



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche scientifique



Université Blida 1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Filière Sciences Biologiques  
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

**Option :** Microbiologie-Bactériologie

**Thème :**

**Identification et profil de résistance des bactéries autre que les  
*Enterobacteriaceae* isolées des effluents hospitaliers**

Présenté par :

**Soutenu le :** 29 /06/2016

**Melle HAMMADI Khedidja  
Mr SEBSI Abderrahmane**

Devant le jury :

Mme. BOKRETA S. MAB , Université Blida 1  
Mme. HAMAIDI F. MCA , Université Blida 1  
Mme. MEKLAT A. MCA , Université Blida 1  
Mr. KAIS H. MA , Université Blida 1

**Présidente  
Promotrice  
Examinatrice  
Co-promoteur**

*Année Universitaire : 2015-2016*

## Remerciements

Nous aimerions en premier lieu remercier notre dieu Allah qui nous a donné la volonté et le courage pour la réalisation de ce travail.

### À notre promotrice, Mme Hamaidi Fella

Nous avons eu l'honneur d'être parmi vos étudiants et de bénéficier de votre riche enseignement. Vos qualités pédagogiques et humaines sont pour nous un modèle. Votre gentillesse, et votre disponibilité permanente ont toujours suscité notre admiration. Veuillez bien Madame recevoir nos remerciements pour le grand honneur que vous nous avez fait d'accepter l'encadrement de ce travail.

### À notre co-promoteur Mr Kais Hichem

Votre compétence, a toujours suscité notre profond respect. Nous vous remercions pour votre accueil et vos conseils. Veuillez trouver ici, l'expression de mes gratitudee et de notre grande estime.

Nous adressons nos sincères remerciements à **Mme Bokrita** de nous avoir fait l'honneur de présider le jury examinant ce travail.

Nous tenons à adresser nos vifs remerciements à **Mme Meklat** pour l'honneur d'examiner ce travail.

Mes profondes gratitudee s'orientent vers **Mme Afaf** pour ses judicieux conseils et son support permanent

Nous tenons à remercier vivement nos professeurs de l'USDB qui doivent voir dans ce travail la fierté d'un bien acquis

Nous tenons également à remercier l'ensemble du personnel du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida : le chef service **Mr.HMIDA,Amo Sid ali ; Mlle AHMED, ;Mme ATO ,Mlle Nawalle** et sans oublier **khalti Yamina**

Nous avons eu la chance et le plaisir de travailler en collaboration avec **Mme Nekkab selma** et **Mlle Khadidja** d'acquérir de leurs expériences et d'être parmi les bons personnel du laboratoire d'hygiène de Blida.

Nous adressons également notre reconnaissance à **Mr. TEFAHI** qui nous a acceptés faire notre stage pratique au niveau de laboratoire. Malgré ses innombrables occupations au laboratoire comme ailleurs, il nous a consacré énormément de temps, il nous a transmis une partie de son savoir avec beaucoup de patience et de rigueur. Nous lui adressons tous nos remerciements pour sa compréhension, son respect, son esprit d'aider les futurs chercheurs et surtout pour son encouragement.

Notre profonde reconnaissance à tous les responsables et l'ensemble du personnel des établissements de la santé de la Wilaya de Blida

Nous remercions aussi tout ce qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

# Dédicace

*Merci Allah (mon dieu) de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve.*

*Je dédie ce Modeste travail :*

*À l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, qui éclaire mon chemin et m'illumine de douceur et d'amour, que dieu te garde pour nous *Abi*.*

*À ma très chère *Oumi*, ma raison d'être, ma raison de vivre, en signe d'amour, de reconnaissance et de gratitude pour tous les soutiens et les sacrifices dont elle a fait à mon égard.*

*À ceux que j'aime beaucoup, qui m'ont soutenus et étaient toujours à mes côtés, mes chères sœurs : *Hafsa*, *Sarah* et *Khaoula*, et mon frère *Mohamed Salah Amine* le beau gosse de la famille, aucun mot ne pourra d'écrire vos dévouements et vos sacrifices.*

*À ma grande famille et spécialement ma grand-mère *Chérifa*, En témoignage de mon profond respect.*

*À mes merveilleuses amies : *Amina*, *Nesrine*, *Soumia* et *Farida*, et mes camarades de classe les *Microbiologistes*, En témoignage de l'amitié sincère qui nous a liées et des bons moments passés ensemble, je vous dédie ce travail en vous souhaitant un avenir radieux et plein de bonnes promesses.*

*À la personne qui a partagé tout le travail, mon binome et mon frère *Abderrahmane*.*

*Je termine avec les gens qui ont cru en moi et qui me donnent l'envie d'aller en avant, je les remercie tous. Votre soutien et vos encouragements me donnent la force de continuer in sha Allah « I See You ».*

*Khedidja H.K.*



*Je dédie ce mémoire à :*

*A mon pays l'Algérie ; et a tous les musulmans dans le monde entier*

*A Mes parents :*

*Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.*

*A mes très chers frères et ma sœur « Oussama, Mirou et Ihçane » que dieu vous assiste, à tous les membres de ma famille, petits et grands.*

*A ma binôme Khadija je te remercie pour ta patience, ta gentillesse et ton courage durant cette expérience,*

*A mes chers collègues Et à mes chères ami(e)s ; en témoignage de l'amitié qui nous uní et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail*

*A mes professeurs, qui doivent voir dans ce travail le fruit d'un savoir bien acquis*

*A Mr Teffahí et mon cher ami Fayçal*

*Abdou.*

## SOMMAIRE

Introduction .....	1
--------------------	---

### Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les effluents hospitaliers .....	2
I.1. Définition .....	2
I.2. Origine des effluents liquides hospitaliers.....	2
I.3. Menace des effluents hospitaliers .....	2
I.4. Bactéries multirésistances dans les milieux aquatiques.....	3
I.5. Bactéries multirésistances dans les effluents hospitaliers.....	3
Chapitre II : Antibiotiques et résistance aux antibiotiques .....	4
II.1. Antibiotique.....	4
II.1.1. Définition .....	4
II.1.2. Classification et mode d'action des antibiotiques .....	4
II.2. Antibiorésistance .....	5
II.2.1. Nature de d'antibiorésistance .....	5
II.2.2. Mécanismes de résistance .....	6
II.2.3. Transmission des bactéries portant des gènes de résistance .....	7
Chapitre III : Caractéristiques microbiologiques des effluents hospitaliers.....	7
III.1. Principales bactéries d'origine hydrique .....	7
III.1.1. Bactéries indicatrices de contamination fécale .....	7
III.1.2. Streptocoques fécaux ou Streptocoques du groupe D .....	7
III.1.3. <i>Clostridium Sulfito-Réducteurs</i> .....	9
III.1.4. Bactéries pathogènes pour l'homme .....	9
III.1.4.1. Staphylocoques .....	10
III.1.4.2. <i>Pseudomonas</i> .....	11
III.1.4.3. <i>Vibrio</i> .....	12
III.1.4.4. <i>Aeromonas</i> .....	13

### Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes .....	14
I.1. Description du site d'étude de prélèvement .....	14
I.2. Matériel.....	15
I.3. Méthodes .....	15
I.3.1. Echantillonnage et transport.....	15
I.3.2. Analyses bactériologiques .....	15
I.3.2.1. Dilutions .....	15
I.3.2.2. Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux .....	16
I.3.2.3. Recherche et dénombrement des <i>Clostridium sulfito-réducteurs</i> ....	20
I.3.2.4. Recherche de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	22
I.3.2.5. Recherche des Vibrions et <i>Aeromonas</i> .....	26
I.3.2.6. Recherche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	30
I.3.3. Technique de dénombrement NF ISO 7218.....	32
I.3.4. Antibiogramme .....	33
I.3.5. Souches de référence.....	35
I.3.6. Indice MAR (Multiple Antibiotic Resistances).....	36

II. Résultats et interprétation .....	37
II.1. Précipitations.....	37
II.2. Contamination des échantillons des effluents provenant de l'ensemble des sites étudiés.....	38
II.3. Germes isolés dans l'ensemble des effluents étudiés.....	38
II.4. Espèces identifiées.....	41
II.5. Dénombrement des germes.....	41
II.6. Répartition des espèces identifiées selon les différents sites de prélèvement	43
II.7. Antibiorésistance des espèces identifiées.....	44
II.7.1. <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	44
II.7.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	48
II.7.3. <i>Streptococcus</i> du groupe D.....	51
II.7.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	54
II.7.5. <i>Vibrio fluvialis</i> .....	57
II.8. Résultats du calcul de l'indice MAR.....	59
III. Discussion .....	60
<b>Conclusion.....</b>	<b>67</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>69</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>79</b>

## Liste des Tableaux

	<b>Pages</b>
<b>Tableau I</b> : Classes d'antibiotiques et leurs mécanismes d'action .....	4
<b>Tableau II</b> : Caractères principaux du genre <i>Streptococcus</i> .....	8
<b>Tableau III</b> : Présentation des sites d'étude.....	14
<b>Tableau IV</b> : Noms, abréviations et charge des disques d'antibiotiques utilisés.....	34
<b>Tableau V</b> : Les souches de référence utilisées dans cette étude.....	35
<b>Tableau VI</b> : Interprétations l'indice MAR pour un isolat.....	36
<b>Tableau VII</b> : Interprétations l'indice MAR pour un site.....	36
<b>Tableau VIII</b> : Taux de précipitation durant cette étude.....	37
<b>Tableau IX</b> : Nombre des échantillons contaminés dans les sites de prélèvement.....	38
<b>Tableau X</b> : Illustration de l'identification par les tests biochimiques.....	39
<b>Tableau XI</b> : Nombre des souches et moyennes des charges bactériennes dans les trois sites d'études.....	43
<b>Tableau XII</b> : Répartition et pourcentage des souches dans les 3 sites d'étude.....	43
<b>Tableau XIII</b> : Phénotype de l'antibioésistance de toutes les souches isolées d' <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	47
<b>Tableau XIV</b> : Phénotype de l'antibioésistance de toutes les souches isolées de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	50
<b>Tableau XV</b> : Phénotype de l'antibioésistance de toutes les souches isolées de <i>Streptococcus du groupe D</i> .....	53
<b>Tableau XVI</b> : Phénotype de l'antibioésistance de toutes les souches isolées de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	56
<b>Tableau XVII</b> : Mesure des zones d'inhibition de <i>Vibrio fluvialis</i> .....	57
<b>Tableau XVIII</b> : Souches identifiées accompagnées de leurs abréviations isolées des différents prélèvements et par site.....	57
<b>Tableau XIX</b> : Comparaison succincte des taux de résistance des germes isolés dans cette étude avec ceux des auteurs.....	64
<b>Tableau XX</b> : les différents rejets des effluents hospitaliers.....	Annexe I
<b>Tableau XXI</b> : Les différentes caractéristiques du genre <i>Staphylococcus</i> .....	Annexe I
<b>Tableau XXII</b> : Les caractères biochimiques de différentes espèces de <i>Pseudomonas</i> ...	Annexe I
<b>Tableau XXIII</b> : Table NPP.....	Annexe II
<b>Tableau XXIV</b> : Méthodes de dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i> sur milieu solide	Annexe II
<b>Tableau XXV</b> : Lecture de la galerie miniaturisée Api 20E.....	Annexe II
<b>Tableau XXVI</b> : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	Annexe II
<b>Tableau XXVII</b> : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour <i>Staphylococcus spp</i> .....	Annexe II
<b>Tableau XXVIII</b> : Les charges bactériennes dans tous les prélèvements.....	Annexe II

## Liste des Figures

	Pages
<b>Figure 1</b> : Mécanisme de la résistance bactérienne.....	6
<b>Figure 2</b> : Site de prélèvement au niveau de l'hôpital Frantz-Fanon.....	15
<b>Figure 3</b> : Test de présomption.....	17
<b>Figure 4</b> : Test Confirmatif.....	19
<b>Figure 5</b> : Recherche des spores de Clostridium Sulfito-réducteurs sur milieu viande-foie.....	21
<b>Figure 6</b> : Recherche de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	23
<b>Figure 7</b> : <i>Staphylococcus aureus</i> en microscopie optique à (G× 100) après coloration de Gram.....	24
<b>Figure 8</b> : Test Catalase positif.....	25
<b>Figure 9</b> : Test Catalase négatif.....	25
<b>Figure 10</b> : Test coagulase positif/négatif.....	25
<b>Figure 11</b> : Recherche du <i>Vibrio</i> et <i>Aeromonas</i> .....	27
<b>Figure 12</b> : Oxydase positive .....	28
<b>Figure 13</b> : Oxydase négative.....	28
<b>Figure 14</b> : La Galerie API 20E.....	30
<b>Figure 15</b> : Pyocyanine sur milieu King A.....	31
<b>Figure 16</b> : Pyoverdine sur milieu King B.....	31
<b>Figure 17</b> : Photo d'application des disques d'antibiotiques sur milieu Mueller-Hinton.	34
<b>Figure 18</b> : Les zones d'inhibition.....	35
<b>Figure 19</b> : Précipitations moyennes (mm/jour) enregistrés pendant cette étude.....	37
<b>Figure 20</b> : Répartition des échantillons contaminés et non contaminés.....	38
<b>Figure 21</b> : Réparation globale des différentes espèces isolées.....	41
<b>Figure 22</b> : Réparation des différentes espèces isolées au niveau des 3 sites.....	44
<b>Figure 23</b> : Pourcentage de l'antibiorésistance chez les souches d' <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	45
<b>Figure 24</b> : pourcentage de résistance globale des souches <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	46
<b>Figure 25</b> : Répartition de la résistance des souches <i>Aeromonas hydrophila</i> dans les 3 sites.....	46
<b>Figure 26</b> : Pourcentage de l'antibiorésistance chez les souches de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	48
<b>Figure 27</b> : Pourcentage de résistance globale des souches <i>Staphylococcus aureus</i> .....	49
<b>Figure 28</b> : Répartition de la résistance des souches <i>Staphylococcus aureus</i> dans les 3 sites.....	49
<b>Figure 29</b> : Pourcentage de l'antibiorésistance chez les souches <i>Streptococcus du groupe D</i> .....	51
<b>Figure 30</b> : Pourcentage de résistance globale des souches <i>Streptococcus du groupe D</i> ..	52
<b>Figure 31</b> : Répartition de la résistance des souches <i>Streptococcus du groupe D</i> dans les 3 sites.....	52



<b>Figure 32</b> : Pourcentage de l'antibiorésistance chez les souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	54
<b>Figure 33</b> : Pourcentage de résistance globale des souches <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ...	55
<b>Figure 34</b> : Répartition de la résistance des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans les 3 sites.....	55
<b>Figure 35</b> : Indice MAR calculé à partir des différents isolats.....	59
<b>Figure 36</b> : Indice MAR calculé à partir des différents sites.....	59

## Liste d'abréviations

**Aero** : *Aeromonas hydrophila*  
**AM** : Ampicilline  
**ASR** : Anaérobies sulfito-réducteurs  
**ATB** : Antibiotique  
**ATCC** : American Type Culture Collection  
**AX** : Amoxicilline  
**BMR** : Bactéries multi-résistantes  
**BLSE** :  $\beta$ -lactamase à spectre élargi  
**C** : Chloramphénicol  
**CD** : Clindamycine  
**Clos** : *Clostridium-ASR*  
**CL** : Colistine  
**CTX** : Céfotaxime  
**CZ** : Céfazoline  
**DBO5** : Demande Biochimique en Oxygène pendant 5 jours.  
**DCO** : Demande Chimique en Oxygène  
**D/C** : Double Concentration  
**E** : Erythromycine  
**EGM** : Eléments Génétiques Mobiles  
**EPA** : Eau Peptonée Alcaline  
**FA** : Acide fusidique  
**GEN** : Gentamicine  
**GNAB** : Gélose Nutritive Alcaline Biliée  
**IMP** : Imipénème  
**K** : Kanamycine  
**L** : Linomycine  
**MAR** : Multiple antibiotic resistances  
**MET** : Métronidazole  
**M.H** : Mueller-Hinton.  
**NPP** : Nombre le plus probable  
**OFX** : Ofloxacin  
**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé.  
**ONM** : Office national de météorologie  
**OX** : Oxacilline  
**P** : Pénicilline G  
**PLP** : Protéines liant les pénicillines  
**Pseudo** : *Pseudomonas aeruginosa*  
**PT** : Pristinamycine  
**S** : Streptomycine  
**SARM** : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline  
**SF** : Streptocoques Fécaux.  
**S/C** : Simple Concentration  
**Strep-D** : *Streptococcus* du groupe-D

**Staph.a** : *Staphylococcus aureus*

**TE** : Tétracycline

**TOB**: Tobramycine

**TSS** : Total Suspended Solids ou Total des solides en suspension

**UFC** : Unité Formant Colonie

**U.V** : Ultra-Violet

**VA** : Vancomycine

**VF** : Viande Foie

**Vib** : *Vibrio fluvialis*

## RESUME

En Algérie, les effluents hospitaliers non traités générées par les établissements de la santé peuvent poser une menace sur la santé publique et l'environnement, par la dissémination des bactéries résistantes aux antibiotiques. Cette étude avait pour objectif la recherche, l'identification et l'étude du profil de résistance des bactéries autre que les *Enterobacteriaceae* isolées à partir des effluents hospitaliers de trois centres hospitaliers différents (Brahim tirichine, Frantz Fanon et Ben Bouali) situés dans la wilaya de Blida.

Parmi les 37 souches isolées, 14 souches provenaient des effluents de l'hôpital Frantz Fanon, 12 souches des eaux usées rejetées par l'hôpital Brahim Tirichin et 11 souches ont été collectées au niveau des effluents de l'hôpital Ben Boualid. Les résultats obtenus au cours de notre étude ont montré une prédominance d'*Aeromonas hydrophila* avec 9 souches, suivie par 8 souches pour chacun de *Staphylococcus aureus* et *Clostridium-ASR. Streptococcus* du groupe D vient par la suite avec 7 souches, suivie par 4 souches de *Pseudomonas aeruginosa* et en dernier, une seule souche *Vibrio fluvialis*.

L'antibiogramme effectué a montré que *P. aeruginosa* est la bactérie la plus résistante. Les souches de cette espèce ont présenté une résistance élevée (100%) vis-à-vis des Béta-lactamines (à l'exception de l'Imipenème), des Macrolides, des Aminosides (Kanamycine, Streptomycine), de la Vancomycine, de l'Acide fusidique, de la Pristinamycine et de la Métronidazole, où les souches d'*A. hydrophila* et *S. aureus* montrent une résistance très élevée (100%) vis-à-vis Acide fusidique, Métronidazole, alors que toutes les souches de *Streptococcus du groupe D* ont affiché une résistance très élevée (100%) vis-à-vis des Aminosides (Kanamycine et Streptomycine), Colistine et Métronidazole.

Le calcul de l'indice Multiple Antibiotic Resistance (MAR) pour l'ensemble des souches isolées a permis d'obtenir des valeurs supérieures à 0,2, ce qu'indique que les isolats sont exposés à des sources de risque élevé de contamination où les antibiotiques sont fréquemment utilisés. *P. aeruginosa* a exprimé la valeur la plus élevée 0,83.

Pour les valeurs calculées de l'indice MAR des sites, elles varient entre 0,33 et 0,54. L'effluent hospitalier de Frantz fanon est le plus contaminé avec une valeur MAR de 0,54.

Mots clés : effluents hospitaliers, bactéries, identification, résistance, antibiotique, indice MAR (multiple antibiotic resistance).

## ملخص:

في الجزائر، يمكن للنفايات السائلة غير المعالجة الناتجة عن المؤسسات الصحية ان تشكل خطرا على الصحة العامة والبيئة عن طريق انتشار البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية. هدفت هذه الدراسة إلى بحث وتحديد ودراسة المقاومة البكتيرية أخرى غير *Enterobacteriaceae* معزولة عن النفايات السائلة لثلاثة مستشفيات مختلفة (براهيم تيريشين، فرانتز فانون وبن بو علي) الواقعة في ولاية البليدة.

من 37 سلالة معزولة، تم انتشار 14 سلالات من النفايات السائلة من مستشفى فرانس فانون، تم جمع 12 سلالة من مياه الصرف الصحي التي صدرت من مستشفى إبراهيم تيريشين و 11 سلالة من النفايات السائلة لمستشفى بن بو علي.

وأظهرت النتائج التي تم الحصول عليها في دراستنا غلبة سلالات *Aeromonas hydrophila* ب 9 سلالات، تليها 8 سلالات لكل من *Streptococcus du goupe D*، *Clostridium-ASR* و *Staphylococcus aureus*. يأتي في وقت لاحق مع 7 سلالات، تليها أربع سلالات *Pseudomonas aeruginosa* والأخير، سلالة واحدة من *Vibrio fluvialis*

وأظهر اختبار الحساسية التي أجريت، أن *P. aeruginosa* هي البكتيريا الأكثر مقاومة. وأظهرت سلالات من هذه الأنواع مقاومة عالية (100%) وجهها لوجه مع المضادات الحيوية بيتا لاكتام (باستثناء إيميبينيم) من الماكروليدات، والامينوزيد (كاناميسين، الستربتومايسين)، و فانكوميسين، و حمض الفوسيديك، بريستينااميسين وميترونيدازول، و تظهر سلالات من *A. hydrophila* و *S. aureus* المقاومة عالية جدا (100%) وجهها لوجه ضد حمض الفوسيديك، ميترانيدازول، في حين أن *Streptococcus du goupe D* أظهرت مقاومة عالية جدا (100%) وجهها لوجه مع الامينوزيد (كاناميسين) والستربتومايسين، كوليستين وميترونيدازول.

يبين حساب مؤشر متعددة المقاومة للمضادات الحيوية (MAR) لجميع السلالات ان القيم أكبر من 0.2، وأشار إلى أن السلالات المعزولة معرضة لمخاطر عالية من مصادر التلوث حيث يتم استخدام المضادات الحيوية في كثير من الأحيان. و بينت سلالات *P. aeruginosa* أعلى قيمة ب 0.83. القيم المحسوبة لمؤشر متعددة المقاومة للمضادات الحيوية حسب المواقع، فإنها تختلف بين 0.33 و 0.54. مستشفى فرانس فانون هو الأكثر تلوثا النفايات السائلة مع قيمة تقدر ب 0.54.

**الكلمات المفتاحية :** النفايات السائلة المستشفى، البكتيريا، تحديد، المقاومة، المضادات الحيوية و مؤشر متعددة المقاومة للمضادات الحيوية

## **Abstract:**

In Algeria, hospital wastes non treated generated by the establishment of the health can be a threat on the public health and the environment, by the scattering of bacterium tough to antibiotic.

This study had for objective the research, the identification and the study of the profile of the bacterium resistance on the other side the *Enterobacteriaceae* isolated from the hospital wastes from three different hospital centers (Brahim Tirichin, Frantz Fanon and Ben Boulaid) sited in the wilaya of Blida.

Between the 37 isolated stumps coming from the hospital wastes of Frantz Fanon, 12 stumps of worn waters throwing back by Brahim Tirichin hospital and 11 stumps had been collected at the level of the hospital wastes of Ben Boulaid.

