries multi-résistantes **(Maoulainine et al., 2014)**.

Le diagnostic des pneumopathies nosocomiales est posé devant l'apparition des signes cliniques et biologiques, d'une image radiologique nouvelle ou aggravée. Il est confirmé par l'examen bactériologique des sécrétions bronchiques (expectoration et prélèvement distal protégé), par brosse endo-bronchique et lavage broncho-alvéolaire, il permet aussi de déterminer la sensibilité aux antibiotiques de l'agent(s) pathogène(s) en cause, et ainsi d'adopter l'antibiothérapie appropriée **(Jaton et al., 2014)**.

La prise en charge des pneumopathies nosocomiales constitue un véritable défi diagnostique et thérapeutique, doublé d'un enjeu économique important **(Maoulainine et al., 2014)**.

En dépit des nombreux progrès qui ont été effectués aussi bien en matière de diagnostique et de traitement, le pronostic des pneumonies nosocomiales reste sombre, essentiellement du fait de la gravité de la maladie sous-jacente (**Donati et Papazian, 2008**).

L'objectif principal de ce travail, est d'identifier les bactéries responsables des pneumopathies nosocomiales chez les patients hospitalisés dans les services de réanimation médicale au CHU de Beni Messous à Alger et de déterminer leur antibiorésistance. Afin d'établir des mesures de prévention et des recommandations permettant d'améliorer la prise en charge des patients en réanimation.

*Partie*  
*bibliographique*



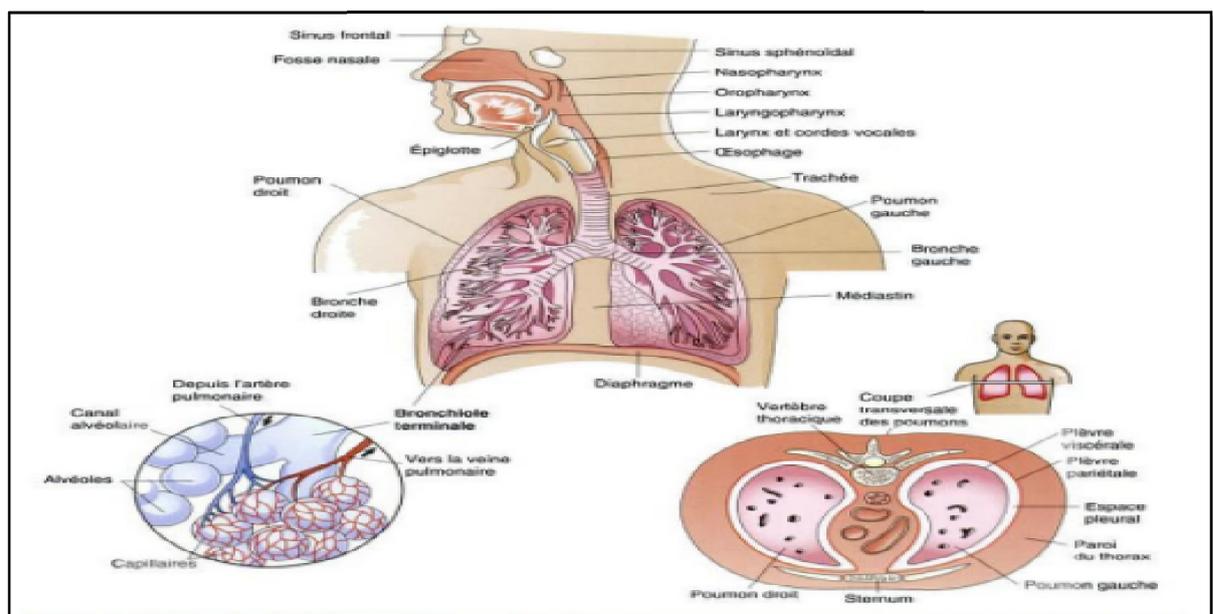
# I. GÉNÉRALITÉS SUR LES INFECTIONS RESPIRATOIRES

## I.1- Rappel Anatomique et physiologique de l'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire est l'ensemble des organes assurant les premières étapes de la respiration (**Jeuge-Maynard et al., 2010**). Il est composé des voies respiratoires supérieures et inférieures qui assurent la ventilation. Les voies supérieures réchauffent et filtrent l'air inspiré, ce qui permet aux voies inférieures d'effectuer les échanges gazeux, l'oxygène est acheminé vers les tissus par la circulation sanguine et les déchets gazeux, comme le gaz carbonique, sont éliminés pendant l'expiration (**Brunner et al., 2011**).

Les voies respiratoires inférieures sont représentées par l'arbre bronchique et les poumons (figure 1). L'arbre bronchique : la trachée est l'extrémité proximale de l'arbre bronchique, qui se subdivise en deux bronches, lesquelles à leur tour se subdivisent en bronchioles, ces derniers sont impliqués dans la ventilation des alvéoles pulmonaires au niveau desquelles l'asepsie est assurée par l'action mécanique des muqueuses ciliées et les macrophages (**Delmas et Brémond-Gignac, 2008**).

Les poumons sont des viscères de consistances molles, élastiques, comparables à une éponge gorgée d'air et de sang. Chaque poumon est partagé en lobes, le poumon gauche est formé de deux lobes, [supérieur et inférieur]. Alors que le poumon droit est formé de trois lobes [supérieur, moyen et inférieur]. Ils adhèrent aux parois de la cage thoracique par l'intermédiaire d'une plèvre qui est une membrane séreuse constituée de deux feuillets : l'un tapisse la paroi musculo-squelettique du thorax : feuillet pariétal et l'autre recouvrant les poumons : feuillet viscéral. Entre les deux feuillets se trouve un liquide légèrement visqueux : le liquide pleural. Il assure la cohésion entre les feuillets tout en permettant leur glissement aisé (**Dupont, 2015**).



**Figure 1.** Structure des voies respiratoires; alvéoles et coupe transversale des poumons (**Brunner et al., 2011**).

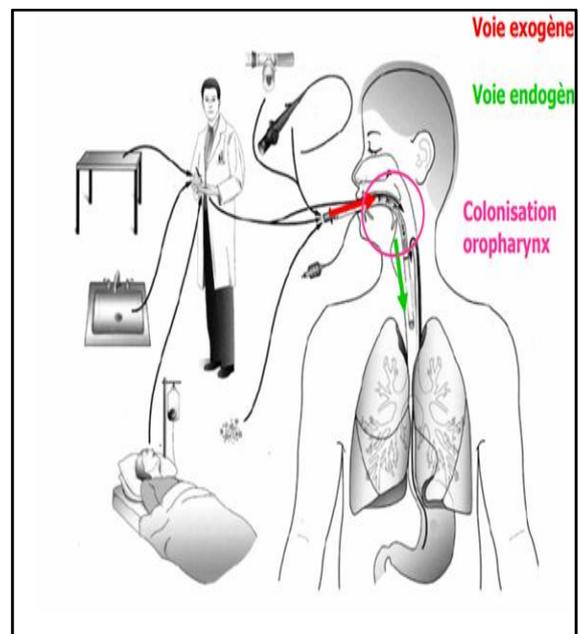
À l'état normal, le volume du liquide pleural, est entre 1 et 10 ml. Ce volume semble se modifier au cours de diverses pathologies bactériennes, donnant lieu à un épanchement liquidien : pleurésie (**Brunner et al., 2011**).

## I.2-Physiopathologies des pneumopathies nosocomiales

Les pneumopathies nosocomiales résultent, de la pénétration et du développement des micro-organismes dans les voies aériennes inférieures qui, après une phase de colonisation, vont conduire à une infection du parenchyme pulmonaire par dépassement des capacités de défenses mécaniques : clairance muco-ciliaire, cellulaires : polynucléaires, macrophages, lymphocytes et/ou humorales de l'hôte (**Girault et al., 2006**).

Les sources de contamination pulmonaire, (figure 2) classiquement reconnues sont en rapport avec la technicité des soins (sondes, cathéters...), l'environnement (air, eau...) et le risque de transmission croisée entre le personnel soignant ou d'autres patients, ou par voie endogène (la flore du patient lui-même). (**Delves et Roitt, 2002**).

Le principal mécanisme de pénétration des agents bactériens dans les voies aériennes inférieures, est soit suite d'un retour digestive au niveau de l'oropharynx, soit par l'inhalation de la flore naso-pharyngée. Au cours des pneumonies nosocomiales acquises sous ventilation mécanique (PNAVM), la colonisation et la pénétration bactériennes s'avèrent favorisées par la présence de la sonde endotrachéale qui, d'une part « court-circuite » les mécanismes normaux de défense de l'organisme (voies aériennes supérieures, toux, clairance mucociliaire), et d'autre part favorise l'inhalation de sécrétions pharyngo-trachéales. L'inoculum bactérien est alors plus ou moins important en fonction de l'importance des fuites autour du ballonnet de la sonde d'intubation. Par contre, l'infection pulmonaire se fait rarement par voie hématogène (**Girault et al., 2006**).



**Figure 2.** Physiopathologie des pneumopathies nosocomiales(**Belcour, 2009**).

## I.3- Épidémiologie des pneumopathies nosocomiales

Les pneumopathies nosocomiales s'observent chez plusieurs catégories de patients, principalement, chez les patients sous ventilation artificielle dans les unités de soins intensifs, où leur taux atteint 3 % par jour (**Ducel et Febry, 2008**).

Selon **Girault et al., (2006)** et **Hygis (1998)**, les pneumopathies nosocomiales sont la première cause d'infections nosocomiales et représentent plus de 50%, de prescription d'antibiotiques en réanimation, Leur fréquence globale en réanimation est de 8 à 15 % mais s'élève à 20-30% en cas de ventilation mécanique, voire jusqu'à 30 à 70 % chez les sujets ventilés depuis plus de 48h.

Les pneumonies nosocomiales sont au premier rang en termes de mortalité avec 20 à 50%, en particulier en cas de ventilation mécanique car : elles surviennent le plus souvent sur un terrain fragilisé (pathologie aigue ou chronique ayant conduit à une hospitalisation) ; les bactéries responsables sont le plus souvent d'origine nosocomiale, ayant acquis des résistances aux antibiotiques, compliquant ainsi le traitement et la prise en charge (**Montani et Tcherkian, 2009**).

Dans 40 à 60% des cas, il s'agit d'une infection poly-microbienne, en particulier chez les malades déjà sous antibiotiques avant le début d'une pneumopathie (**Aubier et al., 2009**).

#### **I.4- Facteurs de risque des pneumopathies nosocomiales**

Le développement d'une pneumopathie nosocomiale est favorisé par des facteurs, qui sont principalement en rapport avec la ventilation ou le patient lui-même. Le tableau I rapporte les facteurs de risques favorisant la pneumopathie nosocomiale.

**Tableau I.** Facteurs de risques de la pneumonie nosocomiale.

<b>Facteurs liés à l'hôte</b>	<b>Facteurs liés à la réanimation et aux soins</b>
-Un âge supérieur à 60 ans Sexe masculin, Diabète, – Alcoolisme chronique, -Pathologies pulmonaires chroniques (BPCO, SDRA...) – Défaillance d'organe, – Coma ou Altération de la conscience, – Interventions chirurgicales prolongées ou compliquées, notamment thoracoabdominales. -Brûlures, traumatisme -Inhalation de liquide gastrique -Colonisation des voies aériennes supérieures -Sinusites, Colonisation gastrique Albuminémie < 22 g l-1	- Curares, sédation, Position allongée, manque d'étanchéité des ballonnets augmente le risque d'inhalation gastrique ; -Utilisation d'un anti-H <sub>2</sub> , _ utilisation de traitements antibiotiques prolongés et inadéquats qui peuvent favoriser et accroître la colonisation par les bactéries résistantes, -Surveillance de la pression intracrânienne -Ventilation mécanique > 2 jours -Modification fréquente du circuit ventilatoire -Sonde nasogastrique/ nasotrachéale -Transport hors de la réanimation Aérosols sur ventilateur

(**Charbonneau et Wolff, 2013, Donati et Papazian, 2008**)

## II. ÉTIOLOGIE DES PNEUMOPATHIES NOSOCOMIALES

Selon le délai d'apparition, les pneumopathies se distinguent en deux groupes :

- ✓ Les PAVM précoces, survenant avant le 5<sup>ème</sup> jour de ventilation,
- ✓ Les PAVM tardives qui surviennent après le 5<sup>ème</sup> jour de ventilation.

Les bactéries retrouvées dans les PAVM précoces sont essentiellement d'origine communautaire : *S.aureus* sensible à la méticilline, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*. Les germes impliqués dans les PAVM tardives sont, dans la majorité des cas, des souches hospitalières présentant fréquemment une résistance à une ou plusieurs familles d'antibiotiques : *P. aeruginosa* ; *SARM*; entérobactéries (**Bougle et al., 2014**).

Selon **Gayraud et Lortholary (2006)**, Les champignons et en particulier *Candida albicans*, sont responsables de la majorité des infections fongiques en milieu hospitalier. L'origine de l'infection est généralement endogène digestive, mais peut être manu-portée. Les moisissures de l'environnement, omniprésentes dans l'air et les poussières, en particulier *Aspergillus fumigatus*, peuvent être des agents redoutables responsables d'infections invasives graves chez les patients immunodéprimés.

### II.1-Bactéries à Gram-négatif

#### II.1.1- Entérobactéries

❖ **Classification (Bianchi et al., 2013).**

-Domaine : *Eubacteria*.

-Phylum : *Protobacteria*.

-Classe : *Gammaprotobacteria*.

-Ordre : *Enterobacteriales*.

-Famille : *Enterobacteriaceae*

-Genre : 30 genres

-Espèce : *Enterobacter cloacae*

*Escherichia coli*,

*Klebsiella pneumoniae*,

*Serratia marcescens*,

*Proteus mirabilis*

❖ **Habitat** : Les entérobactéries sont des bactéries commensales du tube digestif humain et animal (**Dworkin et al., 2006**).

### ❖ Facteurs de pathogénicité

Les facteurs de pathogénicité sont représentés principalement par les adhésines, la capsule, les protéines de la membrane externe, le LPS et les sidérophores (**Dworkin et al., 2006**).

Les entérobactéries, notamment *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Proteus sp.*, et *Serratia marcescens sub sp. marcescens*, sont responsables d'environ 50 % des infections nosocomiales (**Brenner et al., 2005**).

### ❖ Résistance aux antibiotiques

Les *Enterobacteriaceae* possèdent une résistance naturelle à différents antibiotiques, cette résistance est résumée dans le tableau III

**Tableau III:** Résistance naturelle aux antibiotiques des entérobactéries

Bactérie	AM	AMC	TIC/PIP	C1G	FOX	TCY	CL	NIT
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R		R					
<i>Serratia marcescens</i>	R	R		R			R	R
<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R		R	R			
<i>proteus mirabilis</i>						R	R	R

(Rahal et al., 2014)

La plupart des bactéries de la famille des Enterobacteriaceae produisent des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi ou des céphalosporinases associés à des résistances aux aminosides et aux fluoroquinolones (**Nauciel et Vildé, 2005**).

#### II.1.2-*Pseudomonas aeruginosa*

##### ❖ Classification :(Garrity et al.,2001)

- Domaine : *Eubacteria*.
- Phylum : *Proteobacteria*.
- Classe: *Gammaproteobacteria*
- Ordre : *Pseudomonadales*.
- Famille : *Pseudomonadaceae*
- Genre : *Pseudomonas*
- Espèce : *Pseudomonas aeruginosa*

❖ **Habitat :** d'après **Wolfgang et al., (2003)**, *P. aeruginosa* est ubiquitaire dans l'environnement (sol, eau et surfaces) et peut être commensal du tube digestif. En milieu hospitalier, *P. aeruginosa* est parfois retrouvé dans les solutions antiseptiques et sur les instruments tels que les cathéters, les sondes, ou encore dans les lavabos.

### ❖ Facteurs de pathogénicité

*P. aeruginosa* est doté d'un véritable arsenal de facteurs de virulence qui sont, soit directement associés à sa cellule (flagelle, pilli, LPS, alginate), soit excrétés dans le milieu extracellulaire (exotoxines, exoprotéases, hémolysines et chromophores). *Pseudomonas aeruginosa* est connu par sa capacité de former un biofilm qui lui permet à la fois de s'installer dans les tissus et de résister aux défenses antibactériennes de l'hôte, des antibiotiques, des antiseptiques et des désinfectants (**Richard, 2005**).

### ❖ Résistance aux antibiotiques

*P. aeruginosa* est naturellement résistant aux pénicillines des groupes V, G, M et A, aux céphalosporines de première et deuxième génération, à la plupart des céphalosporines de troisième génération, aux quinolones de première génération et à la kanamycine (**Mesaros et al., 2007**).