The results obtained during our study showed a predominance of *Staphylococcus aureus* and *Clostridium -ASR. Streptococcus* of group D which comes after with 7 stumps, followed by 4 stumps of *Pseudomonas aeruginosa* and at the end, only one (1) stump *Vibrio fluvialis*.

The performed antibiogram showed that *P. aeruginosa* is the most resistant bacteria.

The stumps of this kind presented a high resistance (100%) towards of “Beta-Lactamines ( exception of the imipeneme) , of “Macrolides”, of “Aminosides” ( Kanamycine , Streptomycine) , Vancomycine , Fusidic Acid , Pristinamycine and Metronidazole, or the stumps of “ *A. hydrophila* and *S. aureus* showed a very high resistance (100%) towards Fusidic Acid , Metronidazole, even though all the stumps of *Streptococcus* of groupe D put up a very high resistance (100%) towards the Aminosides ( Kanamycine and Streptomycine) , Colistine and Metronidazole.

The sign calculation multiplies Antibiotic Resistance (MAR) for all isolated stumps permitted to obtain values which are upper 0.2 which indicate that the isolates are displayed to sources of a high risk of antibiotics are frequently used.

“*Pseudomonas aeruginosa* “expressed the highest value which is 0.83.

For the calculated values of the sign “MAR” of the sites, the varied between 0.33 and 0.54. The hospital waste of Frantz Fanon is the most contaminated with a value MAR of 0.54.

## **Key Words:**

The hospital wastes, bacteria, identification, resistance, antibiotic, sign MAR (multiple antibiotic resistance).





# Introduction

## INTRODUCTION

L'usage de l'eau en milieu hospitalier est très varié, et pourrait être contaminée par de nombreuses bactéries pathogènes (**Barbut et Denis, 2006**). Elle serait un vecteur privilégié de nombreuses pathologies d'origine bactérienne, pouvant ainsi engendrer des infections chez des patients fragilisés ou immunodéprimés (**Diduch et al., 2016**).

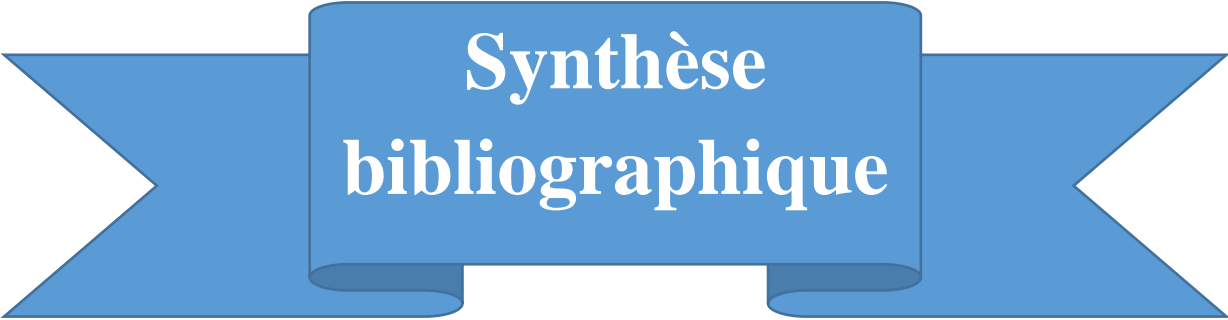
Les établissements de la santé produisent des grandes quantités d'effluents, en moyenne 750 litres d'eaux usées par lit et par jour (**Boller, 1997**). De nombreux médicaments non métabolisés excrétés à partir des patients et des produits chimiques résiduels pénètrent dans les eaux usées, où ils interagissent avec la microflore des eaux usées de l'hôpital. Cette microflore comprend des bactéries saprophytes de l'atmosphère, du sol et de l'eau utilisée dans la pratique à l'hôpital.

Selon **Moriñigo et al., (1990)**, les agents pathogènes sont principalement libérés avec les excréments du patient. En raison de l'utilisation des antibiotiques dans les hôpitaux, les effluents hospitaliers contiennent un grand nombre de germes résistants que les eaux usées domestiques

Il est clair aujourd'hui que les antibiotiques jouent un rôle central dans la sélection de la résistance bactérienne, et la propagation des gènes de résistance et des bactéries résistantes qui contribuent également au problème de la santé publique (**Stuart, 2002**).

Cependant, la résistance aux antibiotiques est non seulement un problème médical, mais aussi une question écologique. À comprendre le processus par lequel la résistance se propage, il est nécessaire de tenir compte non seulement milieu hospitalier, mais aussi l'écologie et l'évolution des micro-organismes résistants (**Martínez ,2012**)

C'est dans ce contexte que cette étude s'inscrit. Elle avait pour but d'une part d'évaluer, d'isoler et d'identifier les bactéries autres que les *Enterobacteriaceae* et d'autre part d'étudier le profil de la résistance bactérienne aux antibiotiques à partir des effluents de trois grands hôpitaux, il s'agit de Ben Bouali, Brahim Tirichine et Frantz Fanon.



**Synthèse  
bibliographique**

# I. GENERALITES SUR LES EFFLUENTS HOSPITALIERS

## I.1. Définition

Les hôpitaux consomment et rejettent un important volume d'eau par jour. Ces effluents hospitaliers sont les résultats de l'utilisation des eaux disponibles au milieu hospitalier destinés à des utilisations très divers chacune répond à des normes spécifiques et nécessite une surveillance particulière (Hygis, 1998).

Ces effluents représentent un type particulier des eaux usées (Pauwels et al., 2006). En effet, leurs caractéristiques présentent des différences qualitatives et quantitatives (Kosma et al., 2010 ; Liu et al., 2010 ; Verlicchi et al., 2010 ; Altin et al., 2003).

## I.2. Origine des effluents liquides hospitaliers

Selon Emmanuel (2004) et Deloffre-Bounamour (1995), les effluents liquides hospitaliers peuvent être classés en trois grandes catégories :

- ✚ Les rejets d'origine domestique : qui regroupent les eaux provenant des cuisines, des eaux de toilette chargées de matières organiques azotés.
- ✚ Les rejets assimilables à des effluents industriels : qui sont générés par les différents équipements et machineries spécifiques (chaufferies, ateliers, climatiseurs ...).
- ✚ Les effluents spécifiques aux établissements de santé par les activités de soins, d'analyse et de chirurgie.

Cette dernière catégorie est chargée de micro-organismes pathogènes, pharmaceutiques partiellement métabolisés, des éléments radioactifs et autres produits chimiques et substances toxiques. En outre, dans les effluents hospitaliers, les polluants conventionnels comme la DBO<sub>5</sub>, la DCO et les TSS (Total suspended solids ou Total des solides en suspension), sont en général plus élevés que dans les eaux usées urbaines (Verlicchi et al. 2010). Les rejets liquides spécifiques aux activités de soins sont consignés dans le Tableau XX (Annexe I).

## I.3. Menace des effluents hospitaliers

La flore hospitalière est composée de la flore des malades, du personnel soignant, des visiteurs, et des germes de l'environnement présents sur les sols, l'eau et dans l'air. Concernant cette flore, les valeurs retrouvées dans les effluents liquides hospitaliers révèlent des concentrations assez faibles, de l'ordre de  $3 \times 10^8$  UFC/L (Darsy et al., 2002 ; Jehannin, 1999), en comparaison avec les valeurs pour la flore totale généralement présente dans les rejets liquides communaux est de  $10^{11}$  UFC/L (Bernet et Fines, 2000 ; Mansotte et Jestin, 2000).

Il faut signaler que la consommation de l'eau dans un établissement hospitalier est très importante par rapport aux autres établissements et habitats cela se traduit par une dilution des effluents hospitaliers et permettent d'expliquer ainsi les plus faibles concentrations en micro-organismes comparés aux effluents urbains (Jehannin, 1999).

#### **I.4. Bactéries multirésistances dans les milieux aquatiques**

Dans le monde, les milieux aquatiques sont soumis à des niveaux élevés d'impact anthropique (**Halpern et al., 2008**), où ils deviennent des réservoirs importants pour la résistance aux antibiotiques grâce à la présence des bactéries multi-résistantes et des éléments génétiques mobiles EGM ou transposons provenant d'une variété de sources, conjointement avec l'augmentation des concentrations des antibiotiques de notre flux de déchets, tous réunis dans cet environnement (**Baquero et al., 2008**).

Par ailleurs, de grandes quantités de bactéries résistantes se déversent dans les eaux usées avec les déjections humaines. Dans le domaine agricole, la diffusion des BMR s'effectue par le pâturage du bétail et l'épandage du lisier et passe par le sol avant d'atteindre le milieu aquatique et éventuellement les eaux souterraines (**Burgman, 2014**).

#### **I.5. Bactéries multirésistances dans les effluents hospitaliers**

Les bactéries des effluents hospitaliers résistent à des concentrations en antibiotiques plus élevées encore que celles des eaux usées municipales (**Haenn et al., 2007**). Parmi toutes les BMR, les *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) et les entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (EBLSE) sont les plus préoccupantes compte tenu de leur pouvoir pathogène, de leur diffusion au sein des hôpitaux et de leur potentiel de diffusion dans la communauté.

Les effluents non traités générés par les activités hospitalières peuvent contribuer largement à la dissémination des BMR dans l'environnement en particuliers dans les eaux de surface. Ces BMR sont généralement responsables des infections nosocomiales (**Mehmet et al., 2008 ; Dzidic et Bedekovic, 2003**).

Parmi les principales causes de l'émergence de ces germes multi-résistants aux antibiotiques, est l'utilisation non prudente des antibiotiques. Des études récentes ont estimé que 50% des prescriptions d'ATB dans les hôpitaux sont données en l'absence d'un signe évident d'infection ou d'une indication médicale suffisante. La même étude montre que des ATB ont été administrés à plus de 50% des patients souffrant de rhume et des infections respiratoires supérieures, alors que plus de 90% de ces infections sont virales (**Willey et al., 2008**).

Les travaux réalisés sur la microbiologie des effluents hospitaliers mettent en évidence de façon systématique la présence de germes ayant acquis des caractères de résistance aux antibiotiques. La présence d'agents antibactériens dans le milieu aquatique a conduit à une préoccupation croissante au sujet du potentiel pour l'environnement les risques et le maintien et la propagation de la résistance aux antibiotiques chez les micro-organismes (**Leprat, 1998**).

## II. ANTIBIOTIQUES ET RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

### II.1. Antibiotique

#### II.1.1. Définition

Les antibiotiques sont des composés chimiques, élaborés par un microorganisme ou produits par synthèse et dont l'activité spécifique se manifeste à faible dose sur les microorganismes (**Crouzilles, 2012**). Ils détruisent ou empêchent la croissance d'un autre microorganisme (**Madigan et Martinko, 2007**).

#### II.1.2 Classification et mode d'action des antibiotiques

Les ATB peuvent être classés selon plusieurs critères : l'origine, la nature chimique, le mode d'action ou le spectre d'action (**Bryskier, 1999**).

L'action antibactérienne de ces ATB s'effectue selon quatre principaux mécanismes :

- Inhibition de la synthèse des constituants de la paroi (le peptidoglycane).
- Action sur la structure de la membrane plasmique.
- Inhibition de la synthèse protéique.
- Inhibition de la synthèse des acides nucléiques (**Carip, 2008**). Le Tableau I résume les principaux mécanismes des ATB

**Tableau I** : Classes d'antibiotiques et leurs mécanismes d'action.

Mécanismes d'action	Classes	Exemple
Inhibition de la synthèse du peptidoglycane ( <b>Bryskier, 1999</b> ).	Béta-lactamines*	Pénicilline, Ampicilline, Amoxicilline, Aztreonam, Cefotaximen, Céfazoline, Céphaloridine
	Glycopeptides	Vancomycine
Action sur la structure de la membrane plasmique ( <b>Nauciel et Vlode, 2005</b> )	Polypeptides basiques	Polymyxines
Inhibition de la synthèse des ADN ( <b>Flandrois et al., 1997</b> )	Quinolones	-Fluoroquinolones - Ofloxine
Inhibition de la synthèse des ARN ( <b>Pebert, 2003</b> )	Rifamycines	Rifamycine



Inhibition de la synthèse protéique ( <b>Pebert, 2003</b> )	Phénicoles	-Chloramphénicol, -Thiamphénicol
	Cyclines	-Tétracyclines
	Aminosides	-Kanamycine, -Streptomycine
	Macrolides	-Érythromycine -Lincomycine -Josamycine
	Autres	Acide fusidique

(**Bryskier, 1999**).

\* Divisé en quatre sous-classes : pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes et monobactamines.

## II.2. Antibiorésistance

La propagation des organismes pathogènes résistants aux antibiotiques est une des menaces les plus sérieuses pour un traitement efficace d'une maladie (**Bocq-Callberg et Dusart, 2007**).

Les antibiotiques peuvent être naturellement inefficaces contre certaines bactéries (résistance naturelle) ou devenir inefficace contre des bactéries au préalable sensibles à l'antibiotique (résistance acquise) (**Baudry et Brézelle, 2006**).

L'antibiorésistance se définit alors par l'inefficacité de la dose d'antibiotique au niveau du site infectieux (**Michelbriand, 2012**).

### II.2.1. Nature de l'antibiorésistance

#### Résistance naturelle :

Certains antibiotiques sont naturellement inefficaces contre certaines bactéries. Cette résistance naturelle définit le spectre d'action de l'antibiotique. Elle est connue et se manifeste chez tous les individus de la population bactérienne (**Baudry et Brézelle, 2006**).

L'information responsable de cette résistance fait partie du patrimoine génétique de la bactérie (**Pebert, 2003**).

#### Résistance acquise

La résistance acquise apparaît à la suite d'un mécanisme chromosomique ou extra-chromosomique chez les bactéries (**Baudry et Brézelle, 2006**).

### ○ Mutation chromosomique

Elles sont induites par des modifications structurales entraînant soit un problème de perméabilité à un ou plusieurs antibiotiques, soit en rendant les cibles spécifiques des antibiotiques (**Baudry et Brézelle, 2006**). Si elle vient à modifier le site d'action de l'antibiotique, ce devenir devient inactif, on parle alors de mutant résistant. Ces mutations chromosomiques sont rares, spontanées (se produisent en l'absence des antibiotiques) spécifiques, héréditaires et réversibles (**Pebert, 2003**).

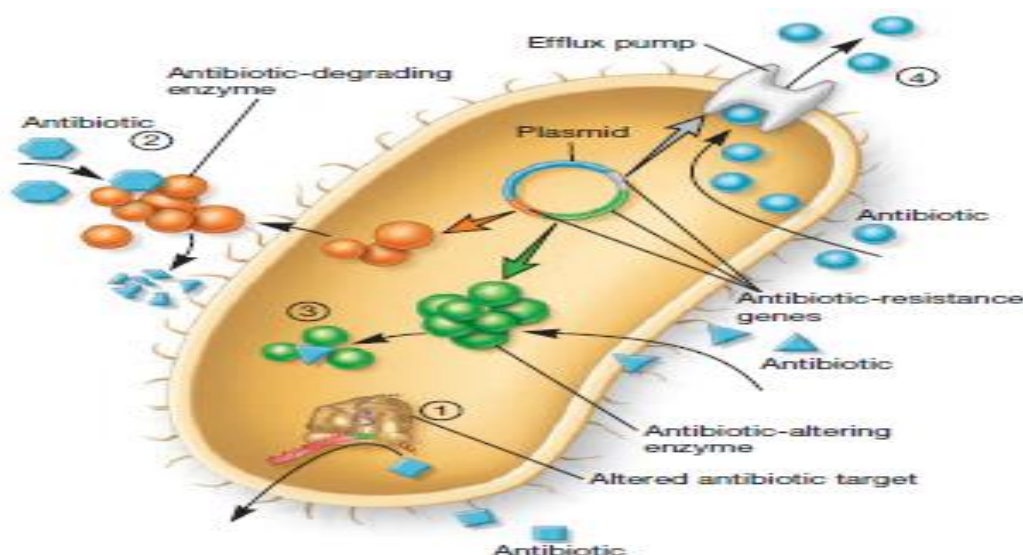
### ○ Mutation extra-chromosomique ou plasmidique

Elle s'effectue par acquisition d'un plasmide, fragment d'ADN présent dans le cytoplasme. Les plasmides transmettent des résistances multiples à différents espèces bactérienne. Trois mécanismes permettent ces transferts de plasmide : la conjugaison, la transduction et la transformation (**Baudry et Brézelle, 2006**).

## II.2.2. Mécanismes de résistance

Les bactéries peuvent résister à l'action des antibiotiques soit :

- ✓ En empêchant l'accès (ou en altérant) la cible de l'antibiotique,
- ✓ En dégradant l'antibiotique,
- ✓ La modification de l'antibiotique et/ou l'extrusion rapide de l'antibiotique (efflux) (Figure1).



**Figure 1** : Mécanisme de la résistance bactérienne (**Willey et al., 2008**)

### **III.2.3. Transmission des bactéries portant des gènes de résistance**

Les bactéries portent des gènes de résistance qui circulent dans la population humaine et plus encore en milieu hospitalier. La situation s'est aggravée par la transmission des bactéries par le personnel hospitalier, si les précautions d'hygiène ne sont pas assez strictes.

Chez les animaux, les antibiotiques ne sont pas utilisés seulement à titre thérapeutique, mais aussi comme additif dans l'alimentation. Des souches résistantes, trouvées chez l'animal peuvent ensuite être transmises à la population humaine (Nauciel et Vlide, 2005).

## **III. CARACTERISTIQUES MICROBIOLOGIQUES DES EFFLUENTS HOSPITALIERS**

À l'hôpital également, le milieu hydrique véhicule de nombreux germes bactériens saprophytes et accidentellement des bactéries pathogènes opportunistes ou pathogènes. Les canalisations de distribution de l'eau en particulier constituent un danger sur la santé publique et l'environnement (Jadin et Lafontaine, 1998). Il est très difficile d'évaluer un risque d'infection nosocomiale d'origine hydrique en milieu hospitalier puisque les voies de contaminations sont multiples (orale, cutanéomuqueuse, respiratoire...) et l'état immunitaire des patients très diversifié (Blech et Hartemann, 1988).

### **III.1. Principales bactéries d'origine hydrique**

#### **III.1.1. Bactéries indicatrices de contamination fécale**

Ces bactéries encore appelées bactéries témoins de contamination fécale appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* et sont recherchés en routine dans les eaux (Delarras et al, 2010). Elles sont considérées comme un indicateur de contamination fécale, mais aussi de contamination par le milieu extérieur. Ces sont des hôtes normaux du tube digestif de l'homme et de tous les animaux à sang chaud (Freney et Croze, 2007).

Nous ne détaillerons pas ce paragraphe, car ce n'est pas l'objectif de cette étude.

#### **III.1.2. Streptocoques fécaux ou Streptocoques du groupe D**

Les streptocoques fécaux du groupe sérologique D de Lancefield font partie de la flore normale de l'intestin de l'homme et de certains animaux, ils sont responsables d'endocardites subaiguës (Flandrois et al., 1997). Ils sont présents dans les matières fécales humaines et à sang chaud, bien que constamment retrouvés dans des eaux connues pour être un réceptacle de contamination fécale (Green et al., 1977).

Le genre *Streptococcus* comporte des espèces et sous-espèces, réparties en quatre ensembles, sous-ensembles et espèces (Delarras, 2014).

Leur classification est la suivante :

- Domaine : *Bacteria* ou *Eubacteria*.
- Phylum XIII : *Firmicutes*.
- Classe : *Bacilli*.
- Ordre : *Lactobacillales*
- Famille : *Streptococcaceae*
- Genre : *Streptococcus* (Delarras, 2014).

Leurs caractères principaux (morphologie, milieux de culture, identification biochimique) sont résumés dans le Tableau suivant :

**Tableau II** : Caractères principaux du genre *Streptococcus*.

<b>Caractères principaux-Identification biochimique</b>	
<b>Morphologie</b>	Cocci ovalaire ou sphérique, de 0.6 à 1 µm en moyenne, isolés, en diplocoques chainettes ou chaînes
<b>Coloration de Gram</b>	Gram <sup>+</sup>
<b>Capsule</b>	Chez <i>Streptococcus pneumoniae</i> (Diplocoques encapsulés)
<b>Mobilité</b>	Immobilés en général
<b>Type respiratoire</b>	Aéro Anaérobies facultatifs
<b>Catalase</b>	Négative
<b>Conditions de culture</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Température générale : 20 à 42 C°</li> <li>• Température optimale : 35 à 37 C°</li> <li>• pH optimal : 7.2 à 7.4</li> </ul>
<b>Identification biochimique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• API 20® strep bioMérieux ®</li> </ul>

(Delarras *et al.*, 2010)

### III.1.3. *Clostridium Sulfito-Réducteurs*

Les clostridies sont des bacilles anaérobies stricts, sporulés, non capsulés (à l'exception de *Clostridium perfringens*). La spore est de grande taille, parfois plus grande que la bactérie. La plupart des clostridies sont mobiles (flagelles péritriches) (Carip, 2008).

Ils sont ainsi dénommés, car ils sont capables de réduire les sulfites en sulfures. Ceux ci se combinent avec un sel de fer pour donner du sulfure de fer noir. Les colonies noires entourées d'un halo noir sont caractéristiques des bactéries sulfito-réductrices (ou anaérobies sulfitoréducteurs) (Delarras et al., 2010).

Dans les eaux, les espèces de *Clostridium* sont des germes indicateurs de contamination fécale. Ils regroupent des espèces telles que *Clostridium perfringens* ; *Clostridium bifermentans* ; *Clostridium sporogenes* ; *Clostridium novyi* ; *Clostridium fallax* ; *Clostridium septocum*.

Leur classification est la suivante :

- Domaine : *Bacteria* ou *Eubacteria*.
- Phylum : *Firmicutes* ou bactéries à Gram +
- Classe : *Clostridia*.
- Ordre : *Clostridiales*.
- Familles : 19 familles dont la famille I des *Clostridiaceae*.
- Dans la famille des *Clostridiaceae* : 13 genres dont le genre *Clostridium* (Delarras, 2014).

*Clostridium perfringens* est l'espèce spécifique parmi les *Clostridium* sulfito-réducteurs. Elle est présente dans les matières fécales, mais elle peut aussi être isolée des eaux superficielles, des vases, des boues. Elle est notamment considérée comme indicateur de malpropreté au niveau du réseau de distribution d'eau potable (Delarras, 2007).

Espèce thermophile, sa température optimale de croissance étant comprise entre 40 et 45 °C, mais elle est toutefois capable de se développer à des températures comprises entre 15 °C et 50 °C. Les spores thermosensibles de *C. perfringens* résistent 5 minutes à 100 °C et produisent l'entérotoxine responsable des intoxications alimentaires (Fosse et Margas, 2004 ; Cavalli, 2003).

Elles sont catalases négatives et ne possèdent pas de superoxyde-dismutase, ce qui explique leur intolérance à l'oxygène aussi bien pour la survie que pour la multiplication. La plupart des souches sont hémolytiques (Carip, 2008).

### III.1.4. Bactéries pathogènes pour l'homme

Elles ont pour habitat principal ou secondaire les eaux selon les germes.

## ❖ Staphylocoques

Les Staphylocoques sont des cocci Gram positifs immobiles, isolés ou groupés en diplocoques ou, le plus souvent, en amas de plusieurs éléments. Leur diamètre moyen varie entre 0.8 et 1 µm.

Ils peuvent être répartis en souches pathogènes et relativement non pathogènes sur la base de la synthèse de coagulase. L'espèce coagulase-positif *Staphylococcus aureus* est l'agent le plus pathogène pour l'être humain. Les Staphylocoques coagulase-négative *Staphylococcus epidermidis* ne produisent pas de coagulase, et sont non pigmentés et généralement moins invasifs (**Willey et al., 2008**). La grande majorité des souches de *Staphylococcus aureus* sont capsulées, mais les souches peuvent perdre leur capsule après culture (**Larpen, 2000**).

Leur classification est la suivante :

- Domaine : *Bacteria* ou *Eubacteria*.
- Phylum XIII : *Firmicutes*.
- Classe : *Bacilli*.
- Ordre : *Bacillales*.
- Famille : *Staphylococcaceae*
- Genre : *Staphylococcus* avec trente-huit espèces et des sous espèces (**Delarras, 2014**).

Les staphylocoques sont des germes ubiquistes qui peuvent vivre :

- En bactéries saprophytes dans la nature (sols, air, eaux, aliments...)
- En bactéries commensales sur la peau et les muqueuses de l'homme et des animaux (mammifères) ;
- En bactéries pathogènes, agents d'infections humaines qui peuvent être redoutables (**Delarras, 2007**).

Certaines espèces de staphylocoques sont capables de croître dans des conditions hostiles. Ce caractère est parfois mis à profit (surtout en bactériologie alimentaire), dans l'utilisation de milieux sélectifs (milieu de Chapman) pour les isoler. *Staphylococcus aureus* présente une bonne croissance sur milieu usuels en 18-24h à 37°C (culture entre 10 et 40°C).

Sur gélose ordinaire, les colonies de *Staphylococcus aureus* lisses, rondes, d'un diamètre de 1 à 3 mm, arrondies, bombées, opaques, parfois colorées (pigment jaune à jaune-oronge, pour *Staphylococcus aureus* (**Larpen, 2000**).

De nombreuses études permettent de dresser des profils métaboliques pour la plupart des espèces de staphylocoques. Les principaux caractères biochimiques pris en compte sont la production de catalase, la capacité à métaboliser les sucres et la production d'arginine dihydrolase (ADH) (**Larpen, 2000**). Oxydase négative, ils réduisent les nitrates. Ils produisent également des coagulases, des phosphatases alcalines et d'autres enzymes (**Carip, 2008**).



Les *Staphylococcus aureus* possèdent des facteurs antigéniques de surface utilisés dans des classifications (Avril et al., 1992). Il existe des antigènes capsulaires, de nature polysaccharidique et des antigènes pariétaux caractérisent l'espèce *S. aureus* (Leminor et Veron, 1989).

Vis-à-vis des antibiotiques, actuellement près de 80% des souches intra ou extrahospitalières sont résistantes à la pénicilline G due une pénicillinase d'origine plasmidique.

Quatre types d'enzymes extracellulaires ont été décrits, A, B, C, D. Ces enzymes hydrolysent les pénicillines du groupe 1, la céphaloridine et la céfazoline (Bryskier, 1999).

La vancomycine reste l'antibiotique de recours pour traiter les septicémies et les endocardites dues à des souches de *Staphylococcus aureus* multirésistantes (Avril, 1997).

Environ 30% des souches hospitalières de *Staphylococcus aureus* sont résistantes à la méticilline (SARM). Les SARM hébergent le gène *mecA* qui code pour une PLPa2 aditionnelle, protéine de liaison à la pénicilline de faible affinité, responsable de la résistance intrinsèque à toutes les  $\beta$ -lactamines, ainsi qu'aux inhibiteurs des  $\beta$ -lactamines (Denis et al., 2007). Les principaux caractères biochimiques sont résumés dans le Tableau XXI (Annexe I).

#### ❖ *Pseudomonas*

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles Gram négatifs aéro anaérobies facultative, non capsulés, non sporulés, mobiles (plusieurs flagelles polaires), mésophiles, producteurs de pigments fluorescents (fluorescéine) ou pas (pyocyanine, pyorubine). Ce genre est capable de synthétiser le film bactérien (Carip, 2008).

Leur classification se présente comme suit :

- Domaine : *Bacteria* ou *Eubacteria*.
- Phylum XII : *Proteobacteria*.
- Classe : *Gammaproteobacteria*.
- Ordre des Pseudomonadales.
- Familles : *Pseudomonadaceae* ...
- Dix genres dans cette famille dont les genres *Pseudomonas* et *Flavimonas* (Delarras et al., 2010)

*Pseudomonas aeruginosa* ou bacille pyocyanique est une bactérie ubiquiste, saprophyte dans les eaux douces et marines, dans l'air, dans les sols humides ou sur les végétaux. Elle est commensale des téguments et des muqueuses de l'homme et des animaux, mais aussi pathogène pour eux. Cette bactérie se rencontre dans l'environnement hospitalier au niveau du matériel, médical ou chirurgical. Chez l'homme, *P. aeruginosa* est l'agent du pus bleu, des infections cutanées post chirurgicales, de septicémies, d'endocardites etc ... Ce germe est aussi un pathogène opportuniste et constitue une cause majeure d'infections nosocomiales diverses chez des personnes fragilisées ou immunodéprimées (grands brûlés, cancéreux ...) (Delarras, 2007). Les principaux caractères biochimiques sont résumés dans le Tableau XXII (Annexe).

Vis-à-vis des antibiotiques, *Pseudomonas aeruginosa* est résistant naturellement aux céphalosporines de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> génération et quelques céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, à la rifampicine, cette résistance est liée à deux mécanismes : la production d'une céphalosporine chromosomique et une mauvaise perméabilité membranaire (**Nauciel, 2000**).

### ❖ *Vibrio*

Les *Vibrio* sont des bacilles à Gram négatifs, droits ou incurvés, aéro-anaérobies facultatifs, d'un diamètre compris entre 0,5 et 0,8 µm et d'une longueur comprise entre 1,4 et 2,6 µm. Ils présentent habituellement une mobilité polaire avec la présence d'un seul flagelle. Certaines souches possèdent plusieurs flagelles latéraux lorsqu'elles poussent sur un milieu solide en particulier pour l'espèce *Vibrio parahaemolyticus* (**Twedt, 1989**).

Ils croissent sur des milieux ordinaires, réduisant les nitrates en nitrites, fermentant les glucides et donnant une réaction d'oxydase positive (**Holt et al., 1994**).

*Vibrio cholerae* est le germe responsable du choléra. L'une des plus graves maladies infectieuses épidémiques de l'histoire de l'humanité (**Carip, 2008**).

Leur classification est la suivante :

- Domaine : *Eubacteria* ; *Gracilicutes* ou bactéries à Gram- ;
- Classe : *Proteobacteria*
- Sous-classe : *Gamma-proteobacteria*
- Ordre : *Vibrionales*
- Famille : *Vibrionaceae*
- Genre : *Vibrio*
- 36 espèces de *Vibrio* dont 9 nouvelles (**Larpent, 2000**).

Les bactéries du genre *Vibrio* sont des germes aquatiques. Ils se retrouvent dans les eaux de surface (lit des fleuves) et dans l'eau de mer (surtout dans les zones côtières) comme saprophytes.

Leur résistance vis-à-vis des antibiotiques est rare. Dans la plupart des cas, la résistance semble intrinsèque à l'espèce plutôt que l'acquisition par le transfert de plasmide ou par l'exposition aux antibiotiques. La seule exception à cette généralisation, est la résistance aux antibiotiques trouvée dans quelques foyers de *V. cholerae*, qui sont devenus résistants par l'acquisition de facteurs R (**Dworkin et al., 2006**).

## ❖ *Aeromonas*

Les bactéries du genre *Aeromonas* sont des habitants naturels des sols et des milieux hydriques et peuvent être considérées comme faisant partie de la flore autochtone des rivières. Ce sont des bacilles à Gram négatif, non capsulés, mobile. Ils sont parfois coccobacillaires (**Don et al., 2004**). Ils sont aéro-anaérobies facultatives. Oxydase + ; fermentant le glucose avec ou sans gaz, réduisant les nitrates en nitrites. La température optimale de croissance est de 30C°, le pH optimal est de 7 (**Denis et al., 2007**).


Ces micro-organismes ont émergé comme pathogènes opportunistes responsables principalement de gastro-entérites, de péritonites, de septicémies, d'infections des plaies et des tissus mous, ainsi que d'une variété d'autres symptômes cliniques chez les patients immunodéprimés (**Goñi-Urriza et al., 2000**).

À l'heure actuelle, parmi les 13 espèces identifiées, trois espèces d'*Aeromonas* sont les plus fréquemment retrouvées dans les infections humaines : *A. hydrophila*, *A. caviae* et *A. veronii var. sobria* (**Denis et al., 2007**).

Leur classification est la suivante :

- Domaine : *Eubacteria*, *Gracilicutes* ou bactéries à Gram- ;
- Classe : *Proteobacteria* ;
- Sous-classe : *Gamma-proteobacteria*
- Ordre : *Aeromonadales*
- Famille : *Aeromonaceae*
- Genre : *Aeromonas* (**Don et al., 2004**).

La plupart des espèces *Aeromonas* sont résistantes à la pénicilline, à l'ampicilline, à la carbénicilline et à la ticarcilline, mais continuent d'être sensibles aux céphalosporines de deuxième et troisième génération, aux aminosides, aux carbapénèmes, au chloramphénicol et aux tétracyclines (**Denis et al., 2007 ; Don et al., 2004**).



**Matériel et  
méthodes**

## I. MATERIEL ET METHODES

Cette étude consiste à isoler, identifier et déterminer les profils de résistance des bactéries autre que les *Enterobacteriaceae* isolées à partir des échantillons d'eau issus des effluents hospitaliers de trois établissements de santé situés dans différents points de la wilaya de Blida.

Une campagne de prélèvement allant du 31 janvier au 2 Mai 2016 à raison d'un prélèvement par quinzaine (à l'exception du mois de Janvier et du mois de Mai, où nous avons réalisé qu'un seul prélèvement).

L'étude a été réalisée au niveau du laboratoire d'Hygiène de la wilaya de Blida

### I.1. Description des sites d'étude de prélèvement

La description, ainsi que les caractéristiques des différents sites ont été fournis par les différents services administratifs et sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau III** : Présentation des sites d'étude.

	Hôpital Ben Bouali	Hôpital Brahim Tirichine	Hôpital Frantz Fanon
Siège	Rue Mohamed Boudiaf-Blida	Rue Kriteley Mukhtar-Blida	Centre Zabana- Route de Htatba-Blida
Surface (m <sup>2</sup> )	11729.38	-	350000
Nombre de services	7	11	16
Nombre des employés	890	-	1442
Nombre de lits	189	126	986
Consommation de l'eau/jour (m <sup>3</sup> )	21,7	20-30	50-150
Types des antibiotiques utilisés pour chaque service	8	10	10-20
Consommation des antibiotiques (g/jour)	50-100	50-100	100-200
Nombre des patients traités/jour	110	100-120	120-400
Nombre de prélèvement	8	8	8

Le taux des précipitations durant cette étude a été fourni par le site officiel de l'office national de météorologie (ONM) ainsi que le site historique-météo pour étudier l'influence des précipitations sur la croissance bactérienne dans nos différents prélèvements.

## **I.2. Matériel**

Nous avons utilisé un matériel représenté par des milieux de culture, des tests d'identification, disques d'antibiogramme, appareillage et verreries (Annexe II)

## **I.3. Méthodes**

### **I.3.1. Echantillonnage et transport**

Des prélèvements manuels instantanés ont été effectués pour la collecte des échantillons d'eau issus des effluents dans les trois établissements hospitaliers décrits précédemment. Ces prélèvements ont eu lieu dans la zone d'écoulement de l'égout où la circulation de l'eau est la plus active (Figure2).



**Figure 2** : Site du prélèvement au niveau de l'hôpital Frantz Fanon.

Les échantillons d'eau sont stockés dans des flacons en verre de 250 ml, stérilisés préalablement dans l'autoclave (120°C durant 15 minutes) puis recueillis dans une glacière avec blocs réfrigérants et acheminés au laboratoire d'Hygiène. Le transport doit s'effectuer le plus rapidement possible en prenant toutes les précautions pour éviter les risques de contamination et de dégradation des constituants dans le respect du délai et de la température de conservation 4°C.

### **I.3.2. Analyses bactériologiques**

#### **I.3.2.1. Dilution**

Plusieurs séries de dilution décimale ( $10^{-1}$  à  $10^{-5}$ ) sont effectués afin de diminuer la charge bactérienne présente avec une densité très élevée.

### **I.3.2.2. Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux**

En milieu liquide, la technique utilisée est celle du NPP (nombre le plus probable) qui fait appel à deux tests consécutifs à savoir :

#### **❖ Test de présomption :**

Réserver à la recherche des streptocoques fécaux

Le mode opératoire est le suivant : À partir de l'eau à analyser, porter aseptiquement :

- 50 ml dans un flacon contenant 50 ml de milieu Roth double concentration D/C.
- 3 fois 10 ml dans 3 tubes contenant 10 ml de milieu Roth double concentration D/C.
- 3 fois 10 ml dans 3 tubes contenant 10 ml de milieu Roth simple concentration S/C (Figure3).

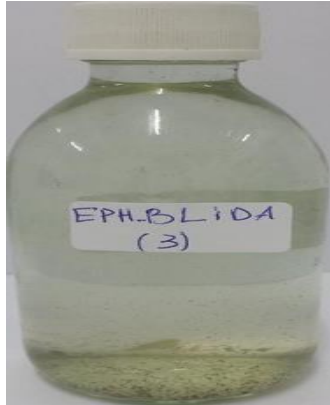
#### **Incubation :**

L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures.

#### **Lecture :**

Les tubes présentant un trouble microbien sont considérés comme positifs.

**Eau à Analyser (250 ml)**



1 x 50ml

3 x 10m

3 x 1ml

**ROTHER D/C**

**ROTHER D/C**

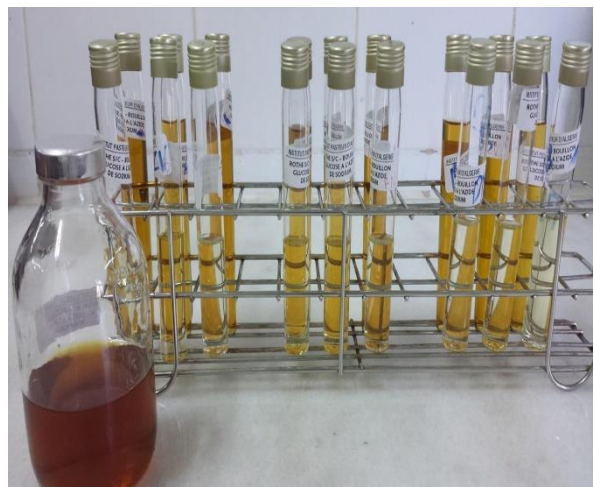
**ROTHER S/C**



**Incubation à 37°C pendant 24 à 48H**

**Résultat positif**

**Résultat négatif**



**Figure 3 : Test de présomption.**



### ❖ **Test de confirmation**

Réserver à la confirmation réelle des streptocoques fécaux à partir des tubes positifs du test de présomption. Pour cela, nous avons suivi les étapes suivantes :

Les tubes de Rothe trouvés positifs feront donc l'objet d'un repiquage à l'aide d'un ose bouclée dans un tube contenant le milieu EVA Litsky (Figure 4).

#### **Incubation :**

L'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures.

#### **Lecture :**

Les tubes considérés positifs, celles qui présentant à la fois

- Un trouble microbien.
- Une pastille violette (blanchâtre) au fond des tubes.

#### **Expression des résultats :**

Le nombre de tube positif dans chaque série et en se reporte à la table de NPP (Tableau XXIII, Annexe II) pour obtenir le nombre de streptocoques présents dans 100 ml.



5 à 6 gouttes



← Incubation à 37°C pendant 24 à 48H →

**Résultat positif**

- Un trouble microbien.
- Une pastille violette (blanchâtre) au fond des tubes

**Résultat négatif**



**Figure 4 : Test Confirmatif.**

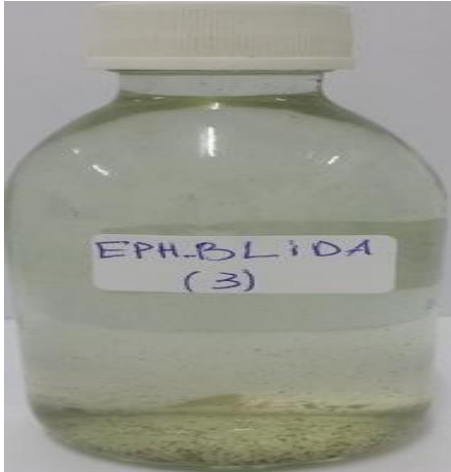
### **I.3.2.3. Recherche et dénombrement des *Clostridium* sulfito-réducteurs**

Pour la recherche et le dénombrement des ASR, nous avons suivi les étapes suivantes :

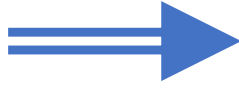
- Introduire dans quatre tubes à essai 5 ml de l'eau à analyser.
- Placer les tubes au bain marie à 80°C pendant 10minutes.
- Après chauffage, réaliser un choc thermique pour les 4 tubes sous l'eau froid.
- Ajouter les additifs, Alun de fer et sulfite dans un flacon contenant de la gélose VF (viande foie) puis remplir les quatre tubes
- Mélanger doucement sans incorporation de l'air.
- Incuber à 37°C et faire une première lecture après 24h et une deuxième après 48h (Figure5).

#### **Expression des résultats :**

La présence d'un résultat positif d'une spore de bactérie anaérobie sulfito-réductrice est exprimée par l'apparition des colonies entourées d'un halo noir.



**1. Eau à Analyser (250 ml)**



**2. Répartir 20 ml dans 4 tubes**



**3. Chauffage à 80°C/10 minutes  
robinet**



**4. Choc thermique sous l'eau de  
robinet**

**5. Ajouter environ 15 ml de gélose VF fondue puis refroidie à  $45 \pm 1^\circ\text{C}$   
Laisser solidifier puis incuber à 37°C, 16 – 24 puis 48 heures**



**Résultat positif**



**Résultat négatif**

**Figure 5 : Recherche des spores de *Clostridium* Sulfito-réducteurs sur milieu VF.**

#### I.3.2.4. Recherche de *Staphylococcus aureus*

Pour la recherche de *Staphylococcus aureus*, nous avons suivi les étapes suivantes :

##### a. Enrichissement

- Préparer d'abord le milieu d'enrichissement par addition de 15 ml de tellurite de potassium à 0,8% dans un flacon de 250 ml de bouillon de Giolitti Cantoni.
- Ensemencer 3 tubes de 15 ml de ce milieu avec 1ml des dilutions ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ).
- Incuber à 37°C pendant 24 à 72heures. Après la période d'incubation, les tubes ayant virés au noir seront considérés comme positifs, (**Ait hamlet, 1998**) (Figure6).

##### b. Isolement

À partir des tubes d'enrichissement positifs, effectuer des isolements sur milieu de Chapman. L'ensemencement doit être massif, en stries serrées, ou par inondation. Incuber à 37°C pendant 24 à 36h, (**Guillaume, 2004 ; Marchal et al., 1982**).

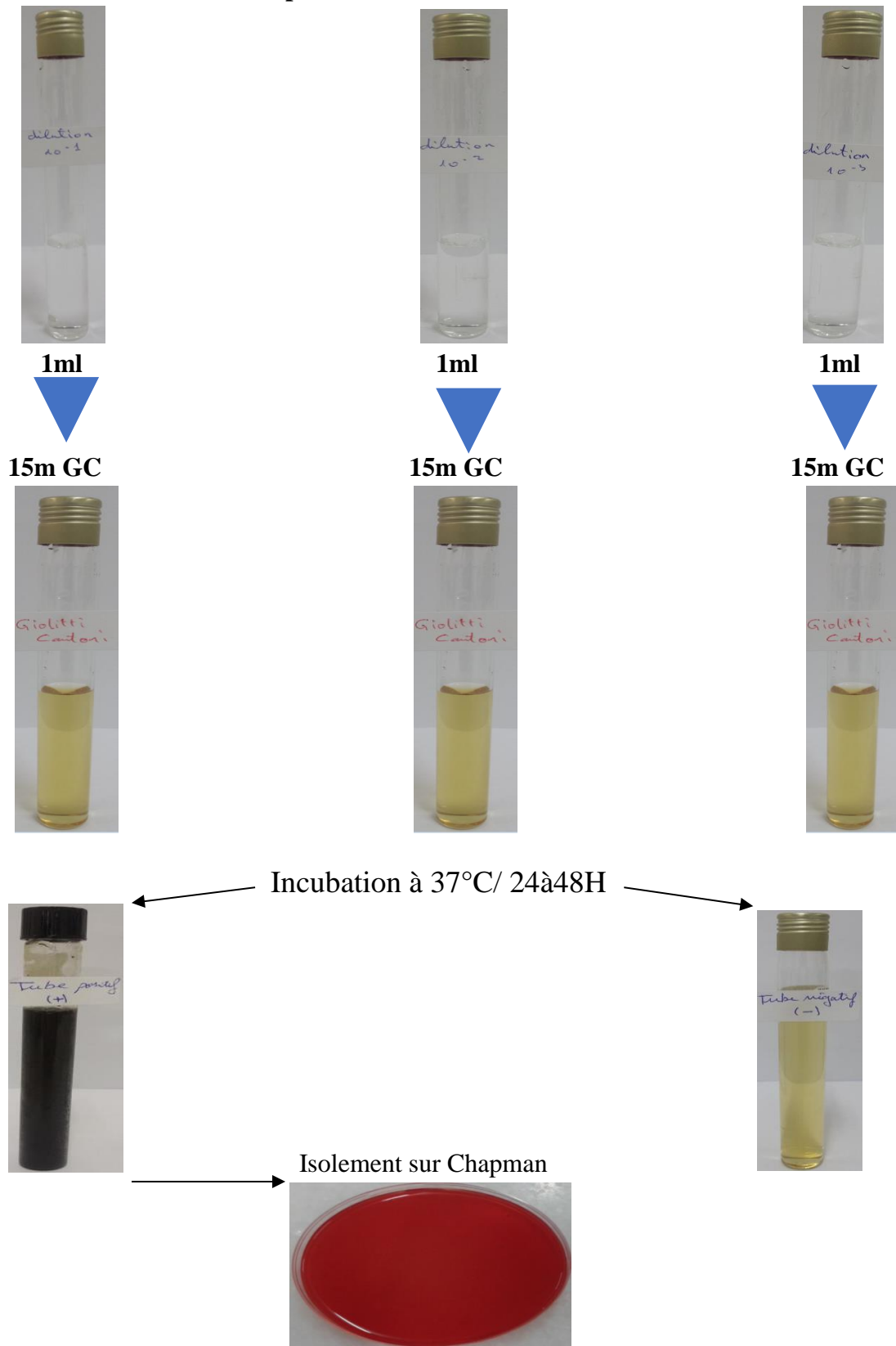
##### c. Lecture

- Les colonies de *S. aureus* sont de tailles importantes. Elles s'entourent d'un halo jaune dû à l'attaque du mannitol et élaborent souvent leur propre pigment dont la production s'accroît après la sortie de l'étuve, (**Guillaume, 2004 ; Rodier et al., 1996**).
- Les autres espèces de *Staphylococcus* donnent des colonies généralement plus petites, rosées et n'entraînent pas de virage du milieu.