À côté de la résistance naturelle *P. aeruginosa* acquit une résistance aux  $\beta$ -lactamines : Imipénème et céftazidime par les différentes BLSE, aux aminosides : la gentamicine, la tobramycine, la nétilmicine, et l'amikacine ; aux fluoroquinolones ; et à la fosfomycine (**Kang, 2005**).

## II.1.3- *Acinetobacter baumannii*

### ❖ Classification : (Garrity et al., 2001)

- Domaine : *Eubacteria*.
- Phylum : *Proteobacteria*.
- Classe: *Gammaproteobacteria*.
- Ordre : *Pseudomonadales*.
- Famille : *Moraxellaceae*.
- Genre : *Acinetobacter*.
- Espèce : *Acinetobacter baumannii*.

❖ **Habitat** : Bien que la plupart des espèces du genre *Acinetobacter* soient ubiquitaires (sol, eau, végétaux, hommes), *Acinetobacter baumannii* n'a pas de réservoir naturel connu en dehors de l'hôpital (**Peleg et al., 2008**). Il est retrouvé dans l'environnement clinique immédiat du malade (appareils de ventilation, lit, matelas, tables...) et dans l'environnement humide (siphons de lavabo, linge humide...) ainsi que sur les mains des soignants. En effet, ce germe possède une capacité de survie prolongée dans l'environnement, il résiste longtemps dans des conditions environnementales variées, et résiste bien à la dessiccation (**Wendt et al., 1997**).

### ❖ Facteurs de pathogénicité

La présence d'une capsule de polysaccharide, rendant la surface des souches plus hydrophiles; la propriété d'adhérence aux cellules épithéliales humaines en présence de fimbriae ou de capsule polysaccharidique ; la production des enzymes qui peuvent endommager les lipides tissulaires ; le rôle potentiellement toxique du lipopolysaccharide de la paroi de la cellule et la présence du lipide A. La capacité d'A.

*baumannii* à former des biofilms sur des surfaces abiotiques, telles que le verre et l'équipements utilisés dans les unités de soins intensifs, et sur des surfaces biotiques telles que les cellules épithéliales (**Gaddy et Actis, 2009**).

#### ❖ **Résistance aux antibiotiques**

*Acinetobacter baumannii* présente une résistance naturelle aux antibiotiques suivants : aminopénicillines, céphalosporines 1<sup>ere</sup> et 2<sup>eme</sup> génération, certaines céphalosporines de 3<sup>eme</sup> génération, comme cefotaxime et ceftriaxone, fosfomycine, triméthoprime et furane. Cette bactéries marquées par leur extrême capacité à acquérir des mécanismes de résistance vis-à-vis de la plupart des antibiotiques :  $\beta$ -lactamines : céphalosporines, aminosides et fluoroquinolones (**Guillou et Bergogne-Bérézin, 2006**).

### II.1.4-*Stenotrophomonas maltophilia*

#### ❖ **Classification :(Garrity et al., 2001)**

-Domaine : *Eubacteria*.

-Phylum : *Proteobacteria*.

-Classe: *Gammaproteobacteria*.

-Ordre : *Xanthomonadales*.

-Famille : *Xanthomonadaceae*

-Genre : *Stenotrophomonas*

-Espèce : *Stenotrophomonas maltophilia*

❖ **Habitat** : Selon **Delarras (2014)**, *S. maltophilia* est une bactérie ubiquiste, qui vit en saprophyte dans la nature. Souvent présente en milieu hospitalier, elle est transportée par l'eau et peut contaminer du matériel médical et des solutions antiseptiques.

#### ❖ **Facteurs de pathogénicité**

Les facteurs de pathogénicité de *S. maltophilia* qui sont encore peu connus, on trouve les enzymes extracellulaires, protéases et élastase, les toxine cytotytique, chitinase, lypase, hyaluronidase et mucinase (**Aequem et al., 2000**).

#### ❖ **Résistance aux antibiotiques**

*S. maltophilia* a une résistance naturelle à la plupart des bêta-lactamines : imipenème, ticarcilline, pipéracilline et céfotaxime ; et à la fosfomycine (**Sougakoff et al., 2003**). Elle est capable d'acquérir de nouvelles résistances via des mutations ou des transferts de gènes. La bactérie présente une multi-résistance acquise vis-à-vis de divers antibiotiques dont les aminosides et les fluoroquinolones (**S.F.M, 2015**).

### II.1.5-*Burkholderia cepacia*

#### ❖ Classification:(Garrity et al., 2001)

- Domaine: *Eubacteria*.
- Phylum: *Proteobacteria*.
- Classe: *Betaproteobacteria*.
- Ordre: *Burkholderiales*.
- Famille: *Burkholderiaceae*
- Genre : *Burkholderia*
- Espèce : *Burkholderia cepacia*

❖ **Habitat** : *Burkholderia cepacia* est une bactérie ubiquitaire : dans l'environnement hospitalier : aérosols, liquides d'irrigation et les tubulures humides (**Peter, 2009**).

#### ❖ Facteurs de pathogénicité

*B. cepacia* produit peu de facteurs virulents dont : hémolysines, protéases, exopolysaccharides, lipases et sidérophores (**Eyquem et al., 2000**).

#### ❖ Résistance aux antibiotiques

Cette bactérie est le plus souvent multi-résistante aux antibiotiques, elle est caractérisée par une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques dont les carboxypénicillines, les aminosides et la colistine (**Le Bourgeois et al., 2005**).

### IV.1.6-*Haemophilus influenzae*

#### ❖ Classification :(Garrity et al., 2001)

- Domaine : *Eubacteria*.
- Phylum : *Protobacteria*.
- Classe : *Gammaprotobacteria*.
- Ordre : *Pasteurellales*.
- Famille : *Pasteurellaceae*
- Genre : *Haemophilus*
- Espèce : *Haemophilus influenzae*

❖ **Habitat** : Les *Haemophilus* font partie de la flore des voies respiratoires supérieures et de la cavité buccale de l'Homme. Ils peuvent aussi être isolés dans le tube digestif et au niveau de la muqueuse vaginale. La présence de souches capsulées est habituelle. (**Dabernat, 1990**).

#### ❖ Facteurs de pathogénicité

*H. influenzae* possède plusieurs facteurs de virulence dont : la capsule (6 types de polysaccharide capsulaire, de « a » à « f. » Le type « b » est responsable de la plupart des

infections invasives, les pili, les immunoglobulines A protéase, Lipopolysaccharides et le système de captation du Fer (**Schaechter,1999**).

#### ❖ **Résistance aux antibiotiques**

*H.influenzae* est résistant naturellement aux macrolides (spiramycine, josamycine, midécamycine) et aux lincosamides. Au cours des dernières années, l'apparition des souches résistantes à l'ampicilline fait reconsidérer le traitement des infections à *H. influenzae* qui est déterminée par la CMI. Cette résistance résulte d'une production de  $\beta$ -lactamase (**Avril et al., 2000**).

## **II.2- Bactéries à Gram positif**

### **II.2.1- *Streptococcus pneumoniae***

#### ❖ **Classification :(Garrity et al., 2001)**

-Domaine : *Eubacteria*.

-Phylum : *Firmicute*.

-Classe : *Bacilli*.

-Ordre : *Lactobacillales*.

-Famille : *Streptococcaceae*

-Genre : *Streptococcus*

-Espèce : *Streptococcus pneumoniae*

❖ **Habitat :** *S. pneumoniae* colonise les muqueuses de l'Homme et de quelques mammifères. Son principal habitat est constitué par le rhino-pharynx (**Cohen et al., 1991**).

#### ❖ **Facteurs de pathogénicité**

La capsule est le facteur principal de virulence grâce à ses propriétés anti-opsonophagocytaires, la protéine A de surface, la protéine liant le facteur H du système complémentaire, la protéase active sur le composé C3 du complément, le polysaccharide lié au peptidoglycane et la pneumolysine (**Flandrois, 2000**).

#### ❖ **Résistance aux antibiotiques**

*Streptococcus pneumoniae* présente une résistance naturelle à l'acide nalidixique, à l'acide fusidique et aux polymyxines et la résistance naturelle des aminosides est de bas niveau, de plus il acquit une résistance aux  $\beta$ -lactamines suite à des modifications des PLP et aux macrolides (**Lynch, 2009**).

## II.2.2- *Staphylococcus aureus*

### ❖ Classification :(Garrity et al., 2001)

- Domaine : *Eubacteria*.
- Phylum : *Firmicute*.
- Classe : *Bacilli*.
- Ordre : *Bacillales*.
- Famille : *Staphylococcaceae*
- Genre : *Staphylococcus*
- Espèce : *Staphylococcus aureus*

❖ **Habitat** : Les staphylocoques sont des bactéries commensales de la peau et des muqueuses de l'Homme et de l'animal. Leur site de colonisation préférentielle chez l'Homme est la cavité nasale, elles sont retrouvées également en milieu hospitalier (Wylie et Nowicki, 2005).

### ❖ Facteurs de pathogénicité

La pathogénie de *S. aureus* est liée à la synthèse de nombreux facteurs de virulence : Le peptidoglycane, la capsule, les protéines de surface, Coagulase, Leucocidine,  $\beta$ -hémolysine, fibrinolysine, hyaluronidase, lipase, désoxyribonucléase et ribonucléase (Cheung et al., 2004).

### ❖ Résistance aux antibiotiques

*Staphylococcus aureus* à une résistance naturelle aux antibiotiques suivants : Mécillinam, aztréonam, quinolones et colistine. Les mécanismes de la résistance acquise, à savoir la synthèse d'enzymes inactivatrices, la modification de la cible des antibiotiques, des systèmes d'efflux qui diminuent la concentration de l'antibiotique dans la bactérie (Pittet et Sax, 2000).

*S.aureus* a pu acquérir des résistances aux antibiotiques suivants : pénicilline M ou méticilline(SARM), aminosides, macrolides, lincosamides et streptogramines (Lowy, 2003, Walsh et Howe, 2002, Diekema, 1997).

### III. DIAGNOSTIC DES PNEUMOPATHIES NOSOCOMIALES

Afin de se rapprocher de la réalité quotidienne et en l'absence de « *gold standard* », en particulier pour les PN acquises ou non sous ventilation mécanique (PAVM), le diagnostic de ces infections est proposé lorsque le patient présente différents signes : clinique, biologique et radiologique. Le diagnostic microbiologique est systématique et doit reposer sur des techniques quantitatives (**Girault, 2005**).

#### ➤ Signes cliniques et biologiques

L'apparition de sécrétions purulentes ou modifications des caractéristiques (couleur, odeur, quantité, consistance) ; toux ou dyspnée ou tachypnée ; auscultation évocatrice ; aggravation des gaz du sang (dé saturation) ou besoins accrus en oxygène ou en assistance respiratoire. Hyperthermie supérieure à 38.8°C sans autre cause ; leucopénie ( $< 4000 \text{ GB/mm}^3$ ) ou hyperleucocytose ( $> 12\,000 \text{ GB/mm}^3$ ) (**Descheemaeker et al., 2009**).

#### ➤ Signes radiologiques

Deux clichés radiologiques ou plus avec une image évocatrice de pneumonie; en absence d'antécédents de cardiopathie ou de maladie pulmonaire sous-jacentes, une seule radiographie ou un seul examen scanographique suffit (**Descheemaeker et al., 2009**).

### III.1- Diagnostic microbiologique

Le diagnostic microbiologique dépend de la qualité des prélèvements :

- ✓ **Prélèvement distal protégé (PDP) :** Ce prélèvement est réalisé par une insertion d'un double cathéter protégé dans la sonde d'intubation à l'aveugle ou guidé par fibroscope destiné au diagnostic des pneumopathies chez les patients ventilés (**Maitre, 2013**).

D'après **Fangio et al., (2002)**, Le double cathéter s'ouvre à l'intérieur de la partie infectée du poumon, par une seringue stérile trois aspirations sont appliquées sur le cathéter interne. qui est ensuite rétracté de quelques centimètres à l'intérieur du cathéter externe permettant ainsi d'éviter toute contamination lors du retrait de l'ensemble du dispositif hors des voies aériennes, à l'aide d'un ciseau stérile l'extrémité du cathéter interne est coupé (environ 5cm), puis recueilli dans un flacon stérile. Ce prélèvement est considéré comme la technique de référence, car il a l'avantage théorique d'être un prélèvement microbiologique protégé des voies aériennes distales, non contaminé par la flore microbienne des voies aériennes proximales, et donc plus spécifique.

- ✓ **Expectorations :** Il s'agit d'un prélèvement non invasif, réalisé par le patient lui-même ou à l'aide d'une kinésithérapie. Le recueil doit se faire le matin, au réveil, à jeun, après rinçage buccodentaire à l'eau distillée stérile à l'issue d'une toux profonde pour recueillir l'expectoration (**Fangio et al., 2002**).

- ✓ **Brossage bronchique protégé (BBP) :** Il s'agit d'une brosse de nylon placée à l'intérieur d'un double cathéter qui va permettre d'explorer le foyer infectieux avec précision. L'extrémité de la brosse est ensuite sectionnée et placée dans du sérum physiologique avant d'être envoyée au laboratoire.  
Ce prélèvement présente plusieurs avantages : il permet de localiser précisément le foyer infectieux par fibroscopie et est protégé de la flore commensale par le double cathéter. Cependant, c'est un prélèvement invasif, nécessitant un fibroscope et ne permettant de recueillir qu'une faible quantité de sécrétions respiratoires (**Williami, 2009**).
- ✓ **Lavage broncho-alvéolaire :** Il s'agit d'injecter 100 à 200 ml du sérum physiologique, directement dans la bronche à explorer, environ 20-60ml du liquide est ré-aspiré. Ce prélèvement est réalisé chez des patients en soins intensifs et/ou immunodéprimés. Son principal avantage est de pouvoir explorer un vaste territoire pulmonaire (bronchioles distales et alvéoles). En revanche, c'est un prélèvement invasif obligatoirement réalisé sous fibroscopie (**Pasche et al., 2012**).
- ✓ **Liquide pleural :** Avec une aiguille de ponction lombaire, la ponction est réalisée au ras de la cote inférieure du site suspecté afin d'éviter les vaisseaux intercostaux (**S.F.M, 2015**).
- ✓ **Hémoculture :** Est réalisée quand l'infection respiratoire est associée à la fièvre et à l'altération de l'état général (**S.F.M, 2015**).

Les prélèvements reçus au laboratoire sont traités dans la partie pratique.

*Partie*  
*expérimentale*

# I. MATÉRIELS ET MÉTHODES

L'isolement et l'identification des bactéries responsables des pneumopathies nosocomiales et leur profil d'antibiorésistance chez les patients hospitalisés s'est déroulé au laboratoire central de microbiologie du CHU de Beni Messous (wilaya d'Alger), durant une période de 6 mois (allant du 1 février au 31 juillet 2017).

## I.1- Matériel

### ▪ Matériel biologique

Il est représenté par les prélèvements respiratoires qui proviennent des malades hospitalisés en réanimation médical pédiatrique et adulte: le prélèvement distal protégé, le lavage broncho-alvéolaire, le liquide pleural, et l'expectoration.

Les souches témoins ATCC : *staphylococcus aureus* réf : 25923, *Escherichia coli* réf : 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* réf : 27853

### ▪ Matériel non biologique

Il est représenté principalement par, l'appareillage, les milieux de culture, les réactifs de révélation, les disques et bandelettes d'antibiotiques (voir partie annexe 1).

## I.2- Méthodes

### I.2.1- Prélèvement

Les prélèvements sont reçus au laboratoire dans des tubes ou des flacons stériles, accompagnés d'une fiche de renseignement, voir annexe 2.

Ils sont répertoriés en deux types : prélèvements contaminés (la flore de l'oropharynx du patient) et prélèvements non contaminés (Tableau IV).

**Tableau IV.** Les différents types de prélèvements respiratoires

Prélèvements contaminés	Prélèvements non contaminés
Expectoration	PDP (prélèvement distal protégé), LP (Liquide Pleural), LBA (Lavage Broncho-Alvéolaire),

Dès leurs arrivés au laboratoire, les prélèvements sont enregistrés et un numéro est attribué pour chaque prélèvement.

### I.2.2- Conduite à tenir au laboratoire devant les prélèvements respiratoires

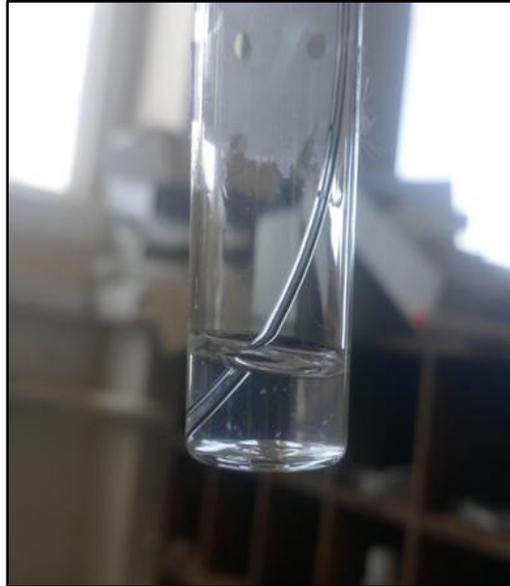
#### I.2.2.1- Examen macroscopique

L'infection bactérienne entraîne, une modification visuelle du prélèvement, clairement perceptible à l'œil nu, qui signe une anomalie patente. Lors d'une infection du système

respiratoire l'aspect du prélèvement peut être observé comme : clair, trouble, purulent et/ou hématique, en plus les expectorations peuvent avoir un aspect salivaire.