Le milieu de Chapman permet seulement une orientation pour l'identification de l'espèce *S. aureus*, une confirmation par des tests plus spécifiques reste obligatoire, (**Marchal et al., 1982**).

Le dénombrement correspond à l'inverse de la dernière dilution (Tableau XXIV, Annexe II) où les colonies de *S. aureus* sont apparues.

À partir des dilutions décimales



Incubation à 37°C / 24 à 48H

Incubation à 37°C / 24 à 48h

Identification (Test Catalase, test coagulase)

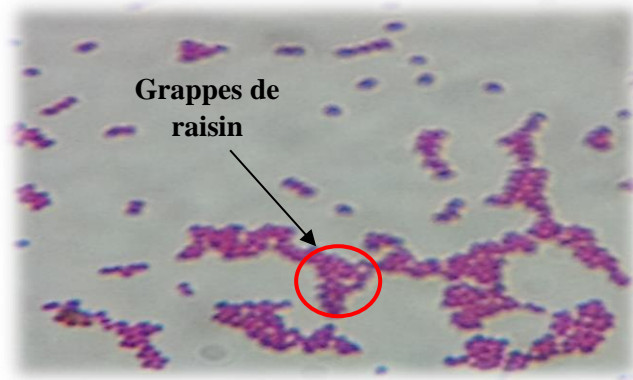
**Figure 6 : Recherche de *Staphylococcus aureus***

#### d. Identification :

Repérer les colonies suspectes, et effectuer les tests suivants :

#### ✚ Coloration Gram

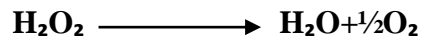
Les staphylocoques apparaissent à l'examen microscopique : Ce sont des cocci à Gram positif regroupés en diplocoques ou en petits amas (grappes de raisin) (Figure7).



**Figure 7** : Observation de *Staphylococcus aureus* au microscope optique (G× 100) après coloration Gram.

#### ✚ Test catalase :

Certaines bactéries ont la faculté de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) selon la réaction suivante :



#### Mode opératoire :

- Déposer une goutte d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 10 volumes sur une lame porte-objet.
- Dissoudre une colonie de la bactérie, prélevée sur la culture en milieu gélosé, (Delarras, 1998).

#### Lecture :

La présence de la catalase est marquée par un dégagement immédiat des bulles gazeuses. Toutes les espèces du genre *Staphylococcus* sont catalase positive, (Berche, 1991) (Figures 8 et 9).



**Figure 8 :** Test Catalase positif.



**Figure 9 :** Test Catalase négatif.

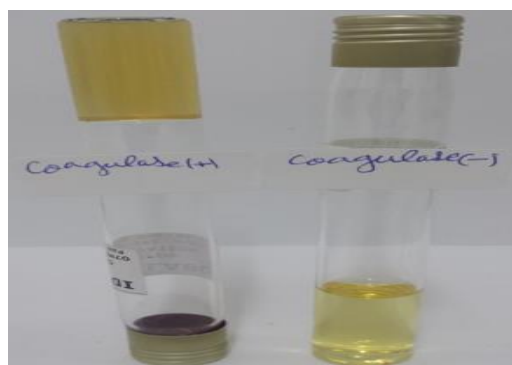
### Test coagulase :

#### Mode opératoire :

- Mettre 2ml de plasma humain dans un tube à essai.
- Ajouter 2ml d'une suspension bactérienne.
- Incuber dans l'étuve à 37°C pendant 24h.
- Un tube témoin servira comme un contrôle du test et pour validation du résultat (pour confirmer que le plasma est incapable de se coaguler seul).

**Lecture :** Interprétation des résultats après 2h, 4h et 24h d'incubation à 37°C.

- ✓ Si le résultat est négatif, laisser jusqu'après 24h,
- ✓ S'il y a coagulation de plasma, le fibrinogène a été transformé en fibrine. La bactérie est dite coagulase positive (Figure10).



**Figure 10 :** Test coagulase positif/négatif.



### **I.3.2.5. Recherche des *Vibrio* et *Aeromonas***

Nous avons suivi le mode opératoire suivant :

#### **a. Premier Enrichissement :**

Le premier enrichissement s'effectue sur milieu Eau Peptonée Alcaline 10 fois concentré réparti à raison de 50 ml par flacon auquel on ajoute aseptiquement 450 ml d'eau à analyser au moment du prélèvement. Ce dernier sera par la suite incubé à 37°C pendant 18 à 24 heures (Figure 11).

#### **b. Deuxième enrichissement et Isolement :**

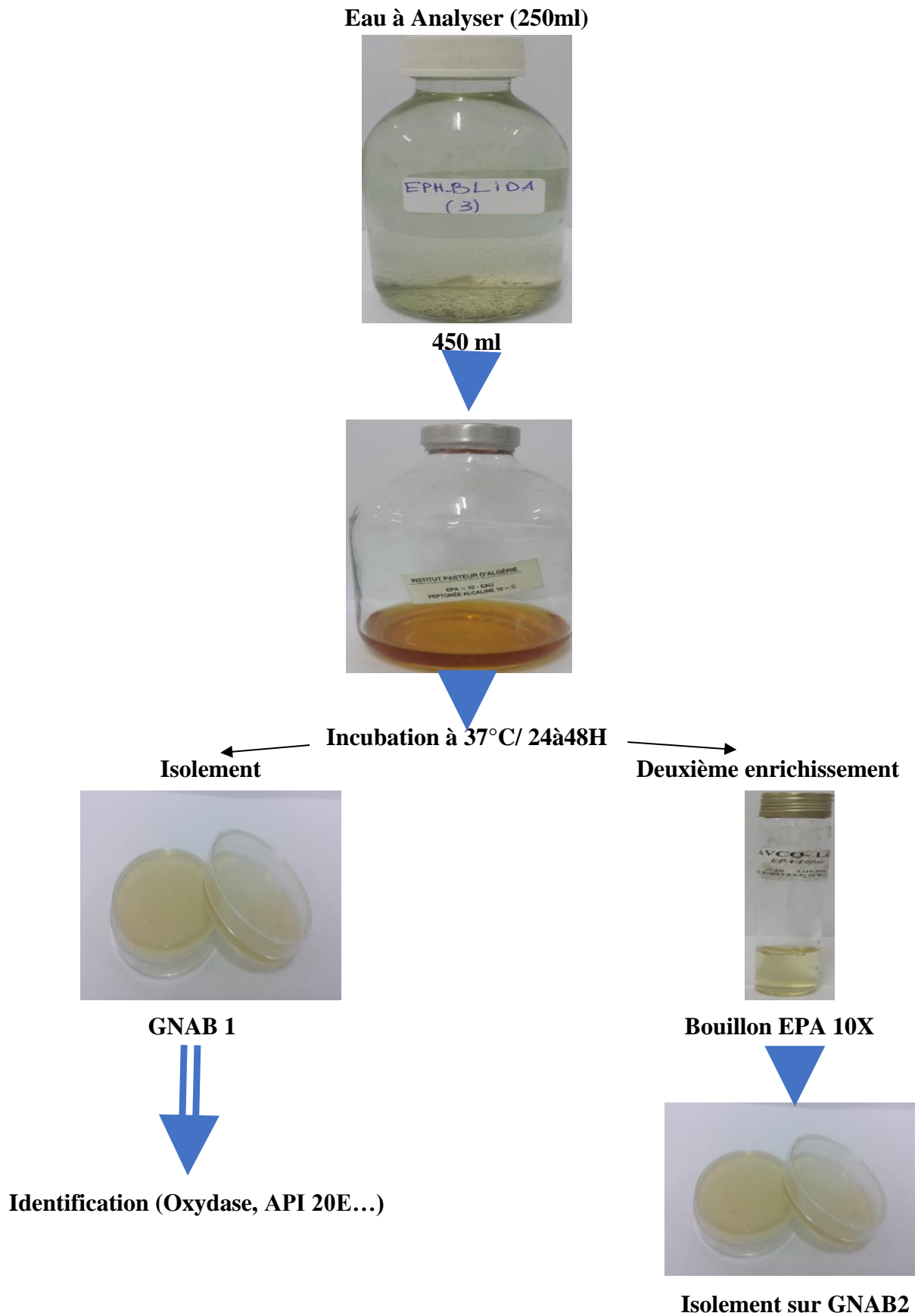
Ce flacon fera l'objet :

- D'une part, d'un deuxième enrichissement sur milieu EPA en tubes à raison de 1 ml
- D'autre part, d'un isolement sur gélose GNAB 1.

L'incubation se fait donc à 37°C pendant 24 h.

#### **c. Lecture des boîtes :**

- D'une part, le tube d'EPA fera l'objet d'un isolement sur GNAB 2,
- D'autre part, la boîte de gélose GNAB 1 subira une lecture en tenant compte du fait que les Vibrions se présentent le plus souvent sous forme de grosses colonies lisses et transparentes caractéristiques.



**Figure 11 : Recherche des *Vibrio* et *Aeromonas*.**

#### **d. Identification :**

Les colonies de Vibriion sont fines, blanches sur gélose hyperalcaline .L'identification est faite sur des colonies provenant de l'un et de l'autre de ces milieux comme suit :

##### **✚ Test de l'oxydase :**

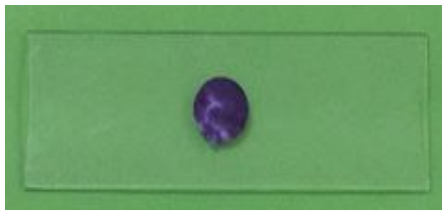
Le test de l'oxydase est fondé sur la production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire. En présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C, cette enzyme oxyde le réactif pour former un composé coloré en violet.

Les étapes du mode opératoire sont :

A l'aide d'un ose bouclée ou d'une pipette Pasteur, étaler la colonie sur un disque imprégné d'une solution aqueuse à 1% de chlorhydrate de diméthyle para-phéryleine diamine.

##### **Lecture :**

La réaction est instantanée, formation d'un complexe violet au contact de cette enzyme indique un test positif (Figure12). La bactérie est dite : oxydase positive. La réaction tardive ou absence de couleur indique un test négatif (Figure13).



**Figure 12 :** Oxydase positive



**Figure 13 :** Oxydase négative.

##### **✚ Galerie biochimique API 20E :**

La galerie API 20E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (Figure14).

La lecture de ces réactions se fait à l'aide d'un logiciel d'identification ou catalogue analytique.

## Mode opératoire :

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.
- A l'aide d'une pipette, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé d'une culture jeune.
- Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu
- Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette ou seringue médicale selon le type du test :
  - Pour les tests CIT, VP, GEL remplire tube et cupule.
  - Pour les autres tests, remplir uniquement les tubes (et non pas les cupules)
  - Pour les tests : ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Renfermer la boîte d'incubation.
- Incubation à 37°C pendant 18-24 heures.

## Lecture :

Après la durée d'incubation révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

- Test TDA : 1goutte de réactif TDA
- Test IND : 1 goutte de réactif Kovacs
- Test VP : 1goutte de réactifs VP1 et VP2.

La lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture (Tableau XXV, Annexe II). L'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification :

### ➤ Détermination du profil numérique :

Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. La galerie API 20 E comportant 20 tests, en additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres ; la réaction de l'oxydase qui constitue le 21ème test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive.

### ➤ Lecture :

A l'aide du logiciel d'identification api web <sup>TM</sup> : Entrer manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres



Figure 14 : Galerie API 20E.

### I.3.2.6. Recherche de *Pseudomonas aeruginosa*

#### a. Isolement

Étaler 0,5 ml d'eau à la surface de la gélose au cétrimide. Incuber à 37°C pendant 24 heures.

#### b. Lecture

Les colonies de *Pseudomonas aeruginosa* ont un diamètre de 1,5 à 2 mm, un contour circulaire, une surface lisse et brillante, une couleur blanc-crème, un aspect muqueux et sont parfois déjà accompagnées d'une production de pigment bleu-vert qui commence à diffuser avec émission de fluorescence sous U.V, (Rodier et al., 1996).

#### c. Identification

Pour la confirmation de *P. aeruginosa*, procéder aux différents tests biochimiques d'identification communs, cités précédemment, et réaliser les recherches plus spécifiques suivantes :

#### d. Recherche des pigments spécifiques

L'élaboration des pigments est influencée par la composition du milieu, ce qui justifie l'utilisation de deux milieux différents :

- **La production de pyocyanine** : est due spécifiquement à *P. aeruginosa*. Elle est favorisée par la présence d'ions inorganiques et de certains acides aminés qui composent le milieu King A. Les colonies typiques sur ce milieu sont colorées en bleu-vert, parfois en brun-rose, (Ould Brahim Elkory, 1998) (Figure15).

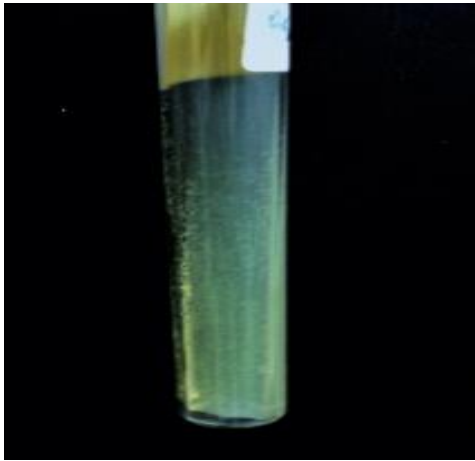
- **La production de pyoverdine** : caractéristique du groupe fluorescent, elle se manifeste par une coloration jaune-verte est dépend de la nature des peptones. Elle est favorisée par une teneur élevée en phosphate présents dans le milieu King B (Figure16).

Nous avons procédé comme suit :

Ensemencer les deux milieux : King A et King B en faisant une strie médiane à la surface de la gélose. Fermer les tubes sans serrer et incuber à 37°C pendant 24-48 heures, (**Delarras, 1998 ; Ould Brahim Elkory, 1998**).

### Lecture

La présence de pigments diffusibles se traduit par l'apparition d'une couleur qui peut diffuser sur toute la pente, (**Guillaume, 2004**).



**Figure 15** : Pyocyanine sur milieu King A.



**Figure 16** : Pyoverdine sur milieu King B

### I.3.3. Technique de dénombrement NF ISO 7218

Le but de numération (ou du dénombrement) est de déterminer la concentration des bactéries contenues dans une préparation initiale, elles nécessitent une ou plusieurs dilutions décimales.

Durant cette étude, la technique utilisée pour le dénombrement des *Pseudomonas* et des *Aeromonas* est le dénombrement sur milieu solide (en surface). Elle s'effectue selon la norme NF ISO 7218 (Manipulation réaliser en ensemencement 2 boites par dilution)

#### Mode opératoire

- A partir d'une suspension bactérienne, préparer une série de dilution décimale.
- Prélever un volume précis à l'aide d'une pipette stérile de 1 ml
- Déposer 0,1 ml au centre de la gélose pour les 2 boites de pétrie
- Etaler à l'aide d'une pipette râteau le volume sur toute la gélose.
- Incubation à 37 °C pendant 24 heures.

#### Lecture

Observation de la croissance des bactéries qui possèdent un aspect macroscopique caractéristique.

#### Exploitation des résultats

Le dénombrement des colonies se fait par calcul manuel. On procède au comptage des colonies en surface sur les boites interprétables contenant entre 30 et 300 colonies.

La concentration bactérienne  $N$  est calculée en UFC/ml en utilisant la relation  $N = \frac{\sum C}{(V \cdot 1.1 \cdot d)}$   
d'où :

- $\sum C$  : somme des colonies comptées sur les 2 boites retenues.
- $V$  : volume de l'inoculum (0,1 ml)
- $d$  : dilution correspondant à la première boite retenue, avec l'inoculum le moins dilué

### **I.3.4. Antibiogramme**

L'antibiogramme est un examen de laboratoire courant, qui consiste en la détermination de la sensibilité d'une bactérie aux antibiotiques.

La méthode de diffusion dite « des disques » en milieu solide est la plus simple. Elle est réalisée dans une boîte de Pétri et consiste à ensemencer en surface un milieu solide par inondation de la souche à tester. Des quantités connues de composés antimicrobiens sont déposées sur des disques de papier-filtre qui sont ensuite placés en surface de la gélose. Le développement ou non des bactéries autour du disque renseigne sur la sensibilité de la bactérie à l'antibiotique testé (**Crouzilles, 2012 ; Madigan et Martinko, 2007**)

Nous avons suivi le protocole suivant :

#### **a. Préparation de l'inoculum**

L'inoculum est préparé de façon à obtenir après incubation des colonies juste confluentes. Il est obtenu à partir d'une culture jeune de 18 à 24 heures, (**Antibiogramme en diffusion, 1998**).

Prélever au moins 3 colonies de la bactérie et émulsionner dans 5 ml de l'eau physiologique stérile.

#### **b. Ensemencement**

L'ensemencement se fait par la méthode de Kirby-Bauer, par écouvillonnage.

- Plonger un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne et laisser s'imbiber.
- Le sortir du tube en l'essorant doucement sur la paroi.
- Ensemencer la boîte de Mueller-Hinton dont l'épaisseur de la gélose est de 4mm, en frottant l'écouvillon sur sa surface et en tournant la boîte 3 fois de 60° afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum.
- Laisser sécher les boîtes pendant 15 à 20 minutes.

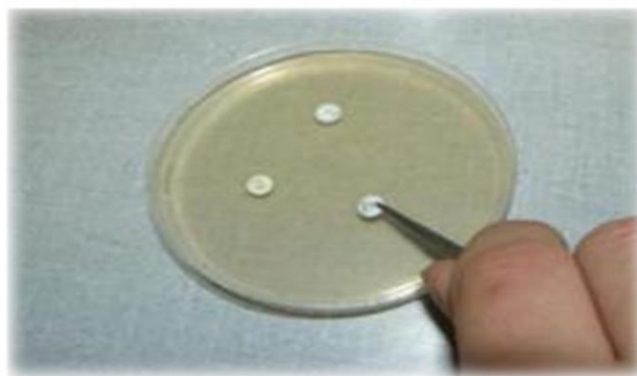
#### **c. Application des disques et incubation**

- Appliquer les disques d'ATB (Tableau IV) à l'aide d'une pince préalablement flambée, en appuyant légèrement (Figure17).
- Ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotique sur une boîte de 90mm.
- Laisser les boîtes 20min à la température ambiante pour permettre une pré-diffusion de l'antibiotique.
- Incuber à 37°C pendant 16 à 18h.



**Tableau IV** : Noms, abréviations et charge des disques d'antibiotiques utilisés durant cette étude.

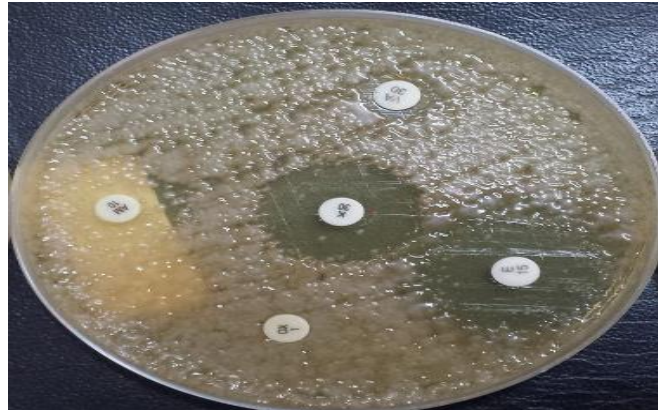
Classe d'antibiotique	Antibiotique	Abréviation	Charge du disque
<b>Béta-lactamines</b>	Pénicilline G	P	10µg
	Amoxicilline	AX	30µg
	Oxacilline	OX	10µg
	Ampicilline	AM	10µg
	Imipénème	IMP	10µg
	Céfazoline	CZ	30µg
	Céfotaxime	CTX	30µg
<b>Glycopeptides</b>	Vancomycine	VA	30µg
<b>Polypeptides basiques</b>	Colistine	CL	10µg
<b>Quinolones</b>	Ofloxacine	OFX	5µg
<b>Phénicoles</b>	Chloramphénicol	C	30µg
<b>Cyclines</b>	Tétracycline	TE	30µg
<b>Aminosides</b>	Kanamycine	K	30µg
	Tobramycine	TOB	10µg
	Gentamicine	GEN	10µg
	Streptomycine	S	100µg
<b>Macrolides</b>	Linomycine	L	15µg
	Erythromycine	E	15µg
	Clindamycine	CD	15µg
<b>Autres</b>	Acide fusidique	FA	10µg
	Metronidazole	MET	5µg
	Pristinamycine	PT	15µg



**Figure 17** : Photo montrant l'application des disques d'antibiotiques sur milieu Mueller-Hinton.

#### d. Lecture

Pour chaque antibiotique : mesurer le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse ; au revers de la gélose, et reporter cette mesure sur l'échelle de concordance correspondante (Figure18).



**Figure 18 : Zones d'inhibition.**

Les bactéries sont classées dans l'une des catégories R, I, S par la comparaison de la zone d'inhibitions aux valeurs critiques citées dans la standardisation de l'antibiogramme à l'échelle national (Tableau XXVI, XXVII, Annexe II).

Les trois catégories de sensibilité aux antimicrobiens sont définies comme suit :

- Sensible (S) : l'infection provoquée par la souche testée répondra probablement au traitement par cet antibiotique.
- Résistant (R) : l'infection provoquée par la souche testée ne répondra probablement pas au traitement à cet antibiotique.
- Intermédiaire (I) : la réponse au traitement est imprévisible.

#### I.3.5. Souches de référence

Afin de valider les différents tests effectués, nous avons utilisé des souches de référence (Tableau V) provenant de l'Institut Pasteur d'Algérie qui sont les suivantes :

**Tableau V : Souches de référence utilisées dans cette étude.**

Souches	Référence
<i>Staphylococcus aureus subspecies aureus</i>	ATCC 25923
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853

### I.3.6. Indice MAR (Multiple Antibiotic Resistances)

L'indice MAR a été recommandé par Krumperman (1983) dans le but d'évaluer le risque de la contamination de l'environnement par les antibiotiques. Les indices MAR ont été calculés pour chaque isolat et site d'échantillon en utilisant les approches indiquées ci-dessous et les tableaux (VI, VII) :

✚ Pour les isolats,

$$\text{Indice MAR} = \frac{\text{Nombre des antibiotiques auxquels l'isolat était résistant}}{\text{Total des antibiotiques testés}}$$

**Tableau VI :** Interprétation de l'indice MAR pour un isolat.

	<b>Indice MAR &gt; 0,2</b>	<b>Indice MAR &lt; 0,2</b>
Risque de contamination	Elevée	Absence ou très faible
Utilisation des antibiotiques	Importante	Rare

✚ Pour les sites,

$$\text{Indice MAR pour un site} = \frac{\text{Nombre d'antibiotiques pour lequel tous les isolats sont résistants}}{\text{Nombre des isolats présents dans le site} \times \text{Nombre des antibiotiques testés}}$$

**Tableau VII :** Interprétation de l'indice MAR pour un site.

	<b>Indice MAR &gt; 0,4</b>	<b>Indice MAR &lt; 0,4</b>
Risque de contamination	Élevée	Absence ou très faible
Origine de la contamination	Humaine	Non humaine

A blue ribbon graphic with a central rectangular box containing text. The ribbon has a 3D effect with shadows on the bottom and sides.

# Résultats et interprétation

## II. RESULTATS ET INTERPRETATION

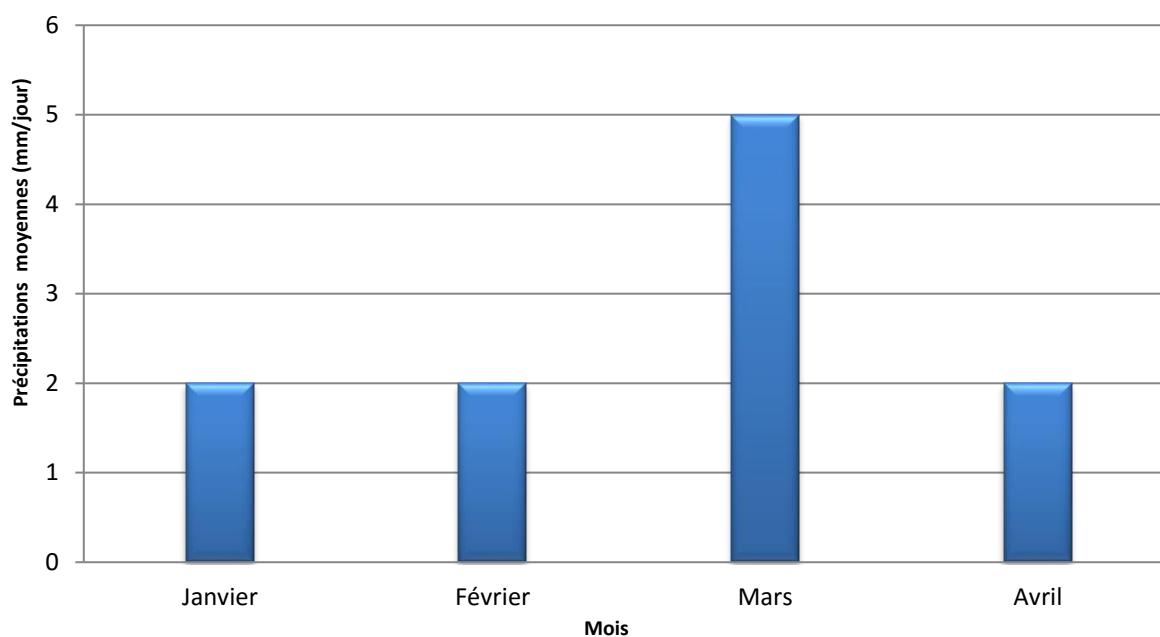
Cette étude a été réalisée depuis le 31 janvier jusqu'au 2 Mai 2016 au laboratoire de l'Hygiène de la Wilaya de Blida. Au total, 24 prélèvements ont été effectués à partir des effluents de trois établissements de santé (Brahim Tirichine, Frantz Fanon et Ben Bouali) situés dans les différents points de la wilaya de Blida.

### II.1. Précipitations

Durant la période de notre étude, les résultats ont montré que le mois de Mars reçoit la quantité de pluies la plus importante (le record maximum de précipitation sur une journée était de 60 mm) par rapport aux autres mois, avec une précipitation totale de 153 mm (Tableau VII). Pour les autres mois, les précipitations varient entre un minimum de 37 mm enregistré pour le mois de Janvier et 58 mm pour le mois d'Avril (Figure 19).

**Tableau VII :** Taux de précipitation durant cette étude.

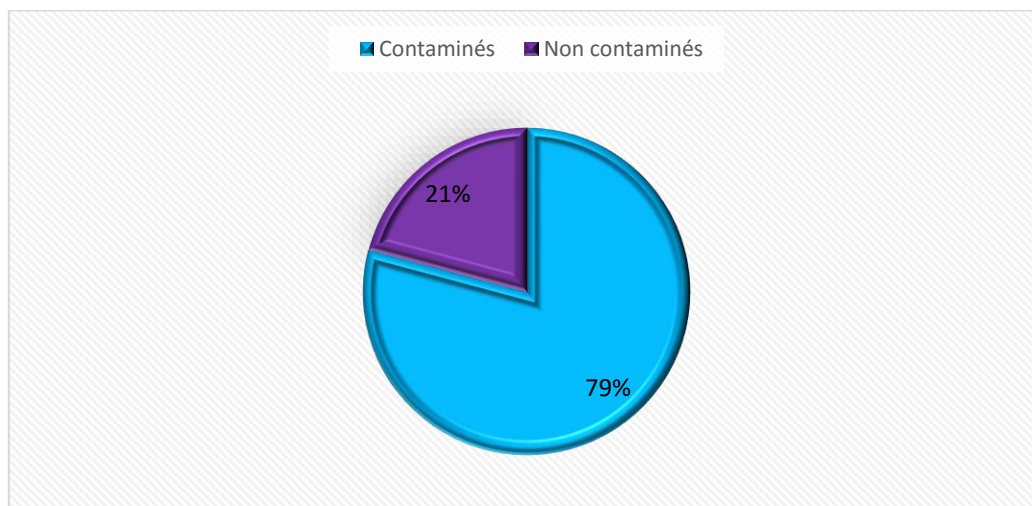
Mois / Précipitation	Janvier	Février	Mars	Avril
Précipitations moyennes par jour (mm)	2	2	5	2
Record de précipitation sur une journée (mm)	14	13	60	22
Précipitation totale sur le mois (mm)	37	48	153	58



**Figure 19 :** Précipitations moyennes (mm/jour) enregistrés pendant cette étude.

## II.2. Contamination des échantillons des effluents provenant de l'ensemble des sites étudiés

Dans les 24 prélèvements effectués, 19 prélèvements se sont révélés contaminés et 5 prélèvements ne sont pas contaminés (Figure 20).



**Figure 20 :** Répartition des échantillons contaminés et non contaminés.

Parmi les 19 échantillons contaminés, sept échantillons soit 36,84% sont issus des effluents de l'hôpital Brahim Tirichine, et six échantillons (31,58%) sont issus des eaux usées pour chacun des deux autres hôpitaux à savoir Frantz Fanon et Ben Bouali (Tableau IX).



**Tableau IX :** Nombre des échantillons contaminés dans les différents sites de prélèvement


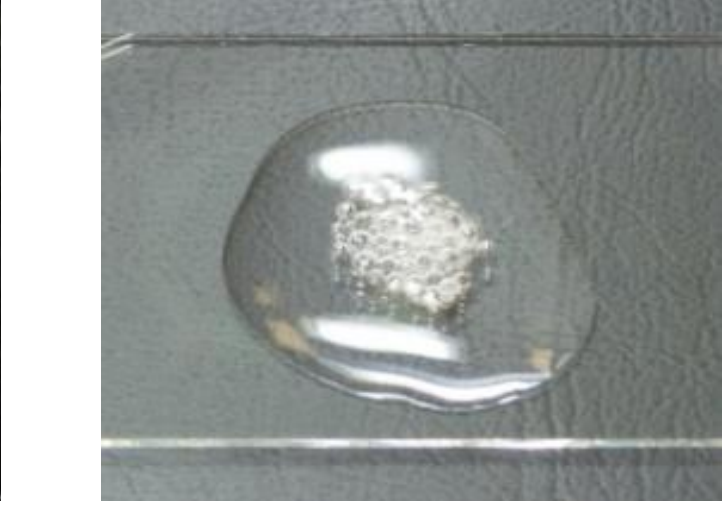


Site	Effluents (Brahim Tirichine)	Effluents (Ben Bouali)	Effluents (Frantz Fanon)	Total
Nombre d'échantillons contaminés	7	6	6	19
Pourcentage %	36,84	31,58	31,58	100

## II.3. Germes isolés dans l'ensemble des effluents étudiés

Les résultats de l'identification par la méthode NPP, les tests biochimiques et par la galerie API 20E sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau X** : Illustration de l'identification par les tests biochimiques

Test biochimique	Test positif																				Souches identifiés	
API 20 <sup>E</sup>	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+		 <i>Aeromonas hydrophila</i>
	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+		
NPP	(Voir Figure 3)																				<i>Streptococcus</i> du groupe D	

			
<p>Catalase + Coagulase</p>			<p><i>Staphylococcus aureus</i></p>
<p>Milieu V.F</p>	<p>(Voir Figure 5)</p>		<p><i>Clostridium-ASR</i></p>

- : Test négatif ; + : Test positif



## II.4. Espèces identifiées

Sur les 37 souches identifiées, nous avons noté qu'*Aeromonas hydrophila* occupait la 1<sup>ère</sup> position (9 souches) avec un taux de 24,32%, suivie par *Staphylococcus aureus* et *Clostridium-ASR* (8 souches chacun) avec un taux de 21,62%. *Streptococcus* du groupe D vient en 3<sup>ème</sup> position (7 souches) avec un taux de 18,92%, suivie par *Pseudomonas aeruginosa* (4 souches) avec une fréquence de 10,82%, et en dernier, *Vibrio fluvialis* (1 souche) avec un taux de 2,7% (Figure 21).

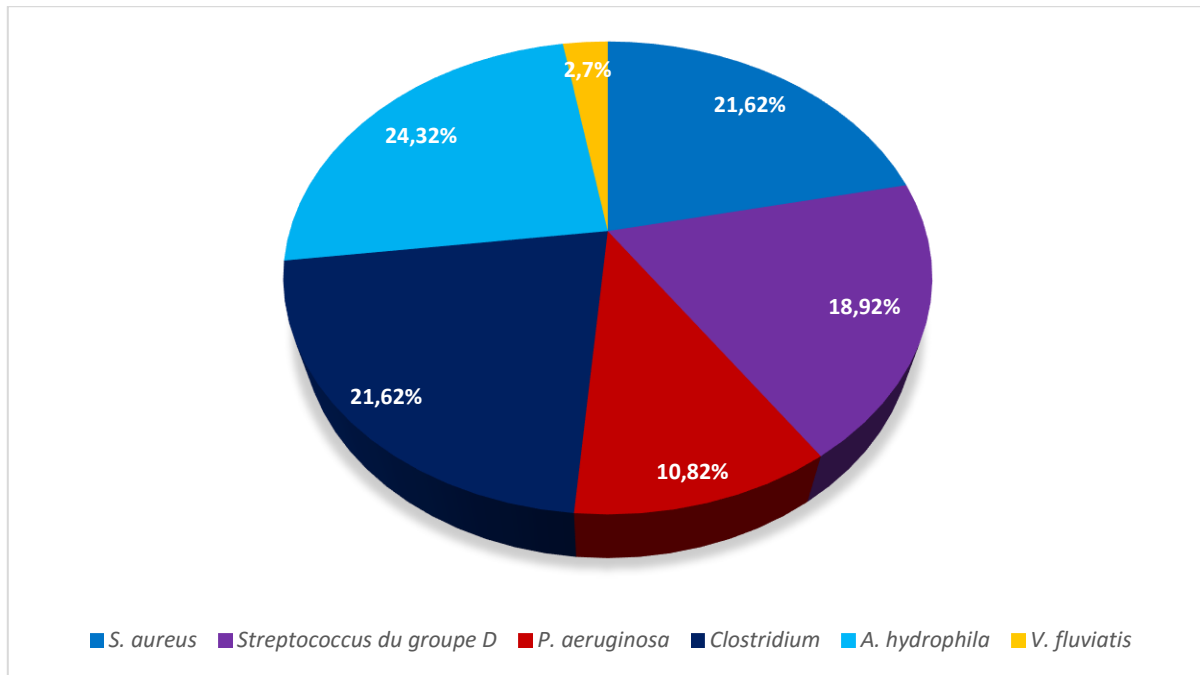


Figure 21 : Répartition globale des différentes espèces isolées.

## II.5. Dénombrement des germes

La présence des germes identifiés diffère d'un prélèvement à un autre selon le lieu et la date de prélèvement (Tableau XI).

En effet, nous avons remarqué que le taux de précipitation jouait un rôle très important dans la diminution de la charge bactérienne (Tableau XXVIII, Annexe II).

### ***Streptococcus* du groupe D**

Le nombre moyen des *Streptococcus* du groupe D est de 550 UFC/ml au niveau des effluents de l'hôpital Brahim Tirichine. Alors que 500 et 300 UFC/ml respectivement sont dénombrés dans les effluents de l'hôpital Ben Bouali et l'hôpital Frantz Fanon.

### ***Aeromonas hydrophila***

Le dénombrement a révélé la présence de  $59,05 \times 10^6$  UFC/ml dans les eaux usées de l'hôpital Brahim Tirichine,  $10,5 \times 10^6$  UFC/ml au niveau des effluents de l'hôpital Ben Bouali et une charge bactérienne moyenne de  $60,65 \times 10^6$  UFC/ml dans ceux de l'hôpital Frantz Fanon.

### ***Pseudomonas aeruginosa***

Une moyenne de  $88,05 \times 10^6$  UFC/ml a été dénombrée au niveau des eaux usées de l'hôpital Brahim Tirichine,  $50,05 \times 10^6$  UFC/ml a été dénombré au niveau des effluents de l'hôpital Frantz Fanon.

### ***Vibrio fluvialis***

Apparition d'une seule fois au niveau des effluents de l'hôpital Brahim Tirichine, avec une concentration bactérienne de  $70 \times 10^6$  UFC/ml.

### ***Clostridium sulfito-réducteurs***

Le nombre moyen des spores est variable selon les sites du prélèvement où nous avons dénombré 39 spores/20ml au niveau des eaux rejetées par l'hôpital Brahim Tirichine et une moyenne de 44 spores/20ml dans les effluents de l'hôpital Ben Bouali et 153 spores/20ml au niveau de l'hôpital Frantz Fanon.

### ***Staphylococcus aureus***

La moyenne la plus élevée 1000 UFC/ml a été dénombré au niveau des effluents de l'hôpital Brahim Tirichine et 400 UFC/ml dans les eaux usées de l'hôpital Ben Bouali et 325 UFC/ml dans celles de Frantz Fanon.

**Tableau XI :** Nombre des souches et moyennes des charges bactériennes dans les trois sites d'étude.

	Effluents Brahim Tirichine		Effluents Ben Bouali		Effluents Frantz Fanon	
	N.g	$\bar{x}.C$	N.g	$\bar{x}.C$	N.g	$\bar{x}.C$
<b>Strep</b>	2	550UFC/ml	3	500 UFC/ml	2	300 UFC/ml
<b>Aero</b>	4	59,05x10 <sup>6</sup> UFC/ml	1	10,5x10 <sup>6</sup> UFC/ml	4	60,65x10 <sup>6</sup> UFC/ml
<b>Pseudo</b>	2	88,05x10 <sup>6</sup> UFC/ml	0	-	2	50,05x10 <sup>6</sup> UFC/ml
<b>Vib</b>	1	-	0	70x10 <sup>6</sup> UFC/ml	0	-
<b>Clos</b>	2	39spore/20ml	4	44 spore/20ml	2	153 spore/20ml
<b>Staph.a</b>	1	1000 UFC/ml	3	400 UFC/ml	4	325 UFC/ml

N.g : Nombre de fois où le germe est apparu

- : Absence

Strep : *Streptococcus du groupe D*

Aero : *Aeromonas hydrophila*

Pseudo : *Pseudomonas aeruginosa*

Vib : *Vibrio fluvialis*

Staph.a : *Staphylococcus aureus*

$\bar{x}.C$  : Moyenne des nombres des colonies dans les prélèvements

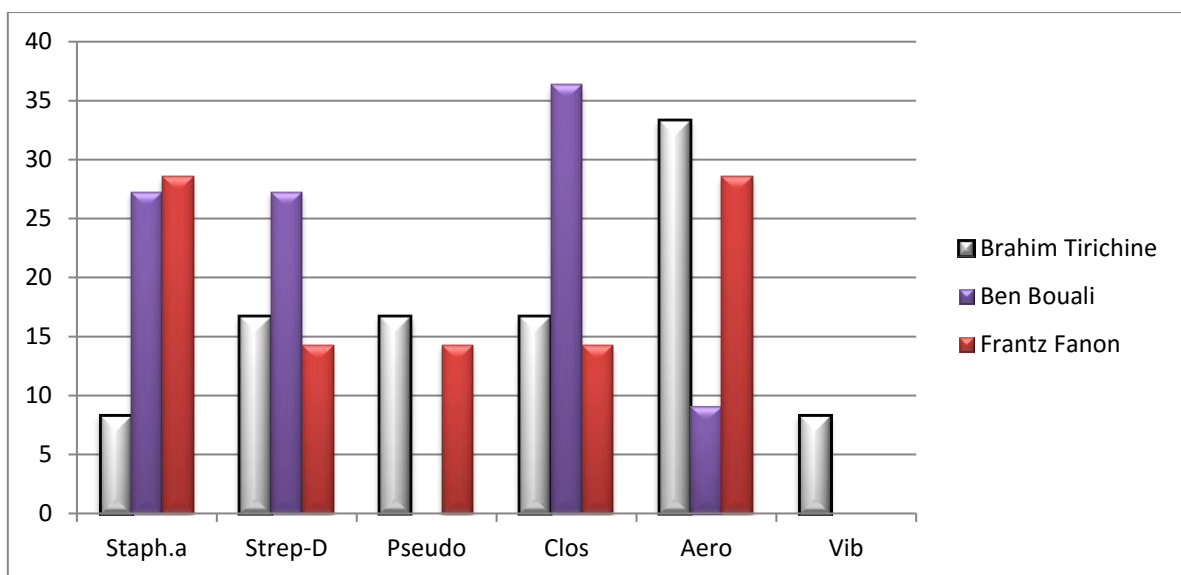
## II.6. Répartition des espèces identifiées selon les différents sites de prélèvement

Nous avons remarqué une variabilité dans la distribution des germes identifiés. Sur les 37 espèces répertoriées, 14 (37,84%) souches provenaient des effluents de l'hôpital Frantz Fanon, 12 souches (32,43%) des eaux usées rejetées par l'hôpital Brahim Tirichine et 11 souches (29,72%) ont été collectées au niveau des effluents de l'hôpital Ben Bouali (Tableau XII).

**Tableau XII :** Répartition et pourcentage des souches dans les effluents des 3 sites d'étude.

Effluents /Hôpital	Brahim Tirichine	Ben Bouali	Frantz Fanon	Total
<b>Nombre de souches</b>	12	11	14	37
<b>Pourcentage %</b>	32,43	29,72	37,84	100

- ❖ Pour les eaux usées rejetées par l'hôpital Brahim Tirichine : 4 souches (33,33%) appartiennent à *Aeromonas hydrophila*, suivie par 2 souches (16,67%) de *Clostridium* ASR, 2 souches (16,67%) pour *Streptococcus* du groupe D et 2 souches (16,67%) pour *Pseudomonas aeruginosa*. *Vibrio fluvialis* et *Staphylococcus aureus* sont représentés par une seule souche chacun (8,33%) (Figure 22).
- ❖ Pour les effluents de l'hôpital Ben Bouali, la 1<sup>ère</sup> place était occupée par *Clostridium* ASR dont le nombre de souches était de 4 (36,36%), suivie par *S. aureus* et *Streptococcus du groupe D* avec chacun 3 souches (27,27%) et *A. hydrophila* avec une seule souche (9,1%).
- ❖ Pour les eaux rejetées par l'hôpital Frantz Fanon, la 1<sup>ère</sup> position était occupée par *S. aureus* et *A. hydrophila* avec une fréquence de 28,6% (4 souches) pour chacun, suivi par *Streptococcus du groupe D*, *P. aeruginosa* et *Clostridium* ASR avec un taux de 14,28% (2 souches) pour chacun.



**Figure 22 :** Répartition des différentes espèces isolées au niveau des effluents des trois sites étudiés

## II.7. Antibiorésistance des espèces identifiées

Chaque souche identifiée a été soumise à un antibiogramme afin de déterminer sa sensibilité aux antibiotiques (Tableau IV). Rappelons que, l'antibiogramme a été réalisé par la méthode de diffusion des disques sur gélose Muller-Hinton et interprété après la mesure des diamètres des zones d'inhibition selon (SAEN, 2011).

### II.7.1. *Aeromonas hydrophila*

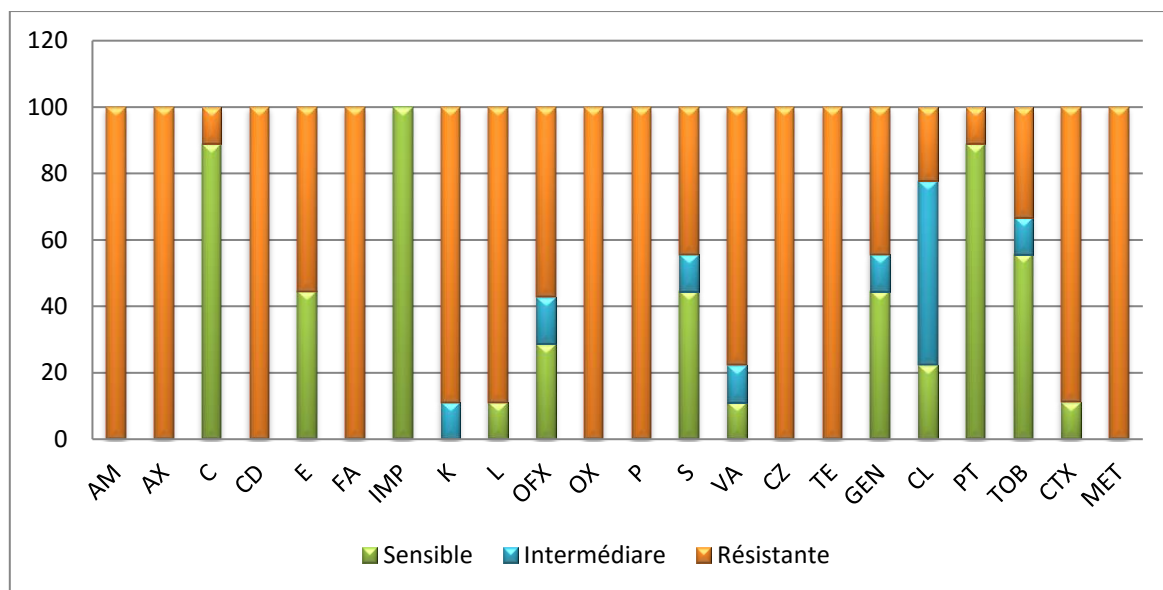
L'analyse des résultats de l'antibiogramme a montré que les souches d'*Aeromonas hydrophila* résistent avec un taux de 100% aux différents antibiotiques suivant : Tétracycline, Acide fusidique, Méthronidazole, les Béta-lactamines. A l'exception de la Cefotaxime, où nous avons observé un taux de résistance de 88,9% (Figure 23).