L'aspect macroscopique du prélèvement est noté sur la fiche de renseignement clinique.

La figure.3, illustre l'aspect clair d'un PDP.



**Figure3.** Aspect macroscopique d'un PDP (photo originale)

### **I.2.2.2- Examen microscopique**

#### **▪ Coloration de bleu de méthylène**

##### **• Principe :**

L'examen microscopique après la coloration au bleu de méthylène permet d'observer la forme des bactéries, leur regroupement et la présence d'une réaction inflammatoire (polynucléaires altérés ou non altérés, lymphocytes) et de cellules épithéliales. Suivant le mode opératoire

##### **• Préparation du frottis :**

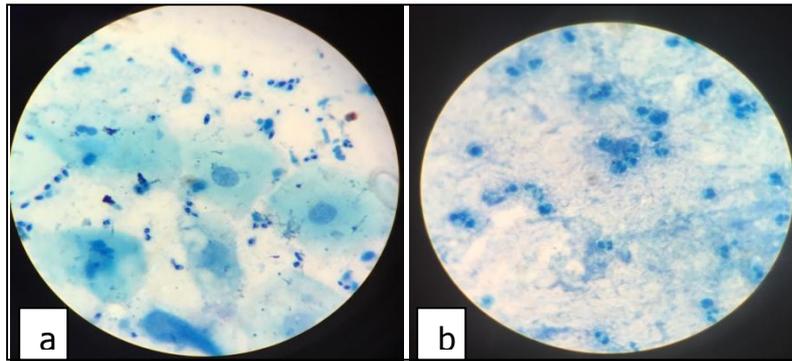
On dépose une goutte du prélèvement à l'aide de l'anse de platine stérilisée sur une lame propre, cette goutte sera étalée puis fixée à la chaleur.

##### **• Coloration :**

On couvre la lame par le bleu de méthylène pendant 20 minutes, puis on va la rincer et sécher.

##### **• Observation :**

Une fois la lame est sèche, l'observation s'effectuera sur le microscope optique au Gx1000. Seulement le noyau des cellules est coloré en bleu foncé, tandis que le cytoplasme est bleu. Le résultat de la coloration au bleu de méthylène est représenté par la figure 4.



**Figure 4 :** Coloration bleu de méthylène (Photo originale)

a- Cellules épithéliales

b- Polynucléaires

- **Interprétation :**

Un prélèvement est dit infecté, lorsqu'une réaction inflammatoire à type de polynucléaire est présente, mais l'interprétation des expectorations doit être faite selon la classification de Murray et Washington, rapportée dans le tableau V.

**Tableau V.** Interprétation de l'examen direct des expectorations

Classe	Cellules épithéliales	Leucocytes	Interprétation
1	> 25	<10	Salivaire
2	> 25	10 – 25	Salivaire
3	> 25	> 25	Douteux
4	10 – 25	> 25	Douteux
5	< 10	> 25	Purulent

Les expectorations des classes 4 (acceptable) et 5 (la plus appropriée), doivent être mis en culture. Les autres prélèvements doivent être refusés, car ils sont trop contaminés par la flore commensale.

### I.2.2.3-Mise en Culture

La culture de tous les prélèvements respiratoires se fait sur des milieux riches (gélose au sang frais et gélose au sang cuit),

**NB :** En plus des milieux précédemment cités, le milieu Hecktoen est ajouté pour les BGN.

L'ensemencement des milieux de culture est réalisé, en fonction de types de prélèvements, contaminés ou non contaminés.

- **La culture des expectorations** se fait par une dilution: au 1/2, puis de 1/100eme, la fluidification est agitée au vortex, dans le but de libérer les bactéries. A l'aide

de l'anse de platine calibrée 10 µl est prélevé, puis ensemencé, sur les milieux de culture, en commençant par le milieu le plus riche (gélose au sang cuit) suivi par le milieu le moins riche (gélose au sang frais). L'ensemencement est réalisé par la méthode de quatre quadrants, la technique est expliquée dans l'annexe 3.

- **La culture des prélèvements non contaminés** est réalisée, après l'ajout de 1ml d'eau physiologique, puis en prélevant 10µl du prélèvement préalablement agité à l'aide d'une anse de platine calibrée, l'inoculum est ensemencé sur les deux milieux de culture par la méthode des quadrants.

L'incubation des milieux de cultures ensemencés se fait dans une étuve à 35°C, avec 5-10% de CO<sub>2</sub>, pendant une durée de 18-48h.

- **Lecture**

- **Prélèvements contaminés :**

Le seuil de positivité pour les expectorations est fixé à 50 colonies identiques, détermine une numérotation plus de 10<sup>7</sup> UFC/ml. Mais en réanimation, la présence des colonies pures ou prédominantes dans le quatrième quadrant suffit pour valider la culture.

- **Prélèvements non contaminés :**

Ils sont représentés principalement par le prélèvement distal protégé, son seuil de positivité est de 10<sup>3</sup> UFC/ml qui correspond à 10 colonies identiques. Pour le lavage broncho-alvéolaire, le seuil de positivité est de 10<sup>4</sup> UFC/ml, soit 100 colonies identiques.

**Remarque :** Les résultats de la culture peuvent être :

- Positive à une ou deux bactéries (pathogènes).
- Négative.
- Flore microbienne polymorphe (FMP) : résultat ininterprétable (plusieurs types de micro-organismes ≥3).
- Flore normale (AGP).

L'aspect des colonies d'*A. baumannii* est illustré dans la figure.5.



**Figure 5.** L'aspect des colonies d'*A. baumannii* (photo originale)

#### **I.2.2.4-Identification bactérienne**

En plus de l'aspect des colonies, le diagnostic doit être confirmé par: les tests d'orientation et les tests spécifiques

##### **❖ Test d'orientation**

##### **• Coloration de Gram**

La coloration de Gram (annexe 4) : est effectuée à partir des colonies cultivées sur gélose au sang.

Les frottis sont observés au microscope optique au Gx1000.

Selon le résultat de la coloration de Gram les tests catalase et oxydase sont effectués.

##### **• Recherche d'oxydase**

L'oxydase est le critère le plus discriminatif et le plus employé pour l'identification des bacilles à Gram négatif. ce test recherche le cytochrome-oxydase.

Cette recherche consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie, à oxyder la forme réduite incolore de dérivés N-méthylé du paraphénylène diamine, en semi-quinone (rose violacé).la technique utilisé est la suivante :

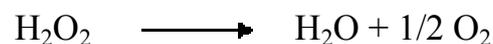
- Déposer une goutte de réactif sur un papier filtre
- Avec une pipette Pasteur prélever une colonie sur milieu solide et l'écraser sur le papier filtre pendant une dizaine de secondes.

#### **Lecture**

La lecture s'effectue après 30 secondes

##### **• Recherche de catalase**

Ce test est à la base de l'identification des cocci à Gram +, la catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries, par la réaction suivante:



#### **Technique**

- Déposer une goutte d'eau oxygénée sur une lame.
- A l'aide d'une pipette Pasteur bouclée, déposer une colonie isolée de la souche à tester.

#### **Lecture**

La lecture est immédiate avec dégagement gazeux sous forme de bulle d'air.

Les tests d'orientation permettent de choisir la galerie semi-automatique spécifique selon le tableau VI.

**Tableau VI.** Démarche de l'identification bactérienne.

C U L T U R E	GSC	GSF	HK		Gram		Bactérie	Identification biochimique
					-	+		
			Lac	Oxydase	Catalase			
	+	+	+	+/-	-	+	Entérobactéries	API20E
	+	+	+	-	+	+	<i>P.aeruginosa</i> <i>B. cepacia</i>	API20NE
-					+	BGN oxydatif		
	+	-	-		+	+	<i>Haemophilus spp</i>	Satélitisme /API NH
	+	+ hémolyse β	-		-	+	<i>Staphylococcus spp</i>	Galerie classique/ API Staph
	+	+ Hémolyse A	-		-	-	<i>Streptococcus spp</i>	Disque d'optochine (α hémolytique)

❖ **Tests spécifiques**

• **Système API**

Les galeries API sont des galeries de tests biochimiques miniaturisés, se présentent sous la forme d'une série de tubules, *contenant des substrats sous forme déshydratée* correspondant chacun à un test biochimique spécifique, avec lequel les bactéries réagissent différemment.

La lecture se fait par changement d'aspect direct ou après rajout des réactifs de révélations.

La description des systèmes API utilisés, est démontrée dans le tableau VII.

**Tableau VII.** La description des galeries API.

Galerie	Description
<b>API 20 NE</b>	API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non enterobactéries et non fastidieux (ex. <i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Aeromonas</i> , etc.) combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation
<b>API 20 E</b>	API 20 E est un système standardisé pour l'identification des <i>Enterobacteriaceae</i> et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés
<b>API Staph</b>	API Staph est un système standardisé pour l'identification des genres <i>Staphylococcus</i> , <i>Micrococcus</i> et <i>Kocuria</i> , comporte 20 microtubes
<b>API NH</b>	API NH est un système standardisé pour l'identification des <i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i> (et genres apparentés) et <i>Moraxella catarrhalis</i> ( <i>Branhamella catarrhalis</i> ).
<b>API 20 Strep</b>	API 20 Strep est un système standardisé associant 20 tests biochimiques qui présentent un grand pouvoir discriminant. Il permet de faire un diagnostic de groupe ou d'espèce pour la plupart des streptocoques, entérocoques et pour les germes apparentés les plus courants.

Le mode opératoire employé pour l'utilisation des galeries API est de Biomérieux.

#### **Autres tests spécifiques**

- **Test de satellitisme**

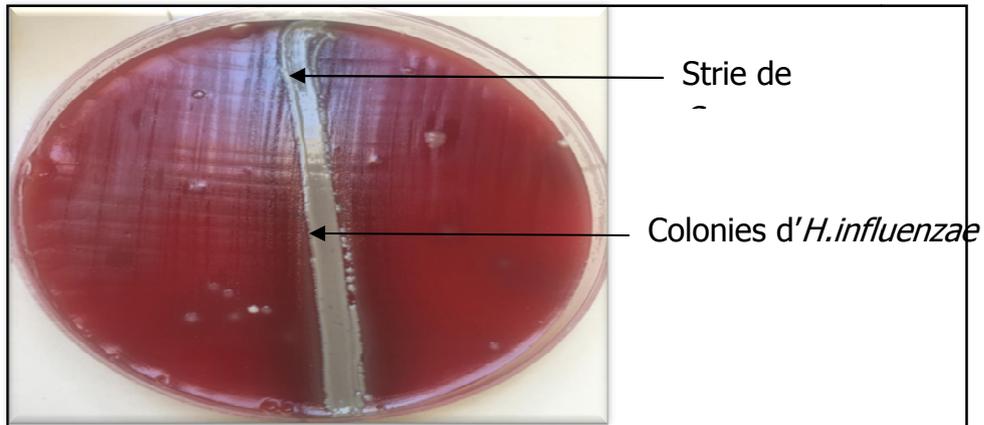
Le principe de ce test est le développement des colonies d'*H.influenzae*, à proximité d'une strie de *S. aureus* (facteur V) sur gélose au sang frais (facteur X). Le test consiste à :

- Ensemencer une suspension d'*Haemophilus* sur un milieu gélosé au sang en utilisant un écouvillon.
- A l'aide d'une pipette Pasteur, une strie de *S. aureus* est effectuée au centre de la boîte.

La période d'incubation est de 24h à 35°C sous CO<sub>2</sub>.

## Lecture

*Haemophilus influenzae* poussant qu'autour de la strie de *S. aureus*. Le résultat du test est représenté dans la figure 6.



**Figure 6.** Test de satellitisme (photo originale)

- **Test de coagulase**

### Principe

Mettre en évidence *Staphylococcus aureus*, qui possède la coagulase, qui est une enzyme capable de coaguler le plasma de lapin. Suivant la technique

- Déposer 4 gouttes de plasma de lapin dans un tube à visse.
- Prélever d'une culture, des colonies jeunes de *staphylococcus* en utilisant une pipette Pasteur, puis l'introduire dans le tube contenant le plasma tout en l'agitant.

### Lecture

Après 2-24h d'incubation à 35°C, une prise en masse du contenu du tube : coagulation du plasma qui est illustrée dans la figure 7.



**Figure 7.** Coagulation du plasma par *S. aureus* (photo originale)

- **Test d'optochine**

### **Principe**

Le test d'optochine est utilisé pour distinguer le pneumocoque des autres Streptocoques  $\alpha$ -hémolytique, la technique est la suivante :

- Ensemencer le milieu gélose au sang frais avec la souche présumée de *Streptococcus pneumoniae*.
- A l'aide d'une pince flambée et refroidie, déposer un disque imprégné d'optochine dans la première partie, à 1.5 cm du bord de la boîte
- Incuber 18 h à 35 °C sous 10% de CO<sub>2</sub>

### **Lecture**

Une zone d'inhibition clairement définie  $\geq 14$  mm de diamètre autour du disque, indique que la bactérie testée est *Streptococcus pneumoniae*.

### **1.2.2.5-Antibiogramme**

- **Technique de diffusion de disques d'antibiotique sur milieu gélosé**

La réalisation de l'antibiogramme par diffusion, consiste à déposer des disques imprégnés d'une dose connue d'antibiotique, sur une gélose Mueller-Hinton ensemencée par la souche bactérienne isolée à fin d'étudier la sensibilité et la résistance des bactéries vis-à-vis des antibiotiques, selon le mode opératoire du CLSI 2015.

### **Inoculum**

- À partir d'une culture pure de 18h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques, dispersées dans 5 à 10ml d'eau physiologique stérile à 0.9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0.5 MF.
- Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum ensuite l'essorer en le pressant fermement et en le tournant contre la paroi interne du tube afin de décharger au maximum

### **Ensemencement**

- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.
- Appliquer les disques d'antibiotiques spécifiques selon le type de bactérie (annexe 5) et les incuber à 35°C pendant 18h, à atmosphère ordinaire ou en présence de 5% de CO<sub>2</sub>, selon l'exigence de la bactérie.

## Lecture

Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse ou une règle et les résultats obtenus, seront comparés aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes (voir annexe 5).

Ainsi les bactéries seront classées dans l'une des catégories Résistant (R), intermédiaire (I) ou Sensible.

- **Technique d'E-Test : test pour le  $\beta$ -lactame de *S. pneumoniae***

La préparation de l'inoculum et l'ensemencement sont les mêmes que celle de l'antibiogramme par diffusion de disque d'antibiotique.

### Dépôt de la bandelette E-test

Les bandelettes sont prélevées à l'aide d'une pince bactériologique préalablement flambées au bec Bunsen, le contact avec les pinces est fait au niveau de l'extrémité marquée E. les bandelettes sont déposées délicatement sur la surface gélosée, en commençant par l'extrémité correspondant aux concentrations les plus faibles de l'antibiotique testé puis en progressant jusqu'aux concentrations les plus élevées, tout en évitant la formation de bulles d'air entre la gélose et la bandelette, une fois appliquée la bandelette ne peut être déplacée.

L'incubation se fait pendant 18h-35°C avec 5% de CO<sub>2</sub>.

## Lecture

La CMI de l'antibiotique testé correspond à la graduation, située à la jonction entre l'ellipse et la bandelette E-test. Les résultats obtenus seront comparés aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes (annexe N°5)

Ainsi les bactéries seront classées dans l'une des catégories Résistant (R), Intermédiaire (I) ou Sensible (S).

- **Tests complémentaires**

- **Méthodes du double disque**

Recherche de la  $\beta$ -lactamine à spectre étendu (BLSE) chez les *entérobactéries*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter spp.*

La détection phénotypique de la BLSE garde tout son intérêt dans les études épidémiologiques et en hygiène hospitalière. On recherche une BLSE devant :

- Un diamètre inférieur aux valeurs figurant dans le tableau VIII.

**Tableau VIII.** Les valeurs des diamètres des zones d'inhibition

<b>Antibiotique</b> <b>Bactérie</b>	CTX	CAZ	ATM
Entérobactéries	<26mm	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	<18 mm	<22 mm
<i>Acinetobacter spp</i>	-	<18 mm	-

- L'absence de synergie avec diminution des diamètres des C3G.

- La présence d'une résistance aux molécules suivantes : ampicilline, ticarcilline, céfazoline avec un diamètre < 6mm, par contre l'AMC présente un diamètre d'inhibition pour les entérobactéries.