Ainsi une résistance élevée à la Vancomycine (77,8%), les macrolides comme : Clindamycine (100%), Lincomycine (88,9%), Erythromycine (55,5%) a été notée.

Pour les Aminosides, une résistance importante a été observée (88,9%) vis-à-vis de la Kanamycine. Les taux les plus bas sont enregistrés pour la Streptomycine (44,44%), la Gentamicine (44,44%) et la Tobramycine (33,33%).

Des taux de 55,4% pour l'Ofloxacine, 22,22% vis-à-vis de la Colistine et 11,1% pour le Chloramphénicol et la Pristinamycine ont été observés.

Toutes les souches d'*A. hydrophila* ont un taux de sensibilité très élevé (100%) vis-à-vis de l'Imipènème qui inhibe la croissance bactérienne de ce type de souches.



**Figure 23 :** Pourcentage de l'antibiorésistance chez les souches d'*Aeromonas hydrophila*.

### ❖ Phénotype de résistance

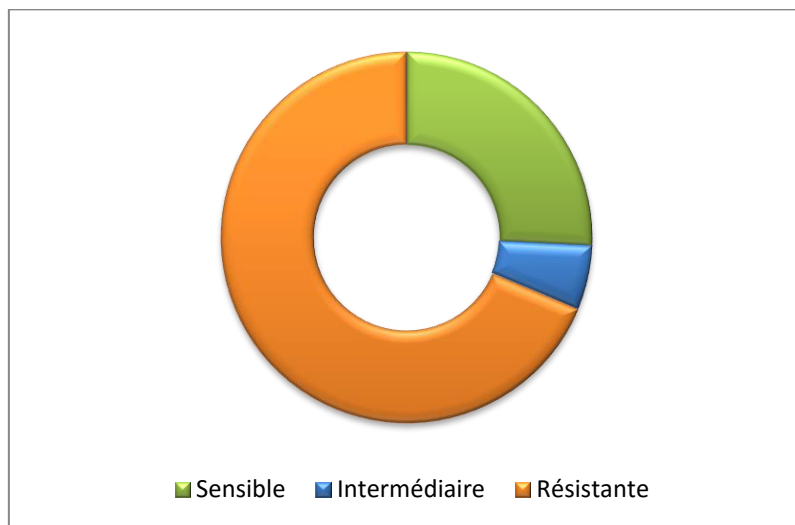
L'analyse des résultats obtenus sur l'antibiorésistance des 9 souches d'*A. hydrophila* montre qu'elles sont résistantes aux Tétracycline, Acide fusidique, Métronidazole, Clindamycine, Linomycine (pour ce dernier antibiotique à l'exception d'Aero2) et les Béta-lactamines (à l'exception d'Aero 3 donne une résistance à la Céfotaxime).

Parmi ces souches seulement Aero 2 et Aero 5 (isolées à partir de 2<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> prélèvement, voir Tableau XVIII) expriment une résistance à la Vancomycine, alors qu'Aero 6 et Aero 8 sont résistantes à la Colistine.

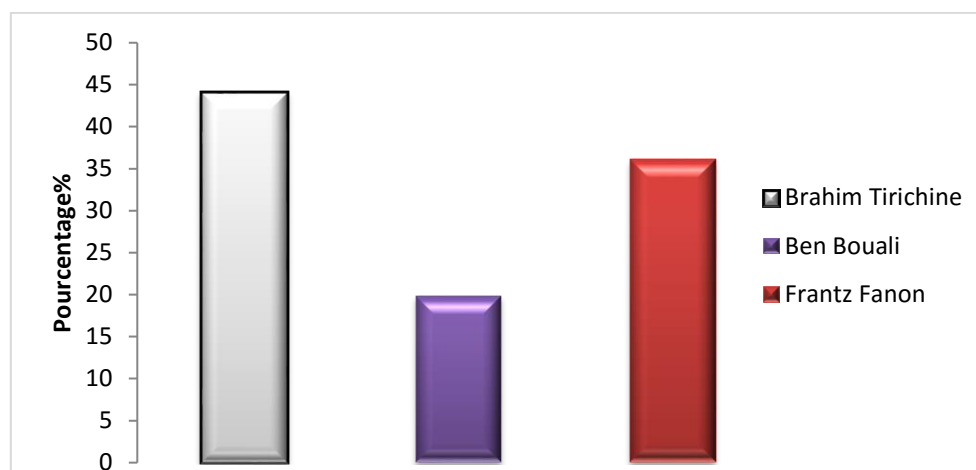
Concernant la résistance aux Quinolones (Ofloxacine), a été obtenue par 4 souches (Aero3, 5, 6 et 7). Pour les Aminosides, de même que pour la Tobramycine, 3 souches (Aero2, 3 et 7) résistent, alors que les souches Aero1, 2, 6 et 8 résistent à la Gentamicine. La souche Aero1 est la seule insensible aux Chloramphénicol et Pristinamycine (Tableau XIII).

Un taux de 136 (68,7%) sur 198 cas testés (Figure 24) est considéré comme résistant. La répartition par sites de prélèvement montre que la première position était occupée par les

effluents de l'hôpital Brahim Tirichine avec un taux de 44,12% (62 cas) (Figure 25), 36,03% (60 cas) pour les effluents de l'hôpital Frantz Fanon. La dernière position revient aux eaux usées de l'hôpital Ben Bouali avec 19,85% (14 cas) cas résistants.



**Figure 24 :** Pourcentage de résistance globale des souches *Aeromonas hydrophila*



**Figure 25 :** Répartition des souches *Aeromonas hydrophila* résistantes dans les 3 sites

**Tableau XIII** : Phénotype de l'antibiorésistance de toutes les souches isolées d'*Aeromonas hydrophila*

Souches	Bêta-lactamines	Glycopeptide	Polypeptide	Quinolone	Phénicolé	Cycline	Aminosides	Macrolides	Autres
Aero1	P ;AX ;OX ;AM;CZ ;CTX	VA	-	-	<b>C</b>	TE	K ; <b>GEN</b>	L ;CD	FA ;MET ; <b>PT</b>
Aero2	P ;AX ;OX ;AM;CZ ;CTX	-	-	-	-	TE	K ;TOB. <b>GEN</b>	CD	FA;MET
Aero3	P ;AX ;OX ;AM;CZ	VA	-	OFX	-	TE	K ;TOB	L ;CD	FA ;MET
Aero4	P ;AX ;OX ;AM;CZ ;CTX	VA	-	-	-	TE	K ;S	L ; CD	FA ;MET
Aero5	P ;AX ;OX ;AM;CZ ;CTX	-	-	OFX	-	TE	K ;S	L ; CD ;E	FA ;MET
Aero6	P ;AX ;OX ;AM;CZ ;CTX	VA	<b>CL</b>	OFX	-	TE	GEN	L ; CD ;E	FA ;MET
Aero7	P ;AX ;OX ;AM;CZ ;CTX	VA	-	OFX	-	TE	K ; TOB ; S	L ; CD ;E	FA ;MET
Aero8	P ;AX ;OX ;AM;CZ ;CTX	VA	<b>CL</b>	-	-	TE	K ; <b>GEN</b> ;S	L ; CD ;E	FA ;MET
Aero9	P ;AX ;OX ;AM;CZ ;CTX	VA	-	-	-	TE	K	L ; CD ;E	FA ;MET

Légendes :

- : Absence de résistance

Pénicilline G (P), Amoxicilline (AX), Oxacilline (OX), Ampicilline (AM), Imipénème (IMP), Céfazoline (CZ), Céfazoline (CTX), Vancomycine (VA), Colistine (CL), Ofloxacine (OFX), Chloramphénicol (C), Tétracycline (TE), Kanamycine (K), Tobramycine (TOB), Gentamicine (GEN), Erythromycine (E), Linomycine (L), Clindamycine (CD), Streptomycine (S), Acide fusidique (FA), Metronidazole (MET), Pristinamycine (PT).

## II.7.2. *Staphylococcus aureus*

Les résultats des 8 souches de *Staphylococcus aureus* montrent (Figure 26) une résistance très élevée (100%) vis-à-vis de la Métronidazole et de l'Acide fusidique.

Une diminution légère du taux de résistance vis-à-vis des Béta-lactamines dont l'Oxacilline (87,5%) et l'Amoxicilline et l'Ampicilline 75%.

Une résistance importante à la Kanamycine (87,5%) (en la comparant avec *Aeromonas hydrophila*) est observée.

Des taux moyens de résistance vis-à-vis des Aminosides dont la Streptomycine (62,5%), la Gentamicine (50%) ainsi que les macrolides (37,5-62,5%) ont été notés.

Une faible fréquence de résistance est constatée vis-à-vis de la Colistine (42,85%), la Vancomycine (20%) et la Pristinamycine (20%), l'Ofloxacine (12,5%) et la Chloramphénicol (12,5%).

L'Imipénème, la Tétracycline et la Tobramycine sont les seuls antibiotiques qui peuvent inhiber la croissance de la totalité des souches de *S. aureus* au niveau de tous les sites de prélèvement.

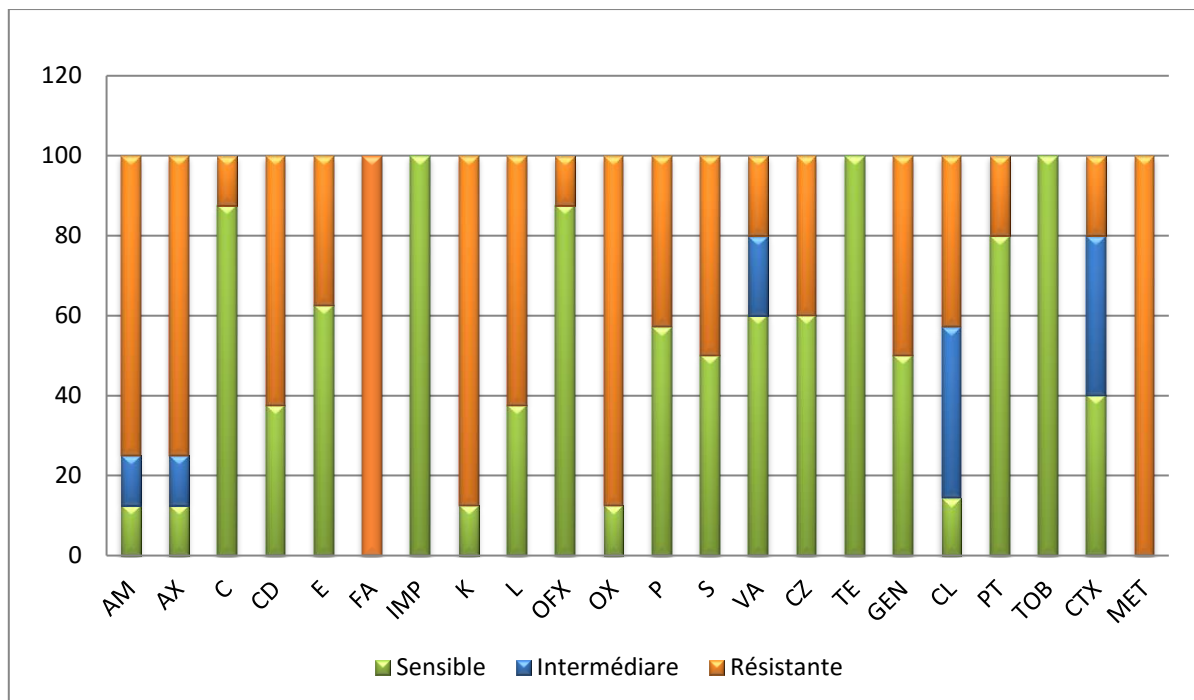


Figure 26 : Pourcentage de l'antibiorésistance chez les souches de *Staphylococcus aureus*.

### ❖ Phénotype de résistance

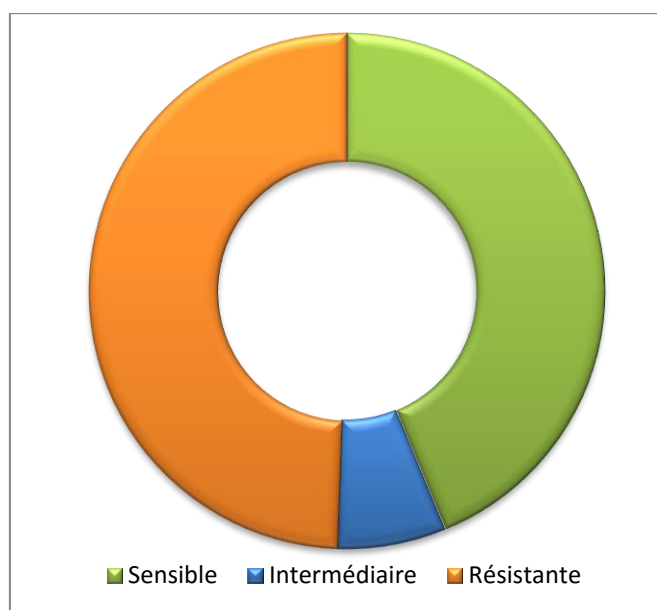
Toutes les souches de *S. aureus* sont résistantes à l'Acide fusidique et à la Métronidazole. À l'exception de Staph.a-1 (isolée dans le 1<sup>er</sup> prélèvement, voir Tableau XVIII), toutes les souches sont résistantes à la Kanamycine. Les isolats Staph.a-4, 5, 7 et 8 partagent le même profil de résistance vis-à-vis des Béta-lactamines, pour la Vancomycine 3 souches Staph.a-5, 7 et 8 sont résistantes à cet Glycopeptide.

Parmi les 8 isolats de *S. aureus*, la souche Staph.a-2 est résistante vis-à-vis du Chloramphénicol. La résistance à l'Ofloxacine est élevée uniquement pour Staph.a-5.

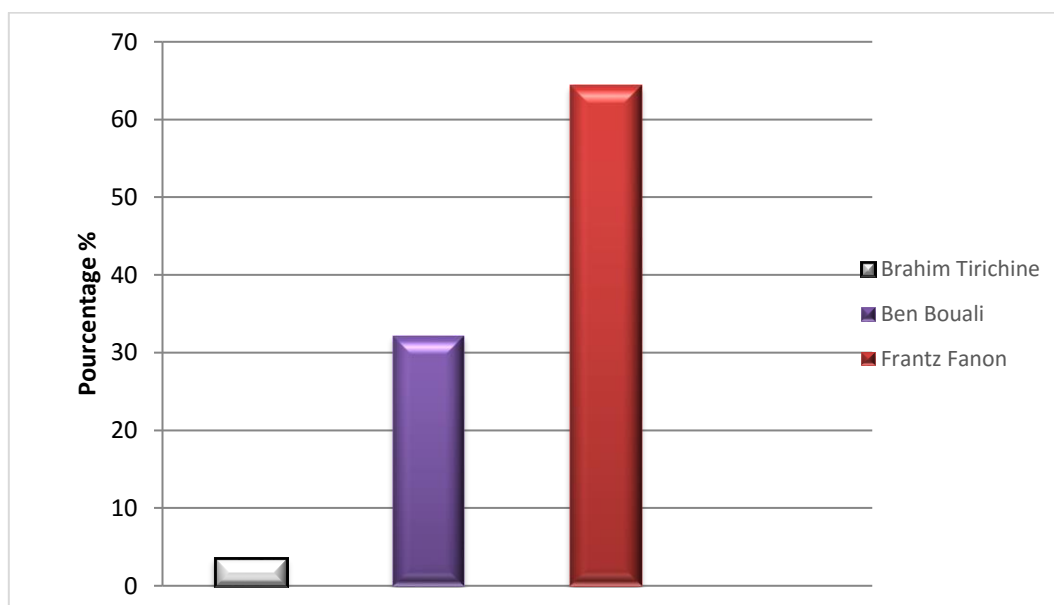


Concernant les Macrolides, 4 souches (Staph.a-2, 4, 5, 7 et 8) sont résistantes à la Linomycine et Clindamycine, alors que la résistance à l'Erythromycine est enregistrée par Staph.a-2, 5 et 7 (Tableau XIV).

Parmi les 176 tests d'antibiogramme qui ont été appliqués sur les souches de *S. aureus* (Figure 27), nous avons remarqué que 49,43% sont des cas résistants. Parmi les souches résistantes, 64,37% (56 cas) ont été enregistrés dans les effluents de l'hôpital Frantz Fanon (Figure 28), 32,18% (28 cas) au niveau des eaux usées de l'hôpital Ben Bouali et 3,45% (3 cas) pour ceux de l'hôpital Brahim Tirichine.



**Figure 27 :** Pourcentage de résistance globale des souches *Staphylococcus aureus*.



**Figure 28 :** Répartition des souches *Staphylococcus aureus* résistantes dans les 3 sites.

**Tableau XIV** : Phénotype de l'antibioésistance de toutes les souches isolées de *Staphylococcus aureus*

Souches	Béta-lactamines	Glycopeptide	Polypeptide	Quinolone	Phénicole	Cycline	Aminosides	Macrolides	Autres
Staph.a-1	OX	-	-	-	-	-	-	-	FA ;MET
Staph.a-2	AX ;OX ;AM	-	-	-	<b>C</b>	-	K	L ; CD ;E	FA ;MET
Staph.a-3	P;AX ;OX	-	-	-	-	-	K ;GEN ;S	-	FA ;MET
Staph.a-4	P ;AX ;OX ;AM ; CZ ;CTX	-	CL	-	-	-	K ;S	L ; CD	FA ;MET
Staph.a-5	P ;AX ;OX ;AM ; CZ ;CTX	VA	CL	<b>OFX</b>	-	-	K ;GEN ;S	L ; CD ;E	FA ;MET
Staph.a-6	AM ;CTX	-	-	-	-	-	K	-	FA ;MET
Staph.a-7	P ;AX ;OX ;AM ; CZ ;CTX	VA	CL	-	-	-	K ;GEN ;S	L ; CD ;E	FA ;MET
Staph.a-8	P ;AX ;OX ;AM ; CZ ;CTX	VA	-	-	-	-	K ;GEN ;S	L ; CD	FA ;MET

### II.7.3. *Streptococcus du groupe D*

Les 7 souches de *Streptococcus du groupe D* ont affiché (Figure 29) une résistance très élevée (100%) vis-à-vis des Aminosides (Kanamycine et Streptomycine), Colistine et Métronidazole.

Une augmentation de résistance (100%) est constatée pour la Céfotaxime par rapport à *Staphylococcus aureus* et *Aeromonas hydrophila*.

Nous relevons ainsi une résistance moyenne qui varie entre 14,3% et 57,14% vis-à-vis des Macrolides (Lincomycine (42,85%), Clindamycine (57,14%), Erythromycine (28,58)), des Béta-lactamines (Amoxicilline (42,85%), Céfazoline (42,86%), Oxacilline (28,57%)), l'Ofloxacine (42,85%), l'Acide fusidique (28,57%), la Tétracycline (28,57%), la Chloramphénicol (14,3%), la Pristinamycine (14,3%) ainsi que d'autres Aminosides comme la Gentamicine (28,7%) et la Tobramycine (28,56%).

L'Imipènème, l'Ampicilline, la Pénicilline G et la Vancomycine sont les antibiotiques les plus efficaces avec un taux de sensibilité plus élevé.

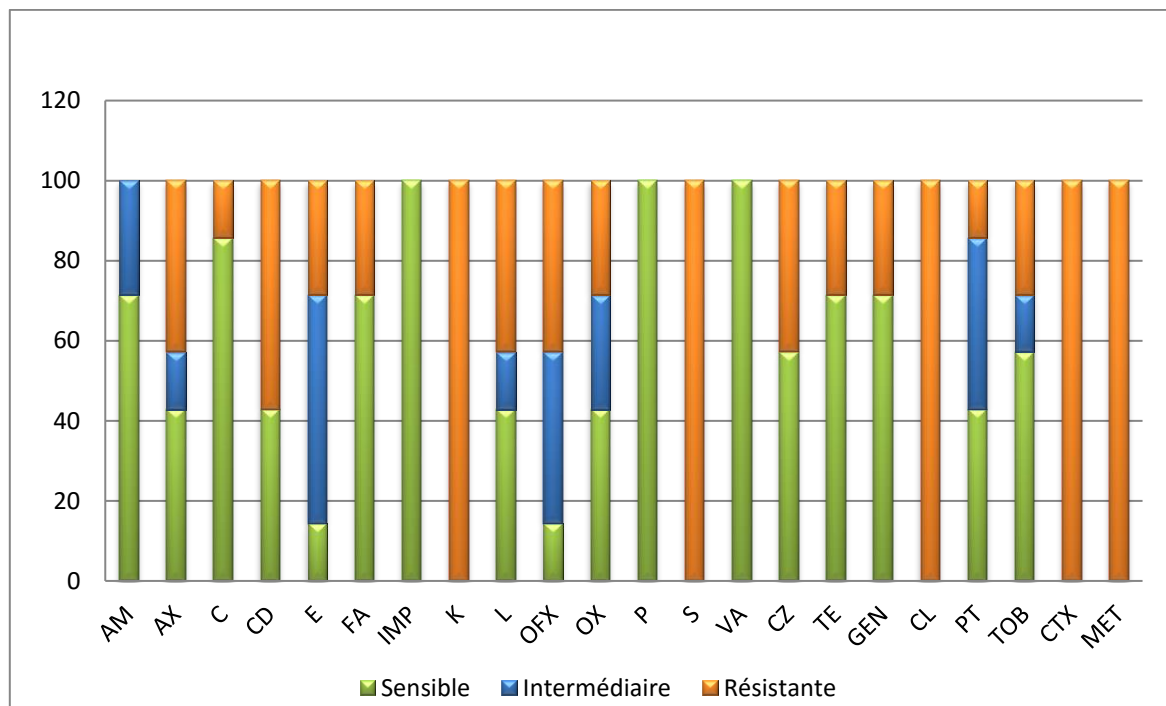


Figure 29 : Pourcentage de l'antibiorésistance chez les souches *Streptococcus du groupe D*.

#### ❖ Phénotype de résistance

Les 7 souches de l'espèce *Streptococcus du groupe D* ont une similarité de résistance aux Polypeptides basiques (Colistine), les Béta-lactamine (Céfotaxime), les Aminosides (Kanamycine, Streptomycine) et à la Métronidazole. Nous avons observé qu'il y a des différences de résistance à plusieurs antibiotiques entre ces souches d'où : les Strept-D1,-D2 et -D3 (isolées dans le 1<sup>er</sup> prélèvement, voir Tableau XVIII) sont les souches les plus résistantes

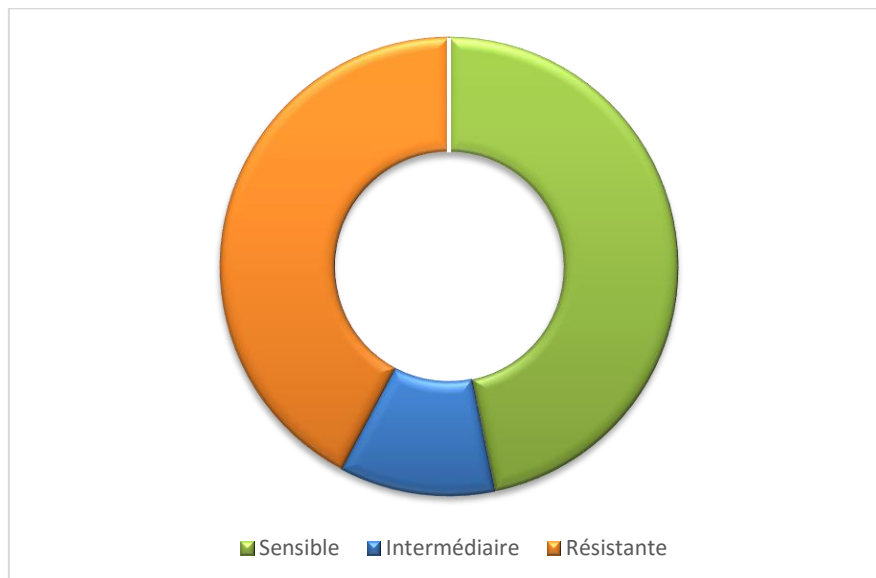
aux Béta-lactamines (Amoxicilline, Céfazoline), et Strept-D6 est la seule souche résistante à l'Oxacilline.

La résistance vis-à-vis des Quinolones (Ofloxacine) est apparue avec les Strept-D1,-D6 et -D7 uniquement. Alors que pour la Tétracycline, elle a été obtenue avec 2 souches Strept-D1 et -D4.

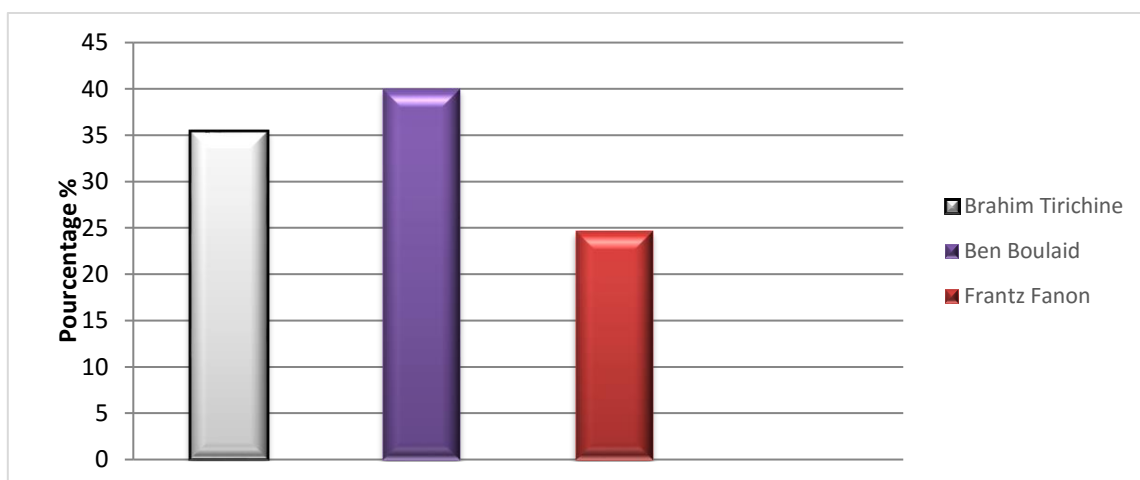
La seule souche résistante au Chloramphénicol est Strept-D6 et le seul cas de résistance à la Pristinamycine est enregistré par la souche Strept-D4 (Tableau XV).

La résistance des souches de Streptocoques Fécaux présente 42,21% (Figure 30) parmi la totalité des tests d'antibiogramme réalisés sur ces souches.

Leur distribution est la suivante : 35,38% (19 cas) sont issues des effluents de l'hôpital Brahim Tirichine, 40% (26 cas) de l'hôpital Ben Bouali et 24,62% (16 cas) ont été enregistrés au niveau des eaux usées rejetées par l'hôpital Frantz Fanon (Figure 31).



**Figure 30 :** Pourcentage de résistance globale des souches *Streptococcus* du groupe *D*.



**Figure 31 :** Répartition des souches *Streptococcus* du groupe *D* résistantes dans les 3 sites

**Tableau XV :** Phénotype de l'antibioésistance de toutes les souches isolées de *Streptococcus du groupe D*

Souches	Bêta-lactamines	Glycopeptide	Polypeptide	Quinolone	Phénicol	Cycline	Aminosides	Macrolides	Autres
Strep-D1	AX ; CZ ; CTX	-	CL	OFX	-	<b>TE</b>	K ; <b>TOB</b> ;S	L ;CD ; <b>E</b>	MET
Strep-D2	AX ; CZ ; CTX	-	CL	-	-	-	K ;S	-	MET
Strep-D3	AX ; CZ ; CTX	-	CL	-	-	-	K ; <b>GEN</b> ;S	-	<b>FA</b> ;MET
Strep-D4	CTX	-	CL	-	-	<b>TE</b>	K ;S	L ; CD ; <b>E</b>	MET ; <b>PT</b>
Strep-D5	CTX	-	CL	-	-	-	K ;S	CD ;	MET
Strep-D6	<b>OX</b> ; CTX	-	CL	OFX	<b>C</b>	-	K ; <b>TOB</b> ; <b>GEN</b> ;S	L ; CD ;	MET
Strep-D7	CTX	-	CL	OFX	-	-	K ;S	-	<b>FA</b> ;MET

#### II.7.4. *Pseudomonas aeruginosa*

Les 4 souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont un pourcentage très élevé (100%) aux nombreux antibiotiques utilisés dans cette étude comme : les Béta-lactamines (à l'exception de l'Imipénème), les Macrolides, les Aminosides (Kanamycine, Streptomycine), la Vancomycine, l'Acide fusidique, la Pristinamycine et la Métronidazole (Figure 32).

Ces souches ont une résistance importante vis-à-vis de l'Ofloxacine et la Gentamicine avec un taux de 75% contrairement aux *Staphylococcus aureus* et *Aeromonas hydrophila*, et 50% vis à vis de la Tobramycine.

Le taux de résistance le plus faible a été enregistré vis-à-vis de l'Imipénème et la Tétracycline qui est de 25%.

La Colistine reste l'ATB de choix qui bloque la croissance de la totalité des *P. aeruginosa*.

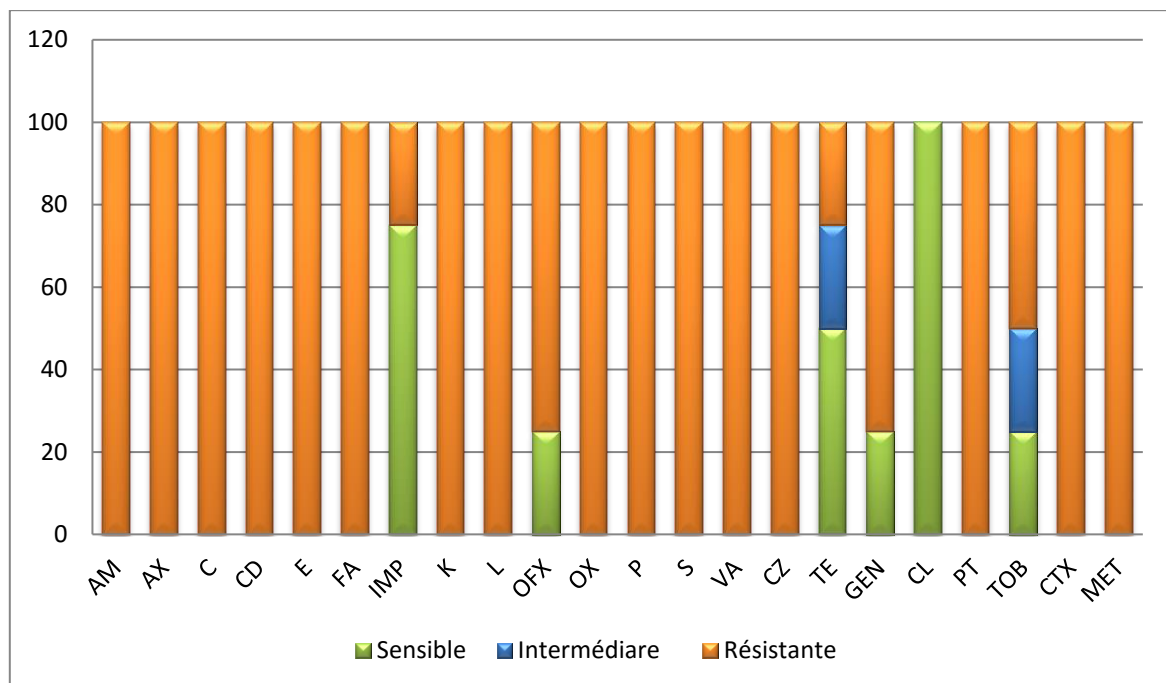


Figure 32 : Pourcentage de l'antibiorésistance chez les souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

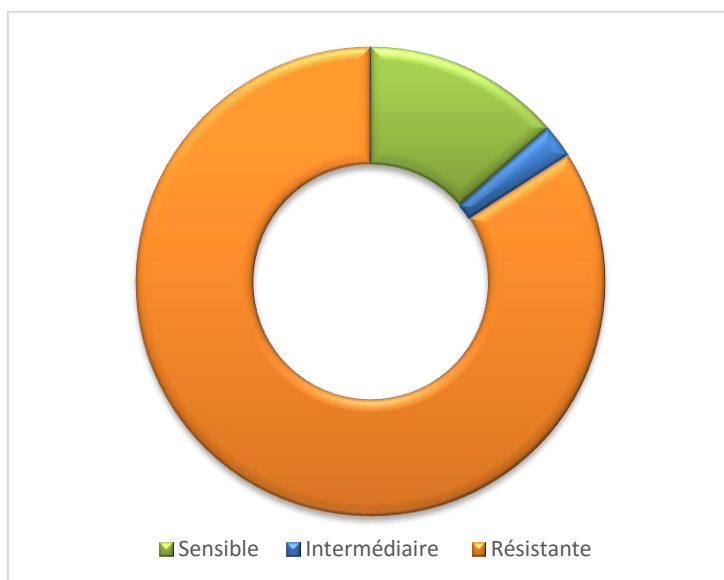
#### ❖ Phénotype de résistance

La totalité des souches de *P. aeruginosa* partagent le même profil de résistance vis-à-vis de plusieurs antibiotiques tels que les Béta-lactamines (Pénicilline G, Amoxicilline, Oxacilline, Ampicilline, Céfazoline et Céfotaxime), la Vancomycine, le Chloramphénicol, les Aminosides (Kanamycine et Streptomycine), les Macrolides, l'Acide fusidique, la Métronidazole et la Pristinamycine.

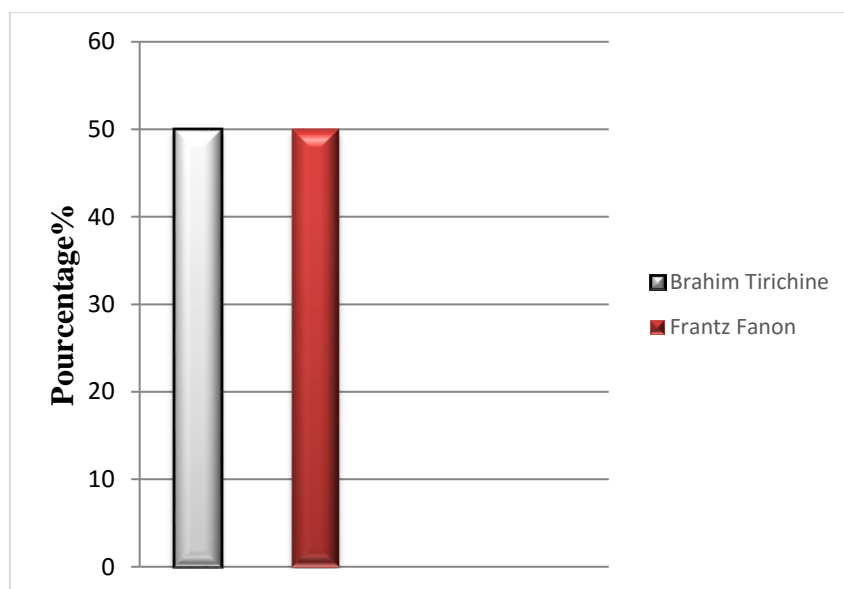
Les 3 souches Pseudo1, 2 et 3 (isolées à partir de 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> prélèvement respectivement, voir Tableau XVIII) ont montré une résistance vis-à-vis des Quinolones (Ofloxacine). La seule résistance vis-à-vis de la Tétracycline, est observée par la souche Pseudo4.

L'Imipénème a une action efficace sur la majorité des souches de *P. aeruginosa* à l'exception de Pseudo3 (Tableau XVI).

Parmi 88 tests d'antibiogramme réalisés sur *P. aeruginosa* ; (84,09%) sont considérés résistants (Figure 33). Ce sont les effluents de l'hôpital Brahim Tirichine qui ont hébergé (50%) (37 cas) de cette résistance. Un taux de (50%) (37 cas) a été enregistré dans les effluents de l'hôpital Frantz Fanon (Figure 34).



**Figure 33 :** Pourcentage de résistance globale des souches *Pseudomonas aeruginosa*.



**Figure 34 :** Répartition de la résistance des souches de *Pseudomonas aeruginosa* dans les 3 sites de prélèvement.

**Tableau XVI :** Phénotype de l'antibioésistance de toutes les souches isolées de *Pseudomonas aeruginosa*

Souches	Bêta-lactamines	Glycopeptide	Polypeptide	Quinolone	Phénicole	Cycline	Aminosides	Macrolides	Autres
Pseudo1	P ;AX ;OX ;AM ;CZ ;CTX	VA	-	OFX	C	-	K ;S	L ;CD ;E	FA ;MET ; PT
Pseudo 2	P ;AX ;OX ;AM ; CZ ;CTX	VA	-	OFX	C	-	K ;GEN ;S	L ;CD ;E	FA ;MET ; PT
Pseudo3	P ;AX ;OX ;AM; <b>IMP</b> ;CZ ;CTX	VA	-	OFX	C	-	K ;TOB ;GEN ;S	L ;CD ;E	FA ;MET ; PT
Pseudo 4	P ;AX ;OX ;AM ; CZ ;CTX	VA	-	-	C	<b>TE</b>	K ;TOB ;GEN ;S	L ; CD ;E	FA ;MET ; PT



### II.7.5. *Vibrio fluvialis*

Un antibiogramme composé de 12 antibiotiques uniquement a été réalisé vis-à-vis de la souche de *V. fluvialis*. Après mesure des zones d'inhibition (Tableau XVII), cette souche a montré une résistance vis-à-vis de quatre antibiotiques : l'Ampicilline et l'Oxacilline, l'Acide fusidique et la Vancomycine.

Cette souche est sensible au reste des antibiotiques : trois appartiennent à la classe des Béta-lactamine qui sont : l'Amoxicilline, la Pénicilline et l'Imipenème, en plus des Aminosides (Kanamycine), le Chloramphénicol, la Tétracycline, l'Erythromycine et l'Ofloxacin.

**Tableau XVII :** Mesure des zones d'inhibition de *Vibrio fluvialis*.

Antibiotique	AM	AX	P	OX	IMP	K	C	E	OFX	FA	VA	TE
<b>Zone d'inhibition</b>	0	25	25	0	37	24	35	30	34	0	0	35

Le Tableau suivant résume la globalité des souches identifiées par site selon leurs phénotypes de résistance :

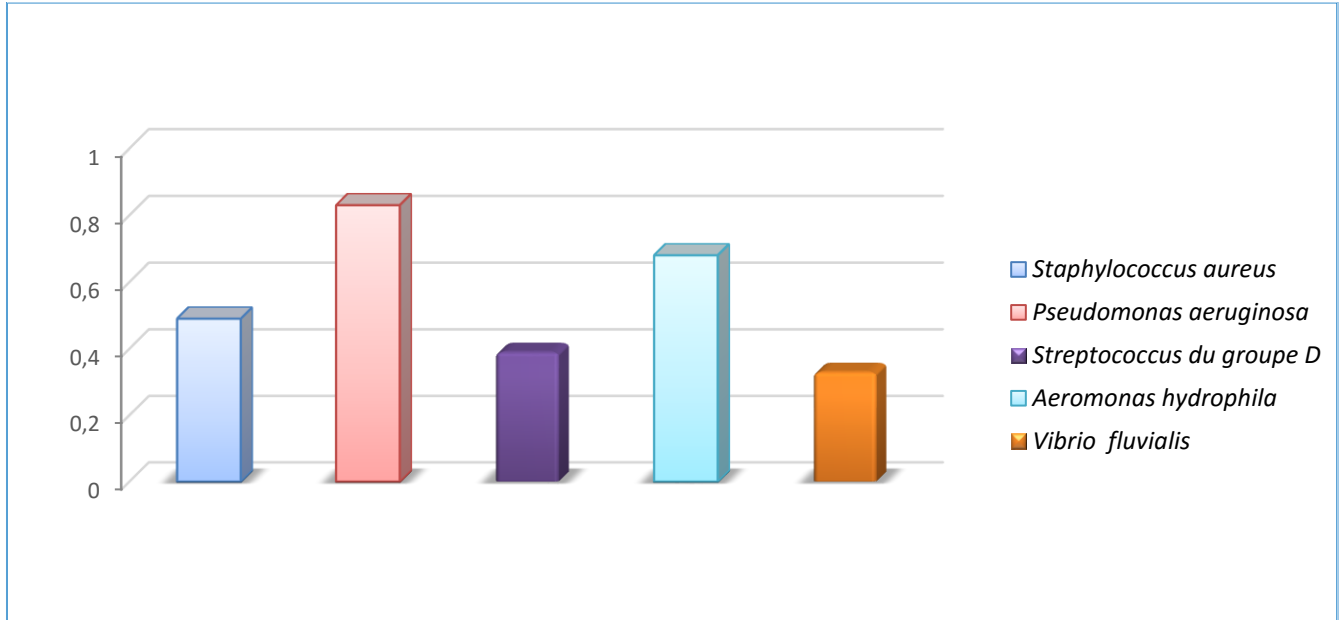
**Tableau XVIII :** Souches identifiées accompagnées de leurs abréviations isolées des différents prélèvements et par site

Espèces	Abréviation des souches identifiées après réalisation de l'antibiogramme	Effluent concerné	Numéro de prélèvement
<b>Streptococcus D</b>	Strep-D1	Brahim Tirichine	1
	Strep-D2	Ben Bouali	
	Strep-D3	Frantz Fanon	
	Strep-D4	Brahim Tirichine	2
	Strep-D5	Ben Bouali	
	Strep-D6	Ben Bouali	3
	Strep-D7	Frantz Fanon	
<b>Aeromonas hydrophila</b>	Aero1	Brahim Tirichine	2
	Aero2	Brahim Tirichine	4
	Aero3	Frantz Fanon	
	Aero4	Ben Bouali	5
	Aero5	Frantz Fanon	
	Aero6	Brahim Tirichine	6
	Aero7	Frantz Fanon	
	Aero8	Brahim Tirichine	8

	Aero9	Frantz Fanon	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pseudo1	Brahim Tirichine	2
	Pseudo2	Frantz Fanon	3
	Pseudo3	Brahim Tirichine	5
	Pseudo4	Frantz Fanon	
<i>Vibrio fluvialis</i>	Vib	Brahim Tirichine	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	Staph.a-1	Brahim Tirichine	1
	Staph.a-2	Ben Bouali	
	Staph.a-3	Frantz Fanon	
	Staph.a-4	Ben Bouali	3
	Staph.a-5	Frantz Fanon	
	Staph.a-6	Ben Bouali	4
	Staph.a-7	Frantz Fanon	
	Staph.a-8	Frantz Fanon	8
<i>Clostridium-ASR</i>	Clos-1	Brahim Tirichine	1
	Clos-2	Ben Bouali	
	Clos-3	Frantz Fanon	
	Clos-4	Ben Bouali	2
	Clos-5	Brahim Tirichine	5
	Clos-6	Ben Bouali	
	Clos-7	Frantz Fanon	
	Clos-8	Ben Bouali	8

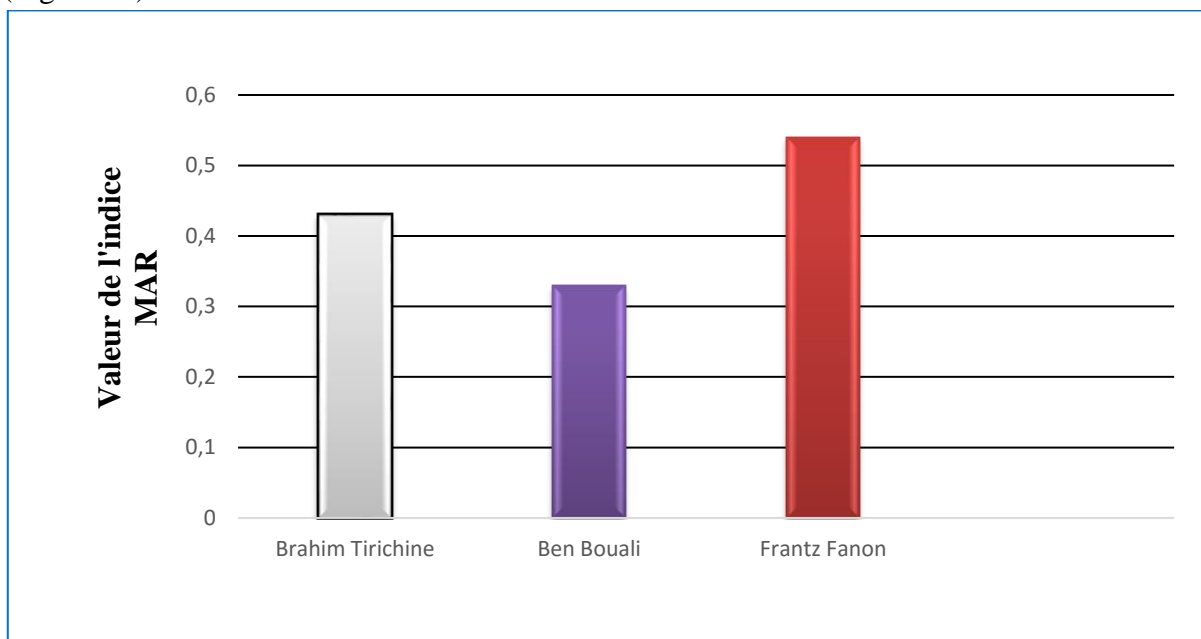
## II.8. Résultats du calcul de l'indice MAR

L'indice MAR calculé pour l'ensemble des souches isolées est supérieur à 0,2. *P. aeruginosa* exprime la valeur la plus élevée (0,83). *V. fluvialis* montre la valeur la plus faible (0,33) (Figure 35).