### Technique

Ce test se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme.

#### ➤ Application des disques d'antibiotiques

##### • Pour les entérobactéries :

Dépôt d'un disque d'AMC et un disque de C3G (CTX) à une distance de 30 mm (centre à centre)

##### • Pour *P. aeruginosa* et *Acinetobacter spp.* :

Dépôt d'un disque de TCC avec disque de C3G (CAZ) ou monobactam (ATM) à distance de 25 mm.

Diffusion des antibiotiques pendant une heure, à température ambiante (sur la paillasse), la boîte sera déposée couvercle vers le haut.

Après 1h d'incubation, ôter le disque d'AMC (ou TCC) et le remplacer par un disque de CTX (ou CAZ).

La boîte sera incubée pendant 18h à 35°C.

### Lecture

Le test du double disque est positif quand le diamètre d'inhibition autour du C3G, appliqué après diffusion du disque AMC ou TCC est  $\geq 5$  mm par rapport au diamètre d'inhibition autour du disque de C3G seul.

## ▪ Test de Hodge

### Détection des carbapénémases

Ce test est sensible et spécifique à 100% pour détecter les métallos-carbapénémases

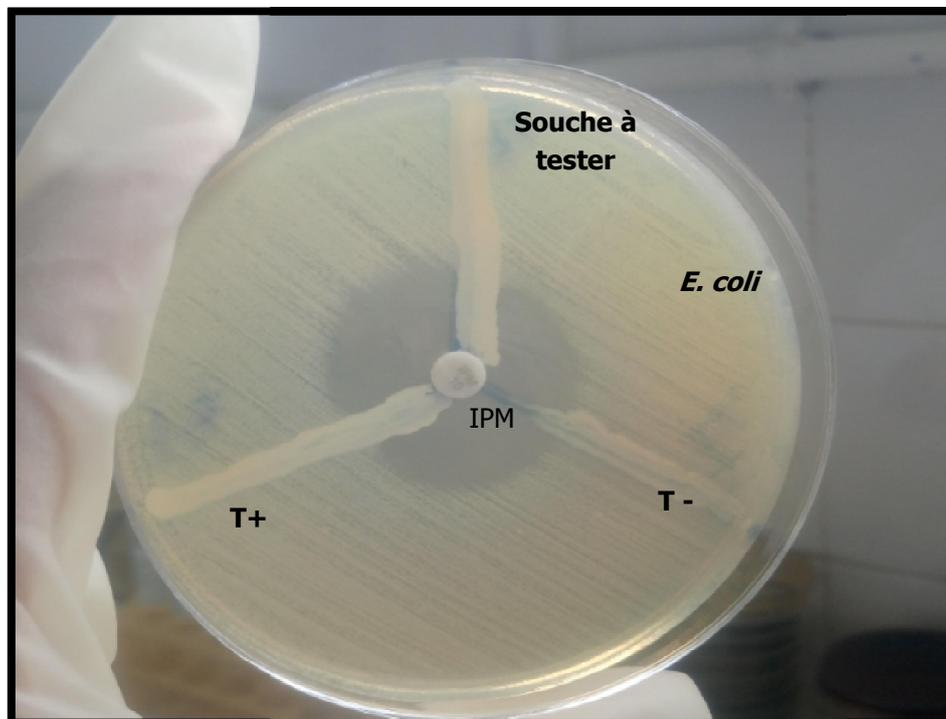
### Technique

- Préparation d'une suspension bactérienne d'*E.coli* ATCC25922 à 0,5 MF dans 5ml d'eau physiologique.
- Cet inoculum sera dilué au 1/10ème (0,5ml de la suspension de 0,5 MF + 4,5 ml d'eau physiologique).
- L'ensemencement à l'aide d'un écouvillon sur la gélose MH, et laisser sécher 3à5 mn.
- Dépôt au centre un disque d'imipénème 10µg
  - A partir du disque, faire une inoculation en trait avec souche à tester, témoin positive (souche d'*A. baumannii* du laboratoire : carbapénémase positive) et témoin négatif souche d'*E. coli* 25922).
- Incubation à 35°C± 2°C pendant 16 à 24h.

### Interprétation

✓ Le test de Hodge est positif quand *Escherichia coli* ATCC 25922 au contact d'une souche productrice de carbapénémase de type B, va pénétrer et croître le diamètre d'inhibition en donnant un aspect d'invagination de la culture (figure 8).

✓ Le test de Hodge est négatif quand il n'y a aucune modification de diamètre d'inhibition d'*Escherichia coli* ATCC 25922 au contact des souches à étudier.



**Figure 8.** Test de trèfle positif d'*A. baumannii* (Photo originale)

## II. RESULTATS ET DISCUSSION

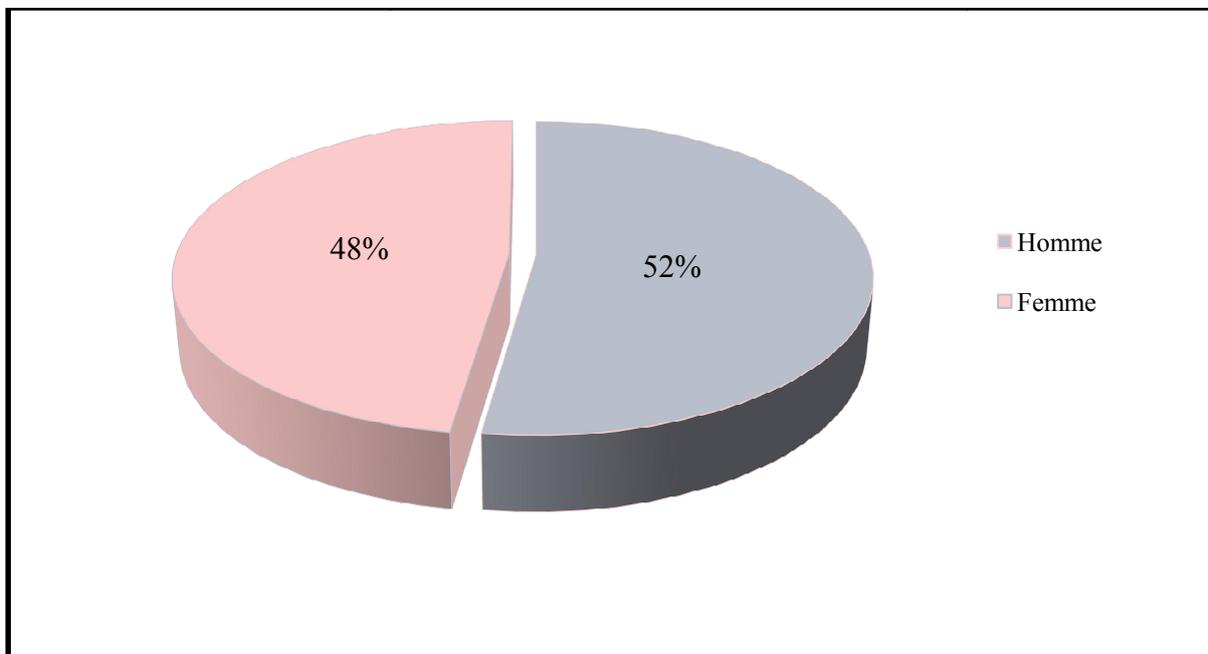
Pendant la période d'étude, nous avons reçus 113 prélèvements : 95 PDP, 4 LBA, 7 LP et 7 expectorations, provenant de 67 malades hospitalisés dans les services de réanimations médicales pédiatrique et adulte. Les 67 patients sont atteints de pneumonie de point de vue médical (suspicion de pneumonie)

Après culture, isolement et identification, nous avons obtenu les résultats suivants :

### II.1-ETUDE DE LA POPULATION

#### II.1.1- Répartition des patients selon le sexe

Sur les 67 patients hospitalisés, 35 sont de sexe masculin avec un taux de 52% et 32 sont de sexe féminin ce qui représente un pourcentage de 48%, soit un sexe ratio H/F de 1.09, voir figure 9.



**Figure9** : Répartition des patients selon le sexe

Le sexe masculin est considéré par plusieurs études comme un facteur de risque de survenue des PN.

Dans une étude réalisée en 2016 au Maroc, le pourcentage des hommes atteints de pneumopathie nosocomiale est de 77% (**Zegmout et al., 2016**).

Une autre étude faite en 2010 dans 66 unités de réanimation au sud de la France, affirme la prédominance du sexe masculin avec taux de 63% par rapport au nombre totale des patients hospitalisés (**Constantin et al., 2010**).

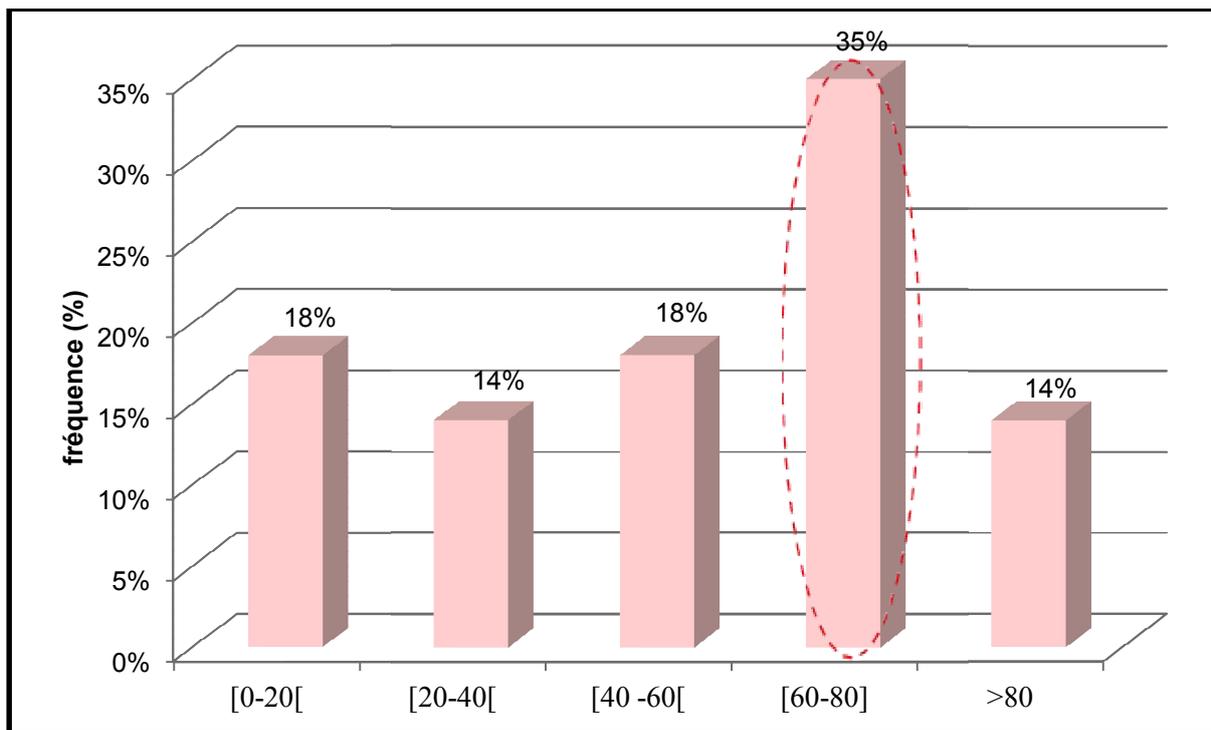
## II.1.2-Répartition des patients selon l'âge

Sur les 67 patients, l'âge est retrouvé chez 49 patients seulement, voir tableau IX qui représente la répartition des patients selon les tranche d'âge.

**Tableau IX.** Répartition des patients selon les tranches d'âge

Tranches d'âge (ans)	[0-20[	[20-40[	[40 -60[	[60-80]	>80	TOTAL
<b>TOTAL</b>	9	7	9	17	7	49
<b>Pourcentage (%)</b>	18.37%	14.29%	18.37	34.68	14.29	100

L'âge moyen des 49 patients hospitalisés est 51 ans avec des extrêmes allant de 23 jours à 90ans, la figure 10 montre que la tranche d'âge la plus touchée est celle de 60 à 80 ans à 35%.



**Figure 10:** Répartition des patients selon l'âge.

L'incidence des pneumonies nosocomiales est âge dépendante, 5cas sur 1000 affectent les patients hospitalisés de moins de 35ans contre plus de 15 cas sur 1000 chez les patients âgés de plus de 65ans (**Vincent et al., 2011**).

Les taux des infections nosocomiales sont plus élevés chez les personnes âgées. L'âge supérieur à 60 ans est un facteur de risque de PN acquise aux soins intensifs (**Donati et Papazian, 2008**).

Nos résultats s'accordent à ceux de **Kollef, 1999** et **Ezzouine et al., 2014** :

La surveillance prospective des infections nosocomiales instituées dans 89 hôpitaux nord-américains entre 1986 et 1996, atteste que 54% des infections sont survenues chez des patients de plus de 65 ans (**Kollef, 1999**).

Dans une étude rétrospective descriptive sur trois ans (2010-2012) au Maroc, l'âge moyen des patients hospitalisés dans le service de réanimation médicale-CHU Ibn Rochd-Casablanca, est de 51,15 ans (**Ezzouine et al., 2014**).

### II.1.3- Facteurs de risque

Les signes cliniques des 67 patients hospitalisés sont classés en fonction des facteurs de risque généraux et spécifiques (tableau X).

De nombreux facteurs de risque sont identifiés tels que les pathologies pulmonaire préexistante, les AVC et les troubles de conscience

**Tableau X.** Répartition des signes cliniques selon les facteurs de risque

Facteurs de risque	Signes cliniques	Nombre de Patients	Pourcentage
Facteurs de risque généraux	Diabète	1	2%
	AVC	6	10%
	Hyperleucocytose	1	2%
	choc septique	3	5%
	Pancréatite	1	2%
	Trouble de conscience	1	2%
	Coma	1	2%
	Fièvre	8	13%
	Sepsis sévère	1	2%
	Crise de myasthénie	1	2%
	Hypothermie	2	3%
Facteurs de risque spécifiques	Asthme	1	2%
	Pneumopathie	7	11%
	BPCO	1	2%
	Embolie pulmonaire	1	2%
	PAVM	5	8%
	SDRA	3	5%
	Trachéotomie	1	2%
Plusieurs facteurs		17	23%
Total		62	100%

L'existence d'une pathologie pulmonaire préexistante préalable, susceptible d'altérer les mécanismes de défense du poumon est un facteur de risque important. Elle facilite l'inoculation septique du poumon et la survenue ultérieure de PN (**Torres et al., 1990**).

Dans l'étude de **Zegmout et al., 2016** l'affection pulmonaire représente 25% de la pathologie d'admission des patients en réanimation.

les troubles de conscience induisent l'altération du reflexe de toux, les troubles de déglutition et l'inhalation des sécrétions au niveau des voies aériennes inférieures favorisant ainsi la survenue de PN (**Leal-Noval et al., 2000**). Dans notre série, 3% de nos patients avaient des troubles de conscience

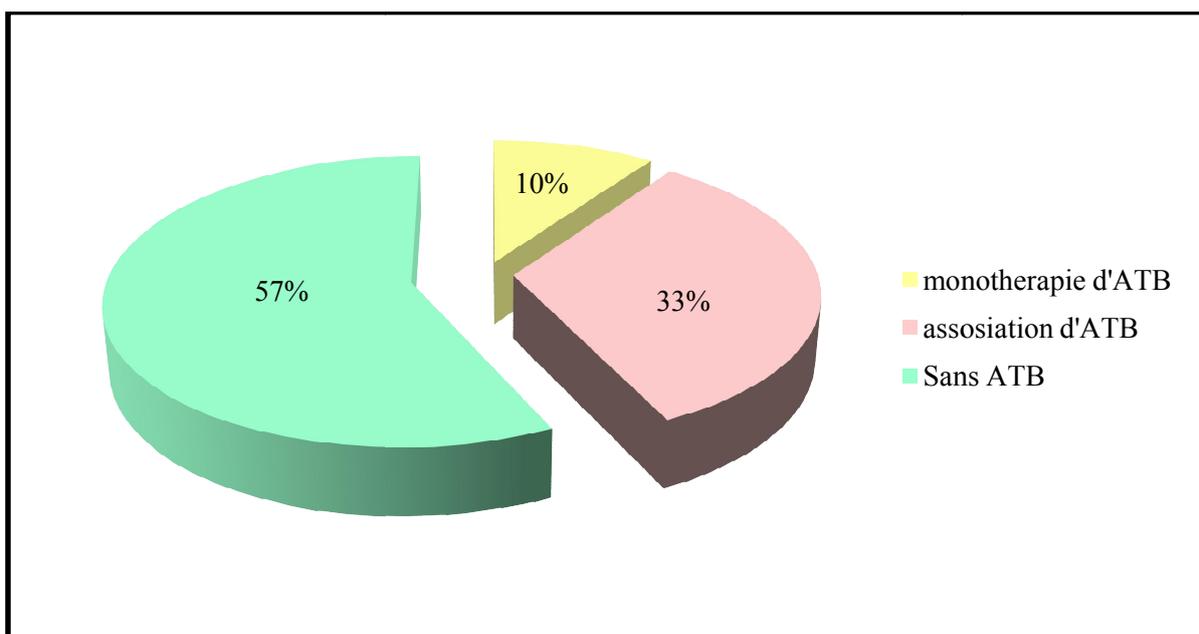
Dans notre étude, 25.4 % des malades atteints de PN ont été admis en réanimation pour un poly-traumatisme grave, alors que 9% ont été admis pour un accident vasculaire cérébral et 6% ont été admis pour prise en charge d'un état d e choc.

Nos résultats concordent avec les résultats d'une étude réalisée au Service de réanimation médicale, CHU Saint Louis, Paris, France, 36%des patients ont été ventilés avec 14% pour un SDRA), 31 % ont développé un choc septique et 59% présentés une hypothermie 32–34 °C > 12 heures) (**Lemiale, 2011**).

On retrouve les mêmes pathologies avec des pourcentages différents.

#### II.1.4- Antibiothérapie initiale

Dans les fiches de renseignement, 48 patients étaient sous traitements d'antibiotiques préalables, dont 11 bénéficiaient d'une mono-antibiothérapie, et les 37 autres prenaient une association d'antibiotiques, comme le représente la figure 11.



**Figure 11 : L'antibiothérapie initiale**

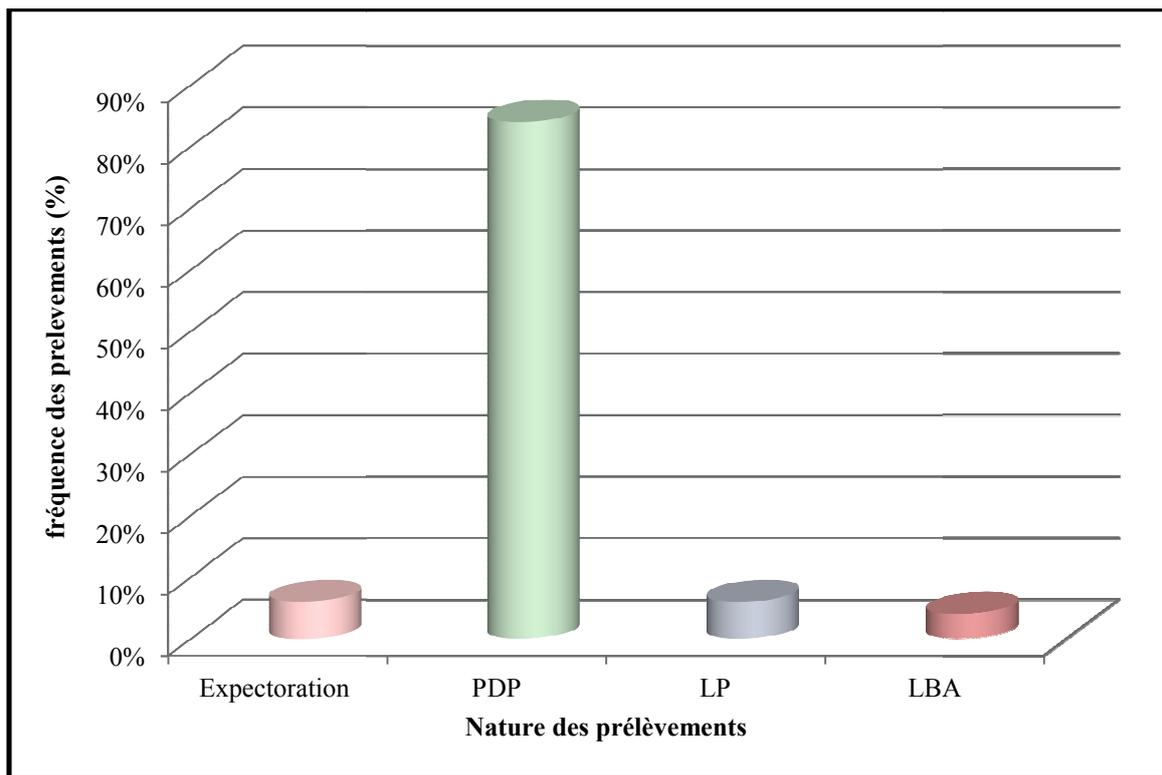
Parmi les infections nosocomiales en réanimation, les PAVM sont probablement l'une des ou la plus sévère(s) (**Chastre et al., 2002**). L'instauration d'une antibiothérapie probabiliste inadaptée s'accompagne d'une augmentation de la morbi-mortalité et ou l'émergence de la résistance bactérienne aux antibiotiques (**Roquilly et Asehnoune, 2013**).

Ce pendant Plusieurs études ont établi un lien entre la réduction de la mortalité et la précocité et l'appropriation de l'antibiothérapie initiale. Par conséquent, le traitement antibiotique doit être mis en place le plus rapidement possible en pratique avant le résultat de l'antibiogramme (**Roquilly et Asehnoune, 2013**).

## II.2 Diagnostique microbiologique

### II.2.1-Nature des prélèvements

Le diagnostic des PN est effectué par le prélèvement distal protégé dans 84%, les expectorations, le liquide pleural avec un taux identique de 6% et le lavage broncho-alvéolaire dans 4%. La nature des différents prélèvements est représentée par la figure 12.



**Figure 12:** Nature des prélèvements pulmonaires

Nos résultats sont les mêmes que ceux de **Zegmout et al. (2016)**, où le prélèvement distal protégé (PDP) représente 86%.

### II.2.2-Aspect macroscopique

L'observation macroscopique a été indiquée pour 53 prélèvements, dont 21 à aspect clair pour le prélèvement distal protégé, le reste (32) est partagé entre l'aspect trouble, hématique et purulent .la figure 13 résume ces résultats.

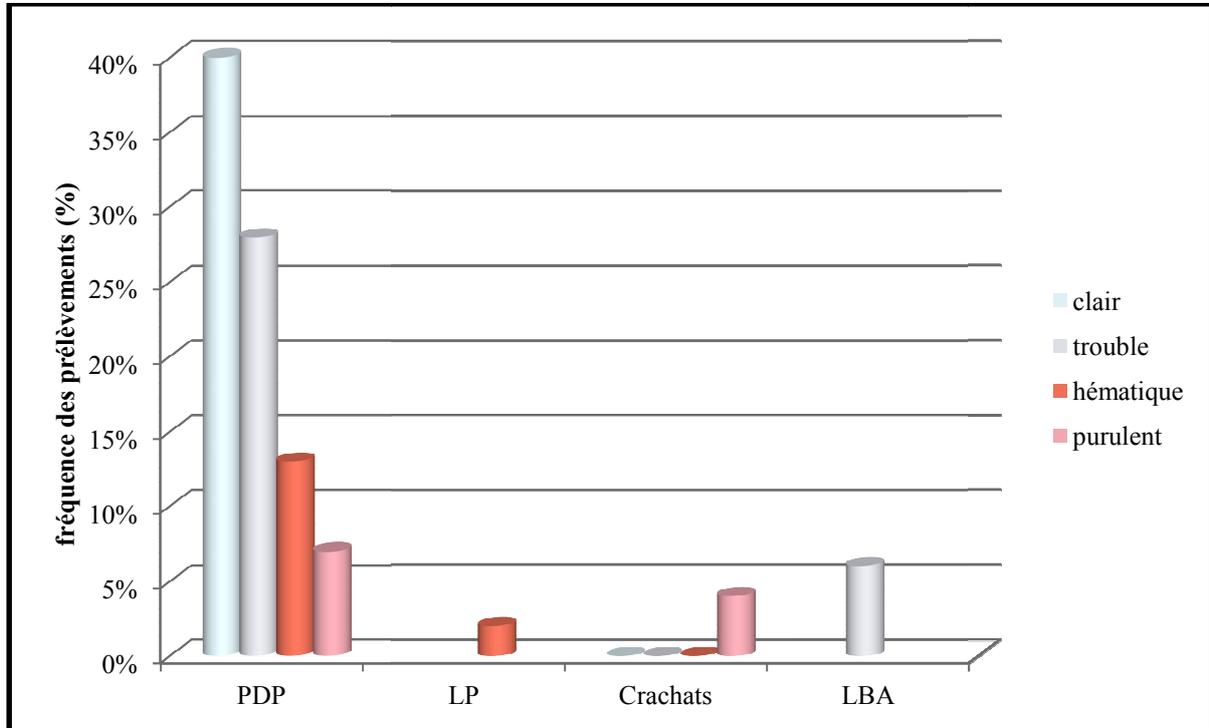


Figure 13: Aspect des prélèvements.

### II.2.3-Aspect microscopique

L'examen microscopique effectué pour 72 prélèvements révèle, la présence ou l'absence d'un ou plusieurs éléments nucléés [polynucléaires (altérés /non), et lymphocytes] et les cellules épithéliales et également les microorganismes (bacille, cocci et levure).Les résultats de l'examen direct sont représentés dans le tableau XI.

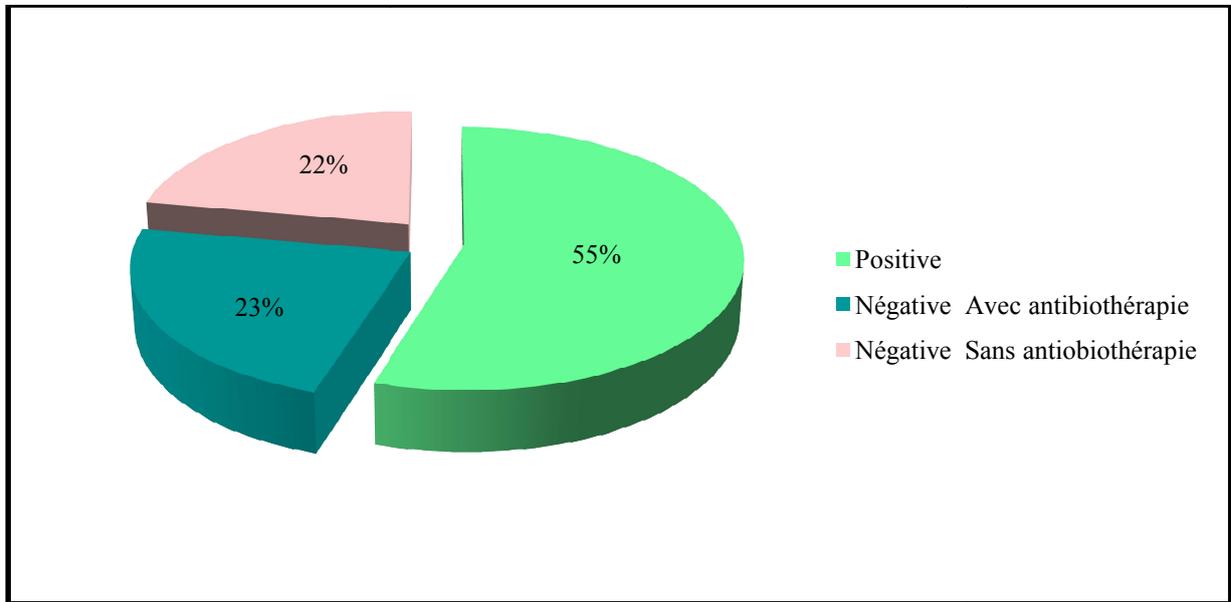
Tableau XI. Résultat de l'examen direct.

Examen direct	Positif	Négatif	Non fait	ininterprétable	Total
<b>Nombre</b>	24	36	41	12	113
<b>Pourcentage</b>	21%	32%	36%	11%	100%

**NB :** L'examen direct positif est représenté par la présence des polynucléaires neutrophiles avec ou sans bactéries.

## II.2.4-Taux des prélèvements positifs

Le développement des microorganismes ensemencés sur les milieux de culture est au nombre de 62 soit un taux de 55% de positivité. (figure14). 23% représentent une culture négative avec des patients sous antibiothérapie, les 22% restants sont des cultures négatives chez des patients qui n'ont pas reçus d'antibiotiques.



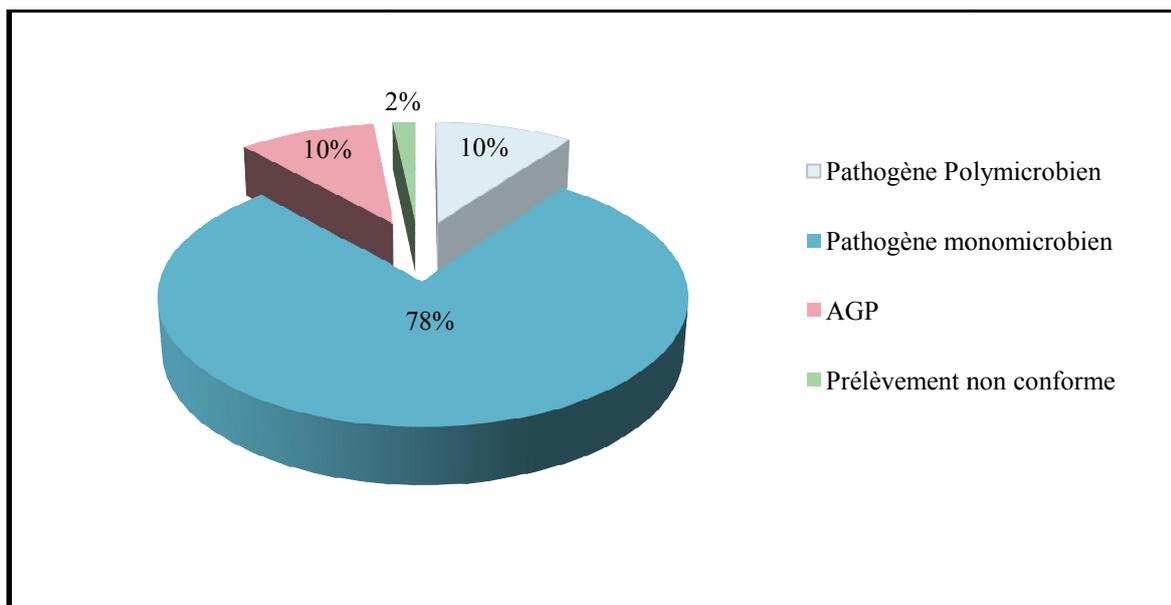
**Figure14** : Taux de positivité des cultures.

La négativité des résultats de la culture peut être expliquée par :

- L'utilisation d'une antibiothérapie inadéquate.
- L'origine virale de la pneumopathie (présence de leucocyte de type lymphocytaire dans l'examen direct).
- les signes cliniques et biologiques sont causés par des maladies sous-jacentes.

## II.2.5- Résultats de la culture

Les PN sont dues principalement à une infection mono-microbienne avec un taux de 78%, (figure 15), 10% des cas représentent une infection poly-microbienne, le même taux est indiqué pour les AGP et un seul cas de prélèvement non conforme est signalé



**Figure 15 :** Réprésentation des résultats selon les types de cultures.

Le résultat de la culture des prélèvements reçus des services de réanimation est dominé par la culture mono-microbienne.

➤ **Culture poly-microbienne**

L'affection poly-microbienne est due exclusivement à une infection à deux bactéries, qui est représentée par les BGN. Le tableau XII représente les différentes associations.

**Tableau XII.** Culture poly-bactérienne.

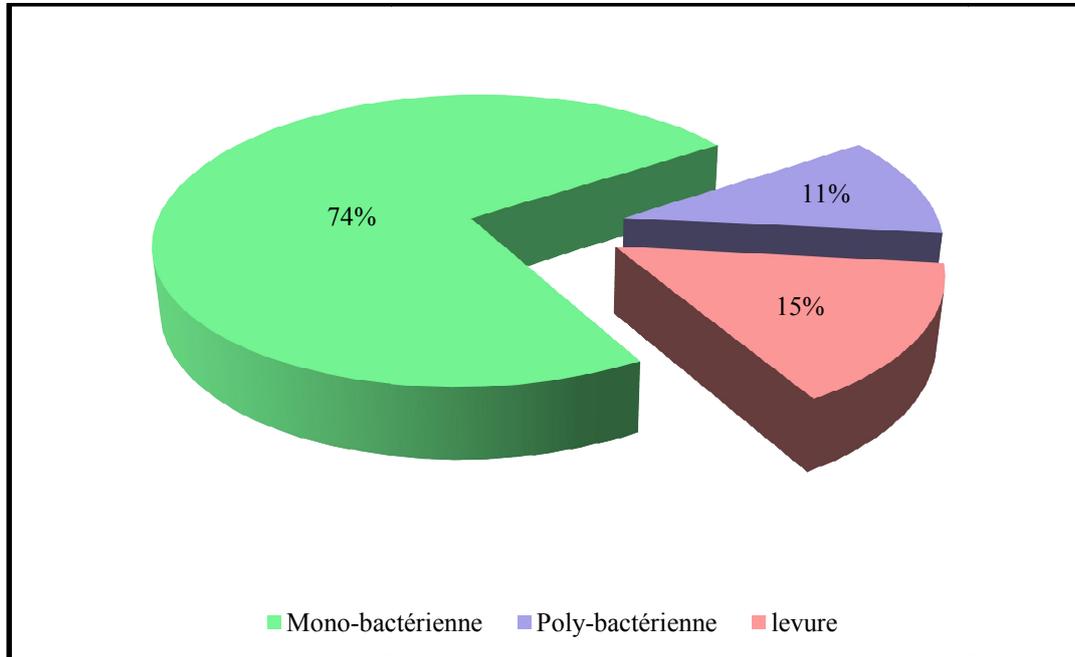
Culture poly-bactérienne	Pourcentage
<i>A. baumannii</i> + <i>P. aeruginosa</i>	33%
<i>A. baumannii</i> + <i>K. pneumoniae</i>	16%
<i>P. aeruginosa</i> + <i>K. pneumoniae</i>	17%
<i>P. aeruginosa</i> + <i>E. cloacae</i>	17%
<i>P. aeruginosa</i> + <i>S. marcescens</i>	17%
<b>Total</b>	<b>100%</b>

L'association la plus observée est entre *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* avec une fréquence de 33%.

Nos résultats concordent à ceux de l'étude de **Grati et al., (2005)**, dans le service d'anesthésie et réanimation au CHU F.B. Monastir Tunisie en 2001. Ils ont trouvés que 71% des cas, les PN étaient secondaires à un seul germe et 29% des cas, il s'agissait d'une infection à deux germes.

### II.2.5.1-Répartition des micro-organismes

Les microorganismes isolés dans la culture sont représentés essentiellement par des bactéries avec un taux 85%, les levures ne représentent que 15% des isolats. Ce résultat est illustré dans la figure 16.



**Figure 16** : Répartition des micro-organismes selon le résultat de la culture.

Selon une enquête d'incidence en réanimation réalisée par le CCLIN (Centre de Coordination et de Lutte contre l'Infection Nosocomiale) en 2001, les pneumonies nosocomiales sont engendrées dans 86% des cas par les bactéries. Les champignons essentiellement le *Candida* sont responsables de 14% des cas.

#### II.2.5.1.1-Levures

Les 8 levures isolées, sont représentées uniquement par *Candida albicans*, leur identification est effectuée dans l'unité de parasitologie.

L'infection à *Candida spp.* est la plus fréquente des infections à levures en réanimation. Chez le patient immunocompétent, la présence de levures dans les prélèvements peut être une colonisation cela dépend de la clinique. Chez le sujet adulte immunocompétent, la pneumopathie à levures est décrite, mais reste très exceptionnelle (Clavier et al., 2014).

#### II.2.5.1.2-Bactéries

Les bactéries isolées de la culture sont reportées dans la figure17, elles sont représentées à 90 % des cas par les bacilles à Gram négatif, les cocci à Gram positifs occupent les 10 % restants.

Les BGN sont dominés essentiellement par l'*Acinetobacter baumannii* 47% suivi de *Pseudomonas aeruginosa* 25%, d'entérobactérie 14% et d'*Haemophilus influenzae*, de *Brukholderia cepacia* avec un taux identique de 2%.

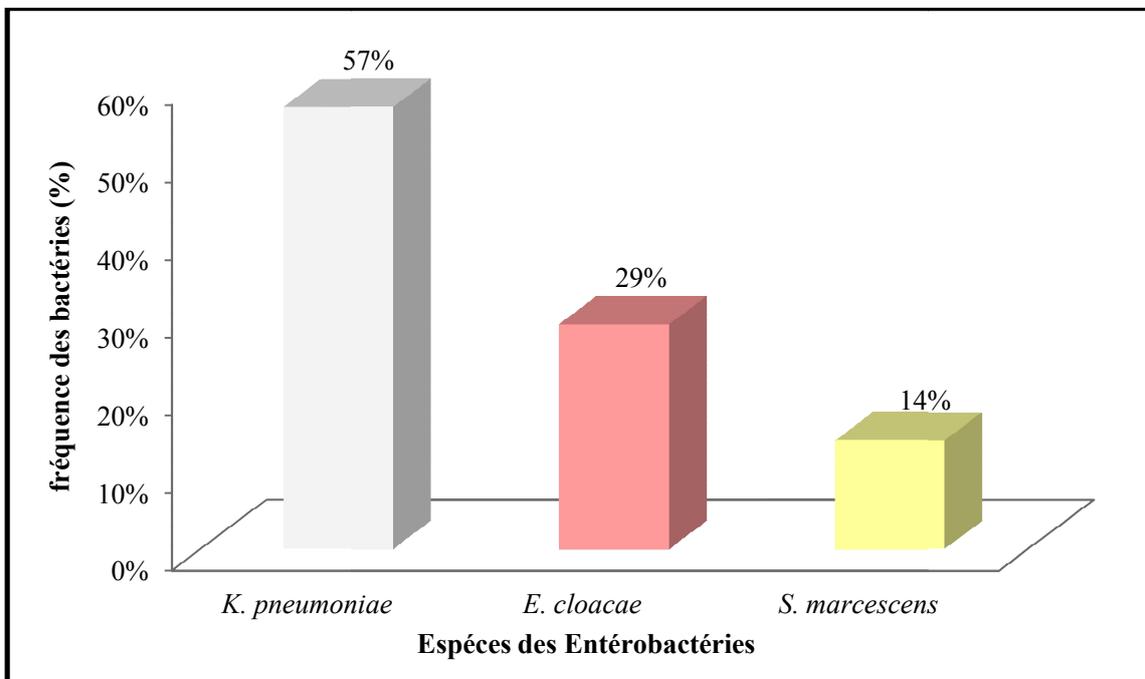


**Tableau XIII.** Fréquences des bactéries isolées des différents services de réanimations

Étude	Fréquence des bactéries isolées aux services de réanimations			
	BGN			CGP
	Entérobactéries	<i>P.aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>S.aureus</i>
France 2007 (n=65)	53.8%	34.4%	-	10.1%
France 2011 (n=776)	35.9%	23.8%	3.7%	12%
Tunisie 2015 (n=60)	15,4 %	21 %)	38,7%	-
Algérie 2015 (n=614)	14.3 %	22.9%	37.1%	-
Notre étude (n=113)	14%	25%	47%	8%

(Blel et al., 2015, Douah et al., 2015, Dupont , 2011)

**NB :** Sept cas des PN sont secondaires aux entérobactéries, dont quatre (4) sont retrouvées associées à d'autres BGN. Parmi ces entérobactéries, le *Klebsiella pneumoniae* occupe le premier rang avec un nombre de 4, suivi d'*Enterobacter cloacae* avec 2cas, et un seul cas de PN causé à *Serratia marsescens*, voir figure 18.



**Figure18 :** Répartition des entérobactéries

- ***Klebsiella pneumoniae*** : Sur les quatre souches de *K. pneumoniae* isolées, deux provenaient d'une culture mono-microbienne et deux de culture poly-microbienne.

La figure19 représente une culture de *Klebsiella pneumoniae* sur milieu Hektoen.



**Figure19:** Culture de *K. pneumoniae* sur milieu Hektoen  
(Photo originale).

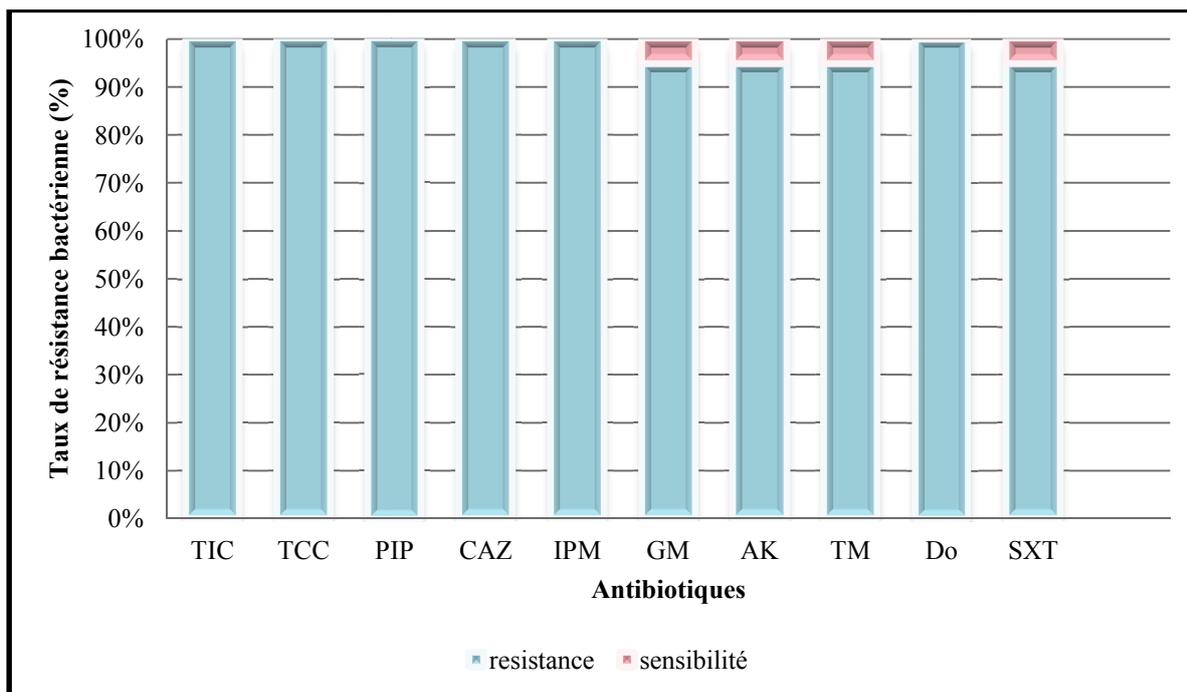
Le même résultat a été trouvé dans une étude faite dans le *Service* de réanimation médicale polyvalente et toxicologique en Tunisie, 22%(n=7) des pneumopathies nosocomiales étaient causées par les entérobactéries. Parmi ces entérobactéries, la *Klebsielle pneumoniae* occupait le premier rang (n = 3) (M'Rad et al., 2013).

## **II.3 Antibiorésistance**

### **II.3.1- Résistance des BGN aux différents antibiotiques**

#### ***II.3.1.1-Acinetobacter baumannii***

Les 21 souches d'*A. baumannii* présentent une résistance presque totale à la majorité des antibiotiques testés. Mais elles restent sensibles à la Colistine. De plus trois souches étaient sensibles à la Gentamicine/ Tobramycine/ Cotrimoxazole. La figure 20 représente les résultats des la résistance aux antibiotiques obtenus de l'antibiogramme.



**Figure 20:** Profil de résistance aux antibiotiques d'*A.baumannii*.

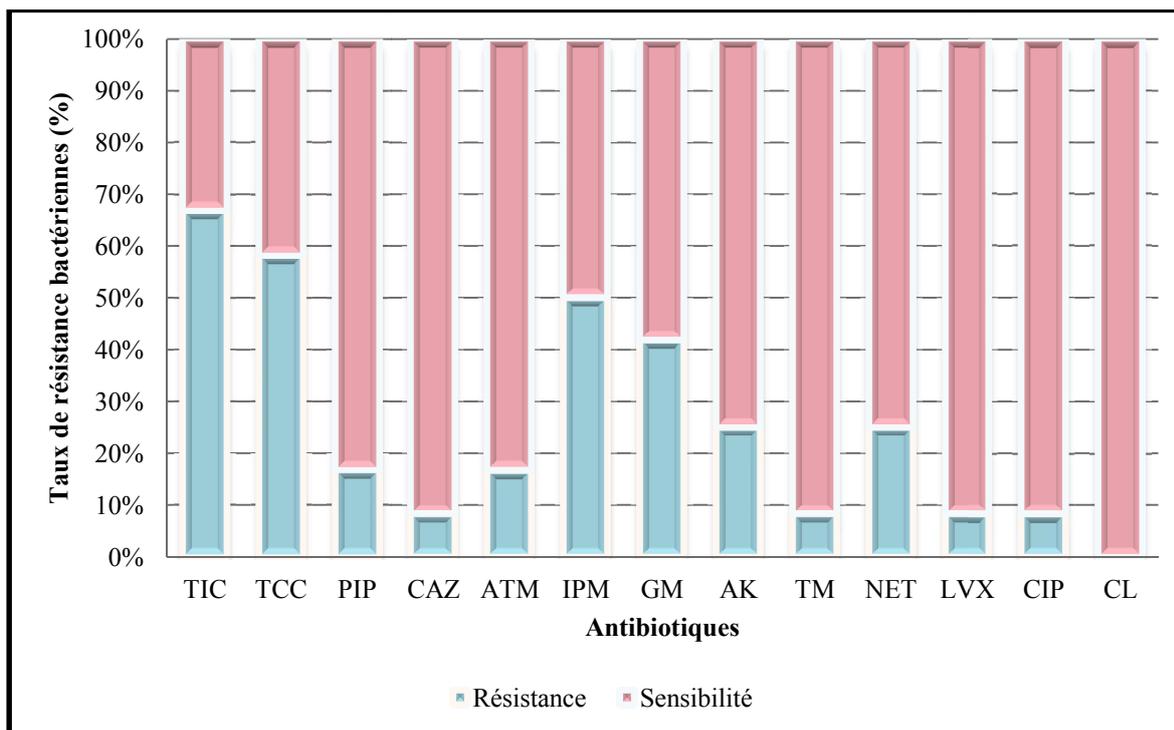
Dans une étude faite au Maroc en 2007, 67 % des souches d'*Acinetobacter* sont résistantes à la céftazidime et à la ciprofloxacine (Jellab et al., 2007).

Grati et al, (2005) rapportent que les souches d'*Acinetobacter baumannii* sont résistantes à 75% au Ticarcilline, 87.5% au Ceftazidime, 12.5% à l'Imépenime, 87.5 % au Gentamycine, 50% à l'Amikacine et 87.5% au Cirpofloxacine.

### ***II.3.1.2-Pseudomonas aeruginosa***

Au cours de notre étude nous avons trouvés que *P.aeruginosa* est résistant dans 53.8% à la Ticarcilline + Acide clavulanique, 61.5% à la Ticarcilline, 46.2% à l'imipenème, 38.5% à la Gentamycine, 23% à la Nétilmicine et à l'Amikacine, 15.4 % à l'Aztréonam et 7.7% à la Céftazidime , à la Ciprofloxacine et à la Lévofloxacine.

Ces résultats sont illustrés par la figure 21.



**Figure 21 :** Profil de résistance aux antibiotiques de *P. aeruginosa*.

D'après **Grati et al, (2005)** *Pseudomonas aeruginosa* était résistant 35.28% des cas à la Gentamycine, 31.4% à la Ticarcilline, 39.4% à la Ciprofloxacine , 11.1% à la ceftazidime , 5.88% à l'imipénème et à l'amikacine.

### II.3.1.3-Entérobactérie

- *Klebsiella pneumoniae* :

Le profil de résistance des quatre souches de *K. pneumoniae* aux antibiotiques est représenté dans le tableau XIV.

**Tableau XIV.** Profil de résistance aux antibiotiques de *K. pneumoniae*

ATB	AMC	CZ	CTX	CAZ	FOX	IMP	GM	AK	NA	CIP	CL	SXT	FF
<b>R</b>	3 / 4	1/4	1/4	2/ 4	0/4	0/4	1/4	1/4	2/4	2/4	0/4	2/4	1/4

**NB :** *K. pneumoniae* est naturellement résistante à l'ampicilline.

Dans l'étude de **Grati et al (2005)**, les souches de *K. pneumoniae* étaient de nombre de 4, avec un pourcentage de résistance de 50% pour l'Amoxicilline associée à l'acide clavulanique, la céftazidime, et la Gentamycine et 25% pour l'Amikacine.

- ***Enterobacter cloacae***

Sur les deux souches isolées, une souche d'*E. cloacae* est résistante aux céfotaxime, l'autre souche comporte le profil sauvage. Le profil de résistance aux antibiotiques des deux souches d'*E. cloacae* est représenté par le tableau XV.

**Tableau XV.** Profil de résistance aux antibiotiques d'*Enterobacter cloacae*

ATB	CTX	IMP	GM	AK	NA	CIP	CL	SXT	FF
R	1/2	1/2	1/2	1/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2

Dans une étude rétrospective, réalisée sur une période de quatre ans, dans le service de réanimation, hôpital militaire, Rabat, Maroc, Les isolats d'*Entorobacter cloacae* sont résistants à 60% à la céfotaxime, 43.7% à la gentamicine, 16.6% à l'amikacine, 22% à la nétilmicine, 15% à la ciprofloxacine et 50% aux sulfaméthoxazole–triméthoprime (Elouennass et al., 2007).

- ***Serratia marsecens*** : présente des résistances naturelles aux antibiotiques à savoir (ampicilline, amoxicilline + acide clavulanique, céfazoline, colistine et furanes).

D'après l'étude faite dans le CHU de Nîmes, France de 2002-2006, les taux de résistance de *Serratia marsecens* sont : 14% pour l'amikacine, 2% pour la gentamycine, 10% pour la ciprofloxacine, 11 % pour le cotrimoxazole (SXT) (et 14% pour la ceftazidime (CAZ) (Minchella et al.,2008)

#### ***II.3.1.4-Haemophilus influenzae***

Dans notre étude nous avons trouvé une souche d'*Haemophilus influenzae* résistante à l'ampicilline par la production d'une  $\beta$ -lactamase.

En France en 2004, 40% des souches d'*Haemophilus influenzae*, isolées de prélèvements bronchiques sont résistantes à l'ampicilline,16,5 % pour le cotrimoxazole, 2,3 % pour la tétracycline, 0,6 % pour la rifampicine, et 21,8 % pour la kanamycine (Varona et Houssaye.2006).

#### ***II.3.1.5-Burkholderia cepacia***

La souche isolée présente une résistance naturelle aux antibiotiques (la colistine et l'imipénème).

## II.3.2- Résistance des CGN aux différents antibiotiques

### II.3.2.1- *Staphylococcus aureus*

Nous avons trouvé que les quatre souches isolées sont résistantes à la Pénicilline, parmi ces quatre souches, une d'entre elles présente une résistance à la Tétracycline et l'Oxacilline. Le profil de résistances aux bactéries est représenté par le tableau XVI.

**Tableau XVI.** Profil de résistance aux antibiotiques de *S. aureus*

ATB	P	OX	Fox	GM	K	AK	E	TEC	FOX
R	4/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
ATB	CIP	LVX	SXT	RA	TE	C	PT	FA	CIP
R	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4

Selon l'étude de **Bernard et al (2007)**, les souches de *S. aureus* isolées, étaient résistantes à la pénicilline avec un taux de 86 %, à l'érythromycine 32 %, à la ciprofloxacine 9,3 %, à la tétracycline 5,8 %, à l'oxacilline 5,8 % (représentant les souches SARM), à l'acide fusidique 4,4 %, à la clindamycine 3,4 % et à la gentamycine 0,5 %.

### II.3.2.2- *Streptococcus pneumoniae*

La souche isolée présenter une résistance à l'Erythromycine et à la Clindamycine et elle est sensible aux différentes  $\beta$ -lactamines.

En 2001 à l'Île de France, 637 souches cliniques de pneumocoque ont été étudiées à partir de 32 laboratoires de microbiologie. Parmi ces souches, 21,8 % sont résistantes à la pénicilline, 63 % à l'érythromycine, 47 % au cotrimoxazole, 40 % à la tétracycline et 23 % au chloramphenicol. Avec une sensibilité diminuée à l'amoxicilline et au céfotaxime concerne respectivement 38 et 17 % des souches. Les souches résistantes à ces deux molécules (CMI > 2 mg/l) sont rares 2,6 et 0,4 % respectivement (**Demachy et al., 2004**).

## Conclusion

Au terme de cette étude microbiologique, il ressort que les infections respiratoires sont fréquentes, parmi les 113 prélèvements 62 ont une culture positive. Les pneumopathies nosocomiales représentent une cause très importante de morbidité par l'augmentation de la durée d'hospitalisation en réanimation et de la ventilation.

Le traitement se base sur l'antibiothérapie probabiliste à large spectre, avec désescalade thérapeutique après les résultats de l'antibiogramme

Les agents responsables de ces pneumopathies nosocomiales sont représentés majoritairement par des bactéries (74%). Les bacilles à Gram négatif (BGN) sont le plus fréquemment isolés (90%) avec une prédominance d'*Acinetobacter baumannii* (47%), les Cocci à Gram Positif (CGP) viennent en 2<sup>ème</sup> position (10%) représentés essentiellement par *S. aureus* (8%).

Cette approche nous a permis de constater une résistance des différentes bactéries aux antibiotiques, avec une résistance presque totale des isolas d'*A. baumannii* aux antibiotiques.

Actuellement, la tendance générale est de promouvoir la prévention pour réduire cette morbi-mortalité induite par la pneumopathie nosocomiale qui est au moins en partie évitable par des mesures de prévention. Une connaissance des facteurs et des situations à risque ainsi que des moyens de prévention de ces risques est donc indispensable.

### Prévention des pneumopathies nosocomiales

La prévention du risque infectieux peut être divisée en deux champs d'action :

- Prévention du risque infectieux exogène, qui vise à éviter la contamination par des germes venant de l'environnement :

- Lavage des mains à l'aide de solutions hydro-alcooliques,
- Isolement des patients porteurs de bactéries multi résistantes,
- Désinfection du matériel de ventilation selon des protocoles écrits,
- Utilisation d'eau stérile dans les humidificateurs;
- Surveillance de l'écologie microbienne locale incluant la disponibilité rapide des données de multi-résistance bactérienne
- Surveillance et le retrait dès que possible des dispositifs invasifs et l'implantation de programmes visant à limiter la prescription anarchique des antibiotiques

- Prévention du risque infectieux endogène, dû essentiellement à l'inhalation de sécrétions hyperseptiques provenant de l'estomac, de l'oropharynx, de la région située au-dessus du ballonnet :

- La Position semi-assise des patients placés en nutrition entérale,

- Sédation profonde et curarisation ne doivent être utilisées qu'après mûre réflexion,

- Prévention des ulcères de stress

- Prévention de la colonisation des voies aériennes inférieures passe par les aspirations bronchiques selon la technique "no touch" ("sans contact"), effectuées seulement à la demande, en fonction de l'état d'encombrement.

- Changement régulier des canules de trachéotomie, dans des conditions d'asepsie strictes.

- Antibioprophylaxie systémique dans la prévention des pneumopathies nosocomiales n'a pas montré d'efficacité. L'utilisation d'aérosols ou d'instillations locales s'accompagne d'une augmentation nette de la résistance aux antibiotiques utilisés. L'utilisation de la rotation d'antibiotiques pourrait être proposée.

- Décontamination digestive sélective reste très controversée

- Chez les patients opérés, la prévention préopératoire passe par l'information, l'arrêt du tabac au moins quinze jours avant l'intervention,

- Utilisation d'une kinésithérapie chez les malades porteurs d'une maladie respiratoire chronique.

- En peropératoire, la prévention passe par l'utilisation de sondes d'intubation stériles, l'humidification des voies aériennes pendant toute l'intervention, l'extubation du malade après récupération d'une conscience parfaite.

- En postopératoire, on emploie la kinésithérapie respiratoire, une prise en charge de la douleur qui est source d'atélectasie et un lever le plus précoce possible.

## Références bibliographiques

- **Astagneau P., Ancelle T. 2011.** Surveillance épidémiologique: Principes, méthodes et applications en santé publique. Edition Lavoisier. 360P.
- **Aubier M., Fournier M., Crestani B., Mal H. 2009.** Traité de pneumologie - 2<sup>e</sup> édition Lavoisier. 1139P
- **Baroud M.D., Touz E., Tassou F., Derrienic M., Potel G. 2005.** L'infection hospitalière à Staphylocoque en milieu chirurgical. IN : L'infection en réanimation. Edit Masson. 1 : pp 3-7.
- **Ben romdhane F., Bouguerra Ch., Sahnoun O. 2007.** Les bactéries multirésistantes isolées chez les malades hospitalisés dans un service de maladies infectieuses. RevT unInfectiol. 1 : pp 2-15.  
Bercault 2011 .pneumopathie nosocomiales.58P
- **Bernard P., Jarlier V., Santerre-Henriksen E. 2007.** Sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* responsables d'infections cutanées communautaires Annales de Dermatologie et de Vénérologie. 135(1) pp 13-19.
- **Blel Y., Maamouri H., Aymen M., Kouraichi N., Fathallah I., Amina B.A., Lakhthar D., Brahmi N., Amamou M. 2015.** Pneumopathie acquise sous ventilation mécanique : Étude épidémiologique, clinique et pronostique. . SRLF et Lavoisier SAS .EP072
- **Bougle A., Mira J.P. Duranteau J. 2014.** Le livre de l'interne en réanimation. Edition Lavoisier. 784P.
- **Boydjiev I., Leone M., Garnier F., Albanese J., Martin C. 2006.** Prise en charge des pneumonies acquises sous ventilation mécanique. Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation .pp761–772.
- **Brenner D. J., Krieg N.R., Staley J.T., Garrity G.M. 2005.** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition, (The Proteobacteria), part B (The Gammaproteobacteria). Springer-Verlag.
- **Brunner L.S., Smeltze S., Bare B., Suddarth D.S. 2011.** Soins infirmiers en médecine et chirurgie 2: Fonctions respiratoire, cardiovasculaire et hématologique. Edition De Boeck Supérieur. 760p.
- **CCLIN Sud-Ouest. 2001.** Rapport sur l'enquête d'incidence des infections nosocomiales en réanimation.

- **Charbonneau P., Wolff M. 2013.** Infectiologie en réanimation. Springer Science & Business Media. 529P.
- **Charbonneau P., Wolff M. 2013.** Infectiologie en réanimation. Springer Science & Business Media. 529 P.
- **Chastre J., Fagon J.Y.2002.** Ventilator-associated pneumonia. Am J Respir Crit Care Med. 165: pp 867-903
- **Cheung AL., Bayer AS., Zhang G., Gresham H., Xiong YQ. 2004.** Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. FEMS Immunol Med Microbiol. 40 : pp 1-9.
- **Clavier T., Lefevre-Scelles A., Veber B. 2014.** Les infections à levures en réanimation. Le Congrès Médecins. Conférence d'Actualisation. Sfar.20P
- **Cohen J., Brun-Buisson C., Torres A., Jorgensen J. 2004.** Diagnosis of infection in sepsis: an evidence-based review. Crit Care Med.32 : pp 466-494.
- **Constantina J.M., Leone M., Jaber S., Allaouchiche B., Orban C., Cannesson M., Fourcade O., Morel J., Martin C., Lefrant J.Y. 2010.** Quelle activité et quels personnels soignants dans 66 unités de réanimation du sud de la France. Annales Françaises d'Anesthésie et Réanimation. 29 : pp 512-517.
- **Dabernat H., Samson M.J. 1990.** Haemophilus in : Bactériologie médicale. Ed. Flammarion Médecine-Sciences Paris. pp-533
- **Delmas V., Brémond-Gignac D.2008.** Anatomie générale. Edition Elsevier.323P.
- **Delves P., Roitt I. 2002.** The immune system. Second of two parts. The New England Journal of Medicine. 343 : 37-49.
- **Demachy M.C., Faibis F., Artigou A., Benoit C. 2002.** Épidémiologie et résistance aux antibiotiques de *Streptococcus pneumoniae* en Île de France en 2001. Médecine et maladies infectieuses. 34 : pp 303–309.
- **Descheemaeker P.N., Geffroy A., Kipins E., Remy J., Tonnelier M.2009.** Prévention des infections nosocomiales en réanimation (transmission croisée et nouveau-né exclu).Edition Elsevier Masson. Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation. pp912–920.
- **Diekema D.J., PFALLER M.A., Schmitz F.J., Smayevsky J., Bell J., Jones R.N. 1997.** Enquête sur les infections à *Staphylococcus*: Fréquence d'occurrence et Susceptibilité antimicrobienne des isolats recueillis aux États-Unis, au Canada, en Amérique latine, en Europe et dans la région du Pacifique occidental pour le programme de la surveillance antimicrobienne.. Clin Infect Dis. 32 : pp 114-32.

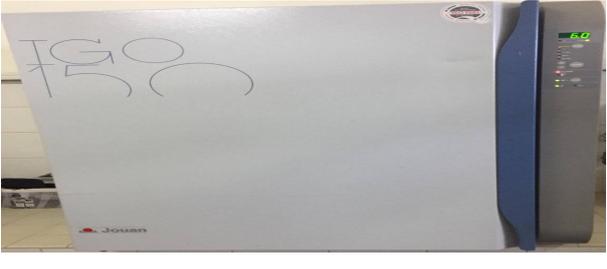
- **Donati S.Y et Papazian L. 2008.** Pneumopathies nosocomiales acquises sous ventilation mécanique. EMC. 5 : pp 1-16.
- **Douah A., Atbi F., Moussaoui A.2015.** Écologie bactérienne et résistances des pneumopathies acquises sous ventilation mécanique en réanimation polyvalente. SRLF et Lavoisier SAS. EP071
- **Ducel G., Fabry J., Nicolle L. 2008.** Prévention des infections nosocomiales. Guide pratique. 2e édition. Organisation mondiale de la Santé.71P.
- **Dupont H.2011.** Pneumopathies nosocomiales quelles sont les nouveautés. Inserm. 36P.
- **Dupont S.2015.** L'anatomie et la physiologie pour les infirmier(e)s. Edition Elsevier. 376P.
- **Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. 2006.** The Prokaryotes. (Proteobacteria: Gamma Subclass). 3rd edition Springer-Verlag. 919P.
- **Elouennass M., Sahnoun I., Zrara A., Bajjou T., Elhamzaoui S. 2007.**Épidémiologie et profil de sensibilité des isolats d'hémoculture dans un service de réanimation (2002–2005).Elsevier Masson SAS pp 0399-077.
- **Eyquem A., Alouf J., Montagnier L. 2000.** Traité de microbiologie clinique : Deuxièmes mises à jour et compléments. 43P.
- **Ezzouine H., Harbouze N., Benslam A. 2014.** Pneumopathies nosocomiales chez les patients séjournant au long cours en réanimation : caractéristiques cliniques et bactériologiques. Posters. Médecine et maladies infectieuses.Revue des Maladies Respiratoires. 34 : pp36-40.
- **Fangio P., Rouquette-Vincenti I., Rousseau J.M., Soullié B., Brinquin L.2002.** Diagnostic non invasif des pneumopathies nosocomiales acquises sous ventilation mécanique : comparaison entre le prélèvement distal protégé et l'aspiration endotrachéale . Éditions scientifiques et médicales Elsevier Masson. pp184-92.
- **Fartoukh M., Richard J-D. 2009.** ; Pneumonies nosocomiales : aspects pratiques de la prise en charge Rev Mal R espir.
- **Flandrois J.P., 2000.** Bactériologie médicale. Presses Universitaires.309P
- **Gaddy J.A., Actis L.A. 2009.** Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. Future Microbiol.4 : pp273–8.
- **Gayraud M., Lortholary O. 2006.** Maladies infectieuses/VIH: Soins infirmiers. Edition MASSON Paris. 268P

- **Girault C. 2005.** Ventilation non invasive et insuffisance respiratoire aiguë. **Revue des Maladies Respiratoires**.22 : pp 159-166
- **Girault C., Tamion F., Beduneau G. 2006.** Évaluation des soins et pneumopathies nosocomiales en réanimation. *Revue des maladies respiratoires*. 23 : pp 27-43.
- **Grati L., Louzi M., Mansalli L., Ben Nasr K., Zili N., Ben Salem F., Gabbiche M. 2005.** Les pneumopathies nosocomiales en réanimation chirurgicale. Une année de surveillance portant sur 305 patients.8. 26P.
- **Guillou M.L., Bergogne-Bérézin E.2006.** Les bactéries du genre *Acinetobacter* revisitées : leur importance actuelle. *Antibiotiques*.8. 93P
- **Hygis N. 1998.** Hygiène hospitalière .Presses Universitaires. 666 P.
- **Jaton K., Schrenzel J., Greub G.2014.** Diagnostic microbiologique de la pneumonie. *Rev Med Suisse*.10 : pp 2126-2129.
- **Jellab B., Hanafi Y., Maliki O., Amtoune A., Kamili R., Samkaoui M.A.2007.** Profil bactériologique et pronostic des pneumopathies nosocomiales en réanimation. Edition Elsevier Masson SAS. 1 : pp 109.350.
- **Jeuge-Maynard I., CaronA., Trouvelot M.H. 2010.** Le petit Larousse de la Médecine. Édition Larousse. 1149P.
- **Kang CI., Kim S.H., Park W.B., Lee K.D., Kim H.B., Kim E.C., Oh M.D, Choe K.W.2005.** Risk factors for antimicrobial resistance and influence of resistance on mortality in patients with bloodstream infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist*. 11 pp 68-74.
- **Kollef M.H.1999.** The prevention of ventilator associated pneumonia. *N. Engl J.Med* . 340: pp 627-34
- **Le Bourgeois M., Vrielynck S. 2005.** Infection bronchopulmonaire dans la mucoviscidose. *Médecine Thérapeutique/ Pédiatrie*. 8 : pp 157-81.
- **Leal-Noval S., Marquez – Vacaro J., Curiel A.G., Camacho-Larana P .2000.** Nosocomial pneumonia in patients undergoing heart surgery . *Crit Care Med*. 28 : pp 935-40.
- **Lowy FD. 2003.** Résistance aux antibiotiques : Exemple de *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* pp 1265-1273.
- **M'Rad A., Brahmi N., Fathallah I., Sedghiani I, Blel Y., Kouraichi N., El Ghord H., Thabet H., Amamou M.2013.** Profil bactériologique des pneumopathies précocesacquises sous ventilation mécanique.EP15. 23 : pp 214-217
- **Maitre B.S., Valeyre D.2013.** Pneumologie. (Coll. Le livre de l'interne).Edition Lavoisier.491P.

- **Maoulainine F.M.R., Elidrissi N.S., Chkil G., Abba F., Sorra N., Chabaa L., Amine M., Abousad A.2014.** Epidémiologie de l'infection nosocomiale bactérienne dans un service de réanimation néonatal marocain Archives de Pédiatrie .21 :pp 938-943.
- **Mesáros N., Nordmann P., Plesiat P., Roussel-Delvallez M., Van E.J., Glupczynski Y .2007.** *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. Clin Microbiol Infect : 13 pp 560-578.
- **Minchella A., Molinari L., Defez Fougeron C., Lavigne J.P., Sotto A., Bouziges N.2008.** Évolution de la résistance aux antibiotiques de *Serratia marcescens*, *Providencia stuartii* et *Morganella morganii* au CHU de Nîmes : 2002-2006. Médecine et maladies infectieuses .38.S149.F07
- **Montani D., Tcherakian C.2009.** Pneumologie. Elsevier Masson, 2<sup>e</sup> édition.389P.
- **Nauciel C., Vildé J.L. 2005.** Bactériologie médicale. Édition MASSON 2<sup>ème</sup> édition Paris. 257P.
- **Pasche A., Fitting J.W., Nicod L.P, Braunschweig R.2012.** Utilité clinique du lavage bronchoalvéolaire.Rev Med Suisse. 8 : pp2212-2218
- **Peter V. 2009.** Identification des bactéries Burkholderia cepacia. Medical Scientific. 29 : pp65-69.
- **Philippart F., Max A., Couzigou C., Misset B.2012.** Réanimation et prévention des infections nosocomiales. EMC - Anesthésie-Réanimation. 9 : pp1-12.
- **Pittet D., Sax H. 2000** .Alerte rouge: staphylocoques dorés de sensibilité diminuée à la vancomycine. Genève. (7)
- **Rahal K., Benslimani A., Tali-Maamar H., Missoum M.k., Aboun A., Ammari H.2014.** Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale ( médecine humaine et vétérinaire). 7em édition.178P.
- **Richard 2005.** Génomique fonctionnelle in vivo de l'oxydoréductase PA 3498 chez *Pseudomonas aeruginosa*. Maitrise en microbiologie-immunologie.
- **Roquilly A., Asehnoune K.2013.**PAVM: doit-on suivre les recommandations de l'Ats .pp 163-173.
- **Schaechter , Medoff, Eisenstein. 1999.** Microbiologie et pathologie infectieuse. Bruxelles .De Boeck. 1999
- **SFM 2015.** Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.Version 2.0.
- **Sougakoff W., TrystramD.2003.** Résistance aux  $\beta$ -lactamines. Université Pierre et Marie Curie. Faculté de médecine. 59P.

- **Speert.D.2002.** Infections au complexe Burkholderia cepacia chez les patients atteints de fibrose kystique - Questions les plus souvent posées. Fondation canadienne de la fibrose Kystique.
- **Torres A. 1990** Incidence, RISK and prognosis factors of nosocomial pneumonai in mechanically ventilated patients. Am Rev Respir Dis.142 : pp523-8.
- **Trouillet J.L., Chastre J. 2000.** Pneumopathies nosocomiales: Étiologies microbiennes et impact thérapeutique. Revue : Antibiotiques. 2 : pp 95-100.
- **Varona E., HoussayeS.2006.** Résistance des agents infectieux impliqués dans les infections des voies respiratoires basses en France. Elsevier Masson SAS. Médecine et maladies infectieuses. 36 : pp 555–569.
- **Vincent JL., Abraham E., F. Moore A. 2011.**Prevention and Control of Nosocomial Pneumonia Saunders Sixth edition.
- **Walsh T.R., Howe R.A. 2002.** Prévalence et les mécanismes de la résistance à la vancomycine chez Staphylococcus aureus..Annu Rev Microbiol. 56 : pp 657-675.
- **Wendt C., Dietze B., Dietz E. 1997.** Survival of Acinetobacter baumannii on dry surfaces. J. Clin. Microbiol. 35: pp 1394-1397.
- **Wylie J.L., Nowicki B.L. 2005.**Épidémiologie moléculaire communautaire et soins de santé de Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline au Manitoba, Canada. J. Clin. Microbiol. June.43: pp 2830-2836.
- **Zegmout A., Balkhi H., Souhi H., El Ouazzani H., Rhorfi A., Abid A. 2016.** Pneumopathies nosocomiales en réanimation : caractéristiques cliniques, biologiques et bactériologiques. A96. pp198.

## Annexe 1 : Matériels non biologiques

Appareillage	
	
<b>Figure 22 : Vortex</b>	<b>Figure 23 : Densitomètre</b>
	
<b>Figure 24 : Étuve</b>	<b>Figure 25 : Étuve à CO<sub>2</sub></b>
	
<b>Figure 26 : Autoclave</b>	<b>Figure 27 : Bain-marie</b>

<b>Matériel utilisé</b>	
Pipettes Pasteur, lame, lamelle, tube à vis, Anse de platine, gants, compresse, pince bactériologique, papier filtre, huile d'immersion, portoir, écouvillon, pied à coulisse, différents systèmes API	
<b>Milieu de culture</b>	
<b>Solide</b>	<b>Liquide</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gélose au sang frais;</li> <li>-Gélose au sang cuit ; <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hektoen ;</li> <li>- Mueller Hinton ;</li> <li>-TSI ;</li> </ul> </li> <li>-Mannitol-mobilité ;</li> <li>-MEVAG.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Bouillon glucosé tamponné</li> <li>-Bouillon nitraté</li> <li>-Sérum de lapin;</li> <li>-Urée</li> </ul>
<b>Réactifs de révélation</b>	
VP1, VP2, ZYM A, ZYM B , NIT1, NIT2, James, TDA, NIN,H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , disque d'optochine, N diméthyl paraphénylène diamine, sérum d'agglutination, huile de paraffine, Violet de gentiane, Lugol, Alcool à 95°, fuchsine	

**Annexe 2 : Fiche de renseignement**

**Centre Hospitalo-universitaire de beni- Messous**

**Hôpital ISSAD HASSANI**

**SERVIVE DE :**

NOM : ..... Prénom : ..... Sexe : .....

Age : .....

Nature du /des prélèvements : .....

Nombre : .....

Date : .....

Heurs : .....

Diagnostic suspecté ou signes cliniques :

.....

---

Traitement éventuel :

Oui

Non

Si oui lequel ?

Examens demandés

▪

▪

▪

▪

▪

▪

Non du médecin .....

### Annexe3 : Méthode d'ensemencement (quatre quadrants)

La méthode d'ensemencement en quatre quadrants est la méthode de référence pour la plupart des prélèvements en microbiologie. Elle permet à la fois une estimation semi-quantitative du nombre de bactéries contenues dans un prélèvement et l'obtention de colonies isolées.

#### Technique

La boîte de Pétri est divisée en quatre parties figure 28

A l'aide d'une anse de platine stérilisée au bec bunsen, un échantillon du prélèvement est prélevé et déposé près du bord dans la partie une 1 de la boîte, l'étalement de ce dépôt est réalisé par des stries serrées dans un mouvement de va-et-vient, en prenant soin de ne pas traverser, creuser ou arracher le milieu.

Pour les autres secteurs de la boîte : 2,3 et 4, nous effectuons le même mouvement de stries, en prenant soin de ne pas repasser sur l'extrémité des dernières stries effectuées dans les parties précédentes.

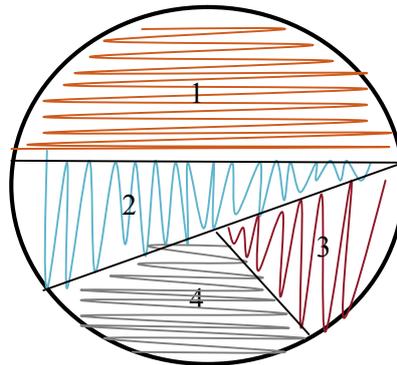


Figure28 : Technique d'ensemencement

## Annexe 4 : coloration de Gram

La coloration de Gram (mise au point par Christian Gram) est la méthode de coloration la plus utilisée en bactériologie médicale; c'est une coloration double qui permet de colorer les bactéries et de les distinguer à l'examen direct par leur forme et leur aptitude à fixer le violet de gentiane (Gram +) ou la fuschine (Gram -). L'intérêt de cette coloration est de donner une information rapide et médicalement importante

### Technique

#### Réalisation d'un frottis

-En utilisant une pipete Pasteur stérilisée, une colonie est étalée en mouvement circulaire dans goutte d'eau préalablement déposée au centre d'une lame, Le frottis doit être mince et homogène.

-La lame est séchée à la température du laboratoire, puis fixée par la chaleur en le passant lenetement (3 à 4 fois de suite) au dessus de la flamme du bec bunsen.

-La coloration est effectuée une fois la lame est refroidit.

#### Coloration

Tableau XVII : Étapes de la coloration Gram

ETAPES	MODE OPERATOIRE	TEMPS	PRINCIPE
<b>COLORATION PRIMAIRE</b>	- Recouvrir la lame de violet de gentiane - Rincer à l'eau distillée	1 minute	Le colorant violet pénètre dans les cellules bactériennes
<b>MORDANÇAGE</b>	- Recouvrir de Lugol - Rincer à l'eau distillée et l'égoutter	30 secondes	Il se forme un complexe chimique entre le violet et le Lugol qui fixe le violet et colore le cytoplasme de toutes les bactéries en violet.
<b>DÉCOLORATION</b>	- Tenir la lame inclinée et faire couler pendant quelques secondes de l'alcool à 95° jusqu'à écoulement incolore. - Rincer immédiatement à l'eau distillée et égoutter	5 secondes environ	L'alcool dissout le violet de gentiane, si la paroi bactérienne est perméable à l'alcool (les lipides sont dissous par l'alcool), celui-ci pénètre dans les bactéries et décolore leur cytoplasme : les bactéries deviennent incolores. Si les bactéries ont une paroi imperméable à l'alcool (épaisse et sans lipides), elles restent colorées en violet et elles sont dites GRAM +.
<b>COLORATION SECONDAIRE</b>	- Recouvrir la lame de fuschine - Rincer à l'eau distillée	20-40 secondes	La fuschine recolore en rose les bactéries précédemment décolorées : les bactéries Gram -.
<b>SÉCHAGE</b>	- mettre la lame dans un séchoir et laisser sécher		

**Annexe 5 : Tables de lecture****Table de lecture 1 : valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour  
Entérobactéries**

Antibiotiques testés	Charge des disques en (µg)	Diamètres critiques en (mm)		
		R	I	S
Ampicilline	10	≤13	14-16	≥17
Amoxicilline + Ac clavulinique	20/10	≤13	14-17	≥18
Céfazoline	30	≤19	20-22	≥23
Cefoxitine	30	≤14	15-17	≥18
Céfotaxime	30	≤22	23-25	≥26
Imipenème	10	≤19	20-22	≥23
Amikacine	30	≤14	15-16	≥17
Gentamicine	10	≤12	13-14	≥15
Ac nalidixique	30	≤13	14-18	≥19
Ciprofloxacine	5	≤15	16-20	≥21
Chloramphénicol	30	≤12	13-17	≥18
Furanes	300	≤14	15-16	≥17
Triméthoprime + Sulfaméthoxazole	1.25/23.75	≤10	11-15	≥16

**Table de lecture 2:** valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour *Pseudomonas aeruginosa*

Antibiotiques testés	Charge des disques en (µg)	Diamètres critiques en (mm)		
		R	I	S
Ticarcilline	75	≤15	16-23	≥24
Ticarcilline + Ac clavulinique	75/10	≤15	16-23	≥24
Pipéracilline	100	≤14	15-20	≥21
Céftazidime	30	≤14	15-17	≥18
Aztréonam	30	≤15	16-21	≥22
Imipénème	10	≤15	16-18	≥19
Amikacine	30	≤14	15-16	≥17
Gentamicine	10	≤12	13-14	≥15
Nétilmécine	30	≤12	13-14	≥15
Tobramycine	10	≤12	13-14	≥15
Ciprofloxacine	5	≤15	16-20	≥21
Lévofloxacine	5	≤13	14-16	≥17
Colistine	10	≤10	-	≥11

**Table de lecture 3:** valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour *Acinetobacter spp*

Antibiotiques testés	Charge des disques en (µg)	Diamètres critiques en (mm)		
		R	I	S
Ticarcilline	75	≤14	15-19	≥20
Ticarcilline + Ac clavulinique	75/10	≤14	15-19	≥20
Pipéracilline	100	≤17	18-20	≥21
Céftazidime	30	≤14	15-17	≥18
Imipenème	10	≤18	19-21	≥22
Amikacine	30	≤14	15-16	≥17
Gentamicine	10	≤12	13-14	≥15
Tobramycine	10	≤12	13-14	≥15
Ciprofloxacine	5	≤15	16-20	≥21
Lévofloxacine	5	≤13	14-16	≥17
Doxycycline	30	≤9	10-12	≥13
Triméthoprime + Sulfaméthoxazole	1.25/23.75	≤10	11-15	≥16

**Table de lecture 4:** valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour  
*Staphylococcus spp*

Antibiotiques testés	Charge des disques en (µg)	Diamètres critiques en (mm)		
		R	I	S
Pénicilline G	10 UI	≤28	-	≥29
Céfoxitine	30	≤21	-	≥22
Gentamicine	10	≤12	13-14	≥15
Kanamycine	30	≤13	13-17	≥18
Amikacine	30	≤14	15-16	≥17
Erythromycine	15	≤13	14-22	≥23
Clindamycine	2	≤14	15-20	≥21
Teicoplanine	30	≤10	11-13	≥14
Ofloxacine	5	≤14	15-17	≥18
Ciprofloxacine	5	≤15	16-20	≥21
Lévofloxacine	5	≤15	16-20	≥21
Triméthoprime + Sulfaméthoxazole	1.25/23.75	≤10	11-15	≥16
Rifampicine	5	≤15	16-19	≥20
Tétracycline	30	≤14	15-18	≥19
Chloramphénicol	30	≤12	13-17	≥18
Quinupristine-delphopréistine	15	≤15	16-18	≥19
Ac fusidique	10	≤24	-	≥24

**Table de lecture 5:** valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour *Heamophilus spp.*

Antibiotiques testés	Charge des disques en (µg)	Diamètres critiques en (mm)		
		R	I	S
Ampicilline	10	≤18	19-21	≥22
Amoxicilline + Ac clavulinique	20/10	≤19	-	≥20
Céfotaxime	30	-	-	≥26
Ac nalidixique	30	-	-	≥23
Ciprofloxacine	5	-	-	≥21
Lévofloxacine	5	-	-	≥17
Azithromycine	15	-	-	≥12
Chloramphénicol	30	≤25	26-28	≥29
Tétracycline	30	≤25	26-28	≥29
Rifampicine	5	≤16	17-19	≥20
Triméthoprim + Sulfaméthoxazole	1.25/23.75	≤10	11-15	≥16

**Table de lecture 6:** valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour *Streptococcus pneumoniae*

Antibiotiques testés	Charge des disques en (µg)	Diamètres critiques en (mm)			Valeurs critiques CMI (µg/ml)		
		R	I	S	R	I	S
Pénicilline parentérale Pénicilline orale	CMI	-	-	-	≥8 ≥2	4 0.12-1	≤2 ≤0.06
Amoxicilline	CMI	-	-	-	≥8	4	≤2
Céfotaxime	CMI	-	-	-	≥4	2	≤1
Imipenème	CMI	-	-	-	≥1	0.25-0.5	≤0.12
Vancomycine	30	-	-	≥17	-	-	-
Erythromycine	15	≤15	16-20	≥21	-	-	-
Clindamycine	2	≤15	16-18	≥19	-	-	-
Lévoflaxine	5	≤13	14-16	≥17	-	-	-
Chloramphénicol	30	≤20	-	≥21	-	-	-
Rifampicine	5	≤16	17-18	≥19	-	-	-
Triméthoprim + Sulfaméthoxazole	1.25/23.75	≤15	16-18	≥19	-	-	-
Quinupristine-delfopréstine	15	≤15	16-18	≥19	-	-	-