**Figure 35 :** Indice MAR calculé à partir des différents isolats.

Concernant les résultats de l'indice MAR des sites, deux valeurs supérieures à 0,4 sont enregistrées pour les effluents issus de l'hôpital Frantz Fanon (0,54) et l'hôpital Brahim Tirichine (0,43). L'indice inférieur à 0,4 est représenté par les effluents de l'hôpital Ben Bouali (0,33) (Figure 36).



**Figure 36 :** Indice MAR calculé à partir des différents sites.



Discussion

### III. DISCUSSION

Durant la dernière décennie, un nombre croissant d'études sur la résistance bactérienne vis-à-vis des antibiotiques a été réalisé. Cette résistance s'avère très préoccupante et menace la santé mondiale en raison de l'utilisation excessive et abusive des antibiotiques (**Petrovic et al., 2013**).

Les établissements de santé, peuvent être d'une part une source dans l'augmentation du nombre des bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques dans l'environnement aquatique et d'autre part ils peuvent également être un des facteurs primordiaux dans la croissance du nombre d'infections nosocomiales graves (**Kümmerer, 2004**).

Durant la période d'échantillonnage, la région de Blida a été marquée par une période pluvieuse avec des taux de précipitation très élevés (surtout au mois de Mars) ce qui nous laisse supposer qu'il y a un lien entre ces précipitations et les différentes concentrations bactériennes des espèces isolées dans les différents prélèvements des effluents pour les trois hôpitaux (Tableau XXVIII, Annexe II). L'étude de **Lindeman et Upper (1985)** sur l'environnement a estimé que  $10^5$  des bactéries au niveau de phyllosphères et sur certaines surfaces ont été perdus ou éliminés durant les premières 15 minutes de chute des pluies. Dans d'autres études, les valeurs retrouvées dans les effluents liquides hospitaliers révèlent des concentrations assez faibles de l'ordre de  $3 \times 10^8$  UFC/l (**Darsy et al., 2002 ; Jehannin, 1999**), en comparaison avec les valeurs pour la flore totale généralement présente dans les rejets liquides communaux qui est de  $10^{11}$  UFC/l (**Bernet et Fines, 2000 ; Mansotte et Jestin, 2000**). Il faut signaler que l'hôpital est aussi un grand consommateur d'eau ; la consommation par lit et par jour varie de 400 à 1200 litres (**Jehannin, 1999**).

L'ensemble des espèces *Streptococcus* du groupe D et les *Clostridium-ASR*, sont des bactéries commensales de la flore intestinale humaine et animal, ces bactéries sont recherchées en tant qu'indicateurs de contamination fécale dans les eaux et certaines espèces peuvent être pathogènes, par contre les *Aeromonas*, *Pseudomonas* et quelques espèces de *Vibrio*, sont des germes ubiquistes dans la nature. Selon les espèces, elles peuvent se retrouver dans les eaux douces et marines. *Staphylococcus aureus* est l'espèce majeur des staphylocoques d'origine humaine, animal ou environnemental ou non spécifique responsables des plusieurs infections chez l'homme. L'ensemble de ces bactéries sont souvent présent en milieu hospitalier dans des habitats liés à la présence humaine, aux activités du personnel médicale ; ces germes transportés par l'eau. (**Delarras, 2007**)

L'analyse bactériologique a permis d'identifier 23 souches Gram positif et 14 souches Gram négatif. Dans cette étude, parmi toutes les souches isolées, *Aeromonas hydrophila* domine avec un taux d'isolement de 24,32% (9 souches) suivie par *S. aureus* et *Clostridium-ASR* avec la même fréquence d'isolement de 21,62%, *Streptococcus du groupe D* (18,92%), *Pseudomonas aeruginosa* (10,92%) alors que *Vibrio fluvialis* occupe la dernière place avec un pourcentage de 2,7%. Cette répartition en fonction des taux n'est pas la même que celle

rapportée par **Guessennd et al., (2013)** où *P. aeruginosa* était l'espèce la plus fréquemment rencontrée (33,08%) suivie par *Staphylococcus* (17,6%) et *A. hydrophila* (0,7%).

Ainsi, ces espèces se répartissent différemment selon les sites de prélèvement. Au niveau des effluents de l'hôpital Fabor, *A. hydrophila* est l'espèce bactérienne la plus dominante car elle représente 33,33%. *Clostridium-ASR* était la plus fréquemment isolée dans les effluents de l'hôpital Ben Boulaid (36,36%) alors que pour les eaux usées rejetées par l'hôpital Frantz Fanon, nous avons noté que deux espèces étaient prédominantes, il s'agit de *S. aureus* et d'*A. hydrophila* (28,6%).

Dans cette étude, nous avons constaté qu'à partir des 37 souches isolées, les effluents de l'hôpital Frantz Fanon sont les plus contaminés cela est probablement due au nombre de services composant cette structure hospitalière et qui était plus important par rapport aux deux autres hôpitaux (Voir Tableau VI).

Le volume des antibiotiques utilisé dans les hôpitaux et qui est libéré dans les eaux usées des effluents est à l'origine d'une pression de sélection sur les bactéries (**Kümmerer et Henninger, 2003**) où ce type d'effluents contiennent un nombre très élevé de bactéries résistantes et de résidus d'antibiotiques (**Fontaine et Hoadley, 1976, Linton et al., 1974 ; Grabow et Prozesky, 1973**).

Des études ont montré que les effluents hospitaliers pourraient augmenter le nombre et la sélection de bactéries résistantes dans l'environnement aquatique via leurs rejets directs dans la nature ou par le biais des STEPS dont le dysfonctionnement serait à l'origine de ce type de contamination (**Fontaine et Chopade, 1994 ; Walter et Vennes, 1985 ; Linton et al., 1974 ; Grabow et Prozesky, 1973**).

Dans cette étude, nous avons retracé l'antibiorésistance de 5 espèces isolées à partir des effluents hospitaliers non traités. Fait intéressant, la plupart de ces souches avaient un profil de résistance aux antibiotiques peu différent. La bactérie la plus fréquente est *P. aeruginosa* avec des taux de résistances très élevés aux différentes classes des antibiotiques. En effet, les souches isolées de cette bactérie ont montré un taux de résistance très important (100%) vis-à-vis des antibiotiques appartenant aux Béta-lactamines à l'exception de l'Imipénème où on a enregistré un taux de résistance le plus faible (25%). Ces taux sont semblables à ceux rencontrés dans la littérature par **Igbinosa et al., (2012)** en Afrique du sud et contraire à ceux obtenus par **Acton (2013)** aux Etats Unis d'Amérique ; **Eyquem et al, (2000)** en Italie et **Hygis (1998)** en France. Ces auteurs ont rapporté des taux différents de 16.6% ; 75% et 16% pour Oxacilline, Imipénème et Céfotaxime respectivement.

Cette résistance serait liée à l'imperméabilité de la paroi bactérienne ainsi qu'à l'hydrolyse des bêta-lactamines par une enzyme inductible pouvant être produite par toutes les souches (**Eyquem et al, 2000**).

Pour les aminosides, le taux le plus important a été observé pour la Streptomycine (100%) suivi de la Gentamicine (75%) et de la Tobramycine (50%), en comparaison à ceux rapportés par **Hygis (1998)**, 47% vis-à-vis de la Gentamicine et 28% pour la Tobramycine.

D'après les travaux d'**Igbinosa et al., (2012)** l'Ofloxacine, la Céfotaxime et le Chloramphénicol sont les antibiotiques de choix sur l'ensemble des souches de *P. aeruginosa* avec un taux de sensibilité de 100%.

Les souches *A. hydrophila* ont montré une résistance très importante vis-à-vis des Bêta-lactamines à l'exception du Céfotaxime qui présente un pourcentage de résistance légèrement plus faible (88,88%). Selon **Eyquem et al., (2000)**, dans le genre *Aeromonas*, la résistance aux Bêta-lactamines est caractérisée par une grande hétérogénéité inter et intra-espèces. De nombreux phénotypes de résistance ont été décrits dans la littérature pour *A. hydrophila*, et il semble qu'une grande variabilité intra-espèces existe en termes d'équipement enzymatique. La résistance aux Bêta-lactamines, d'*A. hydrophila* est due à la présence, séparée ou simultanée, d'au moins deux Bêta-lactamases inductibles chromosomiques, une carbapénémase et une céphalo-sporinase.

Dans cette étude, les taux de résistance étaient différents de ceux de **Diouara (2006)**, les souches d'*A. hydrophila* présentaient une grande sensibilité pour l'Imipénème avec des taux allant de 88,88 % à 100 %.

Nos souches d'*A. hydrophila* sont résistantes à la Tétracycline (100%), aux Aminosides, à la Kanamycine (88,9%), la Tobramycine (33,3%), la Gentamycine et la Streptomycine (44,44%) et plus sensible au Chloramphénicol (11,12% sont résistantes). Ces taux obtenus sont en contradiction avec ceux d'**Eyquem et al., (2000)** où en générale, les *Aeromonas* étaient plus sensibles aux Cyclines, au Chloramphénicol et aux Aminosides.

Les souches de *S. aureus* ont manifesté une grande résistance à l'Acide fusidique et à la Métronidazole (100%).

Les souches de *S. aureus* isolées dans cette étude avaient une résistance assez élevée vis-à-vis des Bêta-lactamines tels que la Pénicilline G (62,5%), l'Amoxicilline, l'Ampicilline (75%) et l'Oxacilline (87,5%). Nos résultats concernant le taux de résistance à la Pénicilline sont moins élevés en comparaison avec l'étude de **Diouara en 2006** où le taux était de 86,25%, mais par contre il a rapporté un taux faible pour l'Amoxicilline (43%). Ainsi, selon **Ramoul (2014)**, 37,5% des *S. aureus* sont résistants à l'Oxacilline, ce taux est très faible par rapport à nos résultats.

Selon **Daurel et Leclercq (2008)**, la sensibilité des souches de *S. aureus* sauvages aux Bêta-lactamines varie selon la molécule, 80 % à 95 % des souches produisent une pénicillinase qui inactive la pénicilline G et l'ampicilline, rendant leurs indications obsolètes dans le cadre d'une infection à *S. aureus*.

Plusieurs études ont été menées sur la relation entre les germes de l'hôpital et les effluents de ce milieu. Il faut ensuite tenir compte que 15% de *P. aeruginosa* sont abondamment présents dans tous les réservoirs d'eau de l'hôpital contaminant le patient par l'intermédiaire des activités humaines (**Yernault et Demedts, 1997**). D'après **Astie – Deyna (1982)**, il semble qu'il n'y ait pas de barrière entre les germes véhiculés dans l'hôpital et les eaux usées. En effet dans son étude, ce sont bien les Sérotypes 06 et 11 de *P. aeruginosa*, les plus représentatifs des infections hospitalières, qui sont rencontrés le plus fréquemment dans les eaux usées. **Leclerc et Oger en (1974)** ont mis en évidence une différence entre la concentration en *P. aeruginosa* et en *S. aureus* dans les effluents urbains et les effluents hospitaliers. Selon **Schlosser (1999)**,

les eaux hospitalières ne seraient pas davantage polluées que les eaux usées urbaines, exception faite pour les *P. aeruginosa* (plus de 10 fois supérieur) et les staphylocoques pathogènes. Nous suggérons que les germes que nous avons isolés à partir des effluents hospitaliers peuvent être d'origine hospitalière.

A l'avenir, des enquêtes comparant les souches cliniques et environnementales doivent être menées pour pouvoir établir les éventuels liens entre une infection résistante et le réservoir qui peut être l'eau mais également d'autres éléments de l'environnement du malade.

Selon **Lévi (2006)**, la présence de bactéries résistantes à un ou plusieurs antibiotiques est avérée dans pratiquement tous les types d'eaux, sans qu'il soit facile d'évaluer des tendances claires sur l'aggravation du phénomène ou son association avec les usages d'antibiotiques humains et vétérinaires. Il est évident que les effluents en provenance d'hommes ou d'animaux malades et traités aux antibiotiques transportent des bactéries résistantes. C'est ensuite tout le devenir de ces germes qu'il faut appréhender pour décrire avec précision les survies, les abattements, les transferts de gènes et les éventuelles proliférations.

Le tableau suivant montre une comparaison des résultats obtenus dans cette étude avec ceux trouvés par d'autres auteurs :



**Tableau XIX :** Comparaison succincte des taux de résistance des germes isolés dans cette étude avec ceux des auteurs

Espèce		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Streptococcus du groupe D</i>		<i>Aeromonas hydrophila</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Antibiotiques		Auteurs	Original	Auteurs	Original	Auteurs	Original	Auteurs	Original
<b>Béta-lactamines</b>	Pénicilline G	86,25% <b>Diouara (2006)</b>	62,5%	53,8% <b>Fatou (2002)</b>	0%	100% <b>Eyquem et al (2000)</b>	100%	100% <b>Igbinosa et al (2012)</b>	100%
	Amoxicilline	43% <b>Diouara (2006)</b>	75%	15,4% <b>Fatou (2002)</b>	42,85%		100%	/	100%
	Oxacilline	37,5% <b>Ramoul (2014)</b>	87,5%	100% <b>Bekkari et al (2016)</b>	28,57%		100%	16.6% <b>Acton (2013)</b>	100%
	Ampicilline	/	75%	100% <b>Bekkari et al (2016)</b>	0%		100%	100% <b>Igbinosa et al (2012)</b>	100%
	Imipénème	/	0	/	0%	80% à 100% <b>Diouara (2006)</b>	100%	75% <b>Hygis (1998)</b>	25%
	Céfazoline	/	50%	/	42,86%	100% <b>Eyquem et al (2000)</b>	100%	/	100%
	Céfotaxime	/	62,5%	100% <b>Bekkari et al (2016)</b>	100%		88,88%	16% <b>Hygis (1998)</b>	100%
<b>Glycopeptides</b>	Vancomycine	/	37,5%	0% <b>Fatou (2002)</b>	0%	/	77,8%	100% <b>Igbinosa et al (2012)</b>	100%
<b>Polypeptides basiques</b>	Colistine	/	37,5%	/	100%	/	22,22%	/	100%
<b>Quinolones</b>	Ofloxacine	/	12,5%	0% <b>Bekkari et al (2016)</b>	42,85%	/	44,44%	100% <b>Njall et al (2013)</b>	75%

<b>Phénicoles</b>	Chloramphénicol	/	12,5%	50% <b>Bekkari et al (2016)</b>	14,3%	0% <b>Eyquem et al (2000)</b>	11,12%	100% <b>Hygis (1998)</b>	100%
<b>Cyclines</b>	Tétracycline	/	0	100% <b>Bekkari et al (2016)</b>	28,57%	0% <b>Eyquem et al (2000)</b>	100%	100% <b>Igbinosa et al (2012)</b>	25%
<b>Aminosides</b>	Kanamycine	/	87,5%	/	100%	0% <b>Eyquem et al (2000)</b>	88,9%	/	100%
	Tobramycine	/	0	100% <b>Bekkari et al (2016)</b>	28,56%		33,3%	28% <b>Hygis (1998)</b>	50%
	Gentamicine	/	50%	100% <b>Fatou (2002)</b>	28,57%		44,44%	47% <b>Hygis (1998)</b>	75%
	Streptomycine	/	62,5%	0% <b>Fatou (2002)</b>	100%		44,44%	100% <b>Hygis (1998)</b>	100%
<b>Macrolides</b>	Linomycine	/	62,5%	/	42,85%	/	88,9%	/	100%
	Clindamycine	/	62,5%	0% <b>Fatou (2002)</b>	42,86%	/	100%	/	100%
	Erythromycine	/	37,5%	3.6% <b>Fatou (2002)</b>	28,58%	/	55,55%	0% <b>Igbinosa et al., (2012)</b>	100%
<b>Autres</b>	Acide fusidique	/	100%	/	28,57%	/	100%	/	100%
	Metronidazole	/	100%	/	100%	/	100%	/	100%
	Pristinamycine	/	12,5%	/	14,3%	/	11,12%	/	100%

Concernant, les résultats de l'indice MAR, quand une valeur de l'indice est  $> 0,2$  c'est-à-dire que les isolats sont exposés à des sources de risque élevé de contamination où les antibiotiques sont fréquemment utilisés. Par contre, lorsque l'utilisation des antibiotiques est rare à ce moment, une valeur de l'indice est inférieure ou égale à  $\leq 0,2$ . Dans cette étude, tous les isolats bactériens ont montré une valeur MAR supérieure à 0,2 par contre dans l'étude de **Atieno et al., (2013)**, la valeur de l'indice MAR est de 0,20 pour toutes les espèces de bactéries.

Nous avons également noté que *P. aeruginosa* est le germe bactérien qui exprime la valeur la plus élevée de cet indice (0,83) par rapport à ceux rapportés par **Odjadjare et al., (2012)** où l'indice MAR se situait entre 0,26 et 0,5. L'étude a démontré que les espèces *Pseudomonas* étaient assez répandues dans les effluents finaux des stations d'épuration des eaux usées en Afrique du Sud,

Ces valeurs très élevées que nous avons obtenues, nous permettent de supposer qu'elles sont en relation avec l'utilisation abusive des antibiotiques dans le traitement des infections nosocomiales bactériennes chez les patients hospitalisés au niveau des structures qui ont fait l'objet de cette étude.

Pour les valeurs calculées de l'indice MAR des sites varient entre 0,33 et 0,54. Pour les effluents hospitaliers ayant une valeur supérieure à 0,4 le risque de contamination est élevé d'origine humaine. Lorsque les valeurs sont inférieures à 0,4, il y a une absence ou faible contamination d'origine non humaine. Dans cette étude l'effluent hospitalier de Frantz fanon est le plus contaminé avec une valeur MAR de 0,54.

Pour éviter la contamination des écosystèmes aquatiques, le prétraitement des eaux usées des effluents hospitaliers est fortement conseillé.



Conclusion

## CONCLUSION

Les résultats obtenus dans cette étude indiquent une variété d'espèces identifiées. Parmi les 37 souches isolées à partir de trois effluents d'origine hospitalier, les plus fréquentes sont *Aeromonas hydrophila* (24,32%), *Staphylococcus aureus* et *Clostridium-ASR* (21,62%), *Streptococcus du groupe D* (18,92%) et *Pseudomonas aeruginosa* (10,92%).

Un nombre élevé de ces souches a révélé des phénotypes de résistance vis-à-vis de plusieurs classes d'antibiotiques en particulier les Béta-lactamines à l'exception d'Imipenème (25%-100%), les Aminosides (24%-100%), les Quinolones (12,5%-75%), les Glycopeptides (37,5%-100%), les Polypeptides basiques (22,22%-100%), les Phénicoles (11,12%-100%), les Cyclines (28,57%-100%) et autres antibiotiques comme l'Acide fusidique (28,57%-100%), la Métronidazole (100%) et la Pristinamycine (11,12%-100%).

L'Imipenème reste l'antibiotique de choix le plus actif avec un taux de résistance de 25%. Ces niveaux de résistance sont associés à de nombreux mécanismes qui peuvent s'exprimer seuls ou de façon concomitante.

L'étude indique en plus que toutes les souches isolées sont multirésistantes (BMR). Cette multirésistance a été mise en évidence par le calcul de l'indice MAR considéré comme un excellent outil d'analyse de la prévalence relative des bactéries résistantes dans l'environnement. 100% des isolats bactérien ont montré une valeur de MAR supérieure à 0,2, ce qui est une indication possible que les isolats bactériens ont été exposés à plusieurs antibiotiques. *Pseudomonas aeruginosa* exprime la valeur la plus élevée (0,83). Ces résultats montrent les risques qu'ils peuvent obtenir en raison de l'utilisation excessive d'antibiotiques au niveau environnementale et sur la santé publique.

Les valeurs calculées de l'indice MAR des sites varient entre 0,33 et 0,54 ce qui indique que 66,66% des effluents étaient contaminés par des selles d'origine humaine.

A l'avenir, nous espérons que les résultats de cette étude contribueront à rendre les autorités de la santé publique plus consciente dans la prescription des antibiotiques pour limiter la diffusion des bactéries résistantes dans les plans d'eau et fourniront des informations à propos de la bonne gestion des effluents hospitaliers.

Quelques perspectives de recherche se dessinent à la lumière des résultats obtenus :

- ❖ Accomplir l'étude par l'apport de la biologie moléculaire (PCR) par rapport à la détection des gènes de résistance vis-à-vis des antibiotiques qui sont omniprésents dans la nature.
- ❖ Mettre en œuvre un réseau séparatif efficace et limiter les ruissellements d'eau pluviale
- ❖ Connaître les conditions de rejet des effluents d l'établissement et être capable de mesurer les débits et les flux de polluants de façon fiable
- ❖ Mettre en œuvre les pré-traitements et générés par ceux-ci.
- ❖ Créer au sein de l'établissement un poste de responsable « Environnement-Qualité », chargé de gérer les déchets liquides, les déchets solides, les installations classées à l'intérieur de l'établissement, la récupération des déchets toxiques et dangereux.



**Références  
bibliographi**

A

- **Acton, Q.A. 2013.** *Pseudomonas aeruginosa* : New insights for the health care professional. p 29.
  
- **Al-Ahmad, A., Daschner, F. D. and Kümmerer, K. 1999.** Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenm, penicillin G, and sulfamethoxazole and inhibition of wastewater bacteria. Arch. Environ. Contam. Toxicol. **37** : 158-163.
  
- **Ait hamlet, S. (1998).** Contribution à l'étude de la qualité de huites oueds de la Wilaya d'El tarf ; Aspects microbiologique et écologique.
  
- **Altin, A., Altin, S., Degirmenci, M., 2003.** Characteristics and treatability of hospital (medical) wastewaters. Fresenius Environmental Bulletin **12** (9), 1098–1108.44.
  
- **Antibiogramme en diffusion.** Recommandations techniques et Guide d'interprétation. Communiqué 1998 du comité de l'antibiogramme de la société française de Microbiologie. *Sanofi Diagnostics Pasteur*, 12p.
  
- **Astie Deyna, A. 1982.** Inventaire des Bactéries Potentiellement Pathogènes Arrivant à une Station d'Épuration d'un Hopital Général, DEA microbiologie, Université Claude Bernard LYON.
  
- **Atieno, N.O., Okemo, P. O. and Ombori, O. 2013.**Antibiotic Resistance of Fecal Bacteria Indicators and Pathogens Isolated from Sludge and Wastewaters of Abattoirs in Nairobi, Kenya. Journal of Biology (**05**): 106-111.
  
- **Avril, J.L., Henry D., Francois D., Henri M. 1992** : Bactériologie clinique, 2ème édition ellipses Paris, p : 149-150-268.
  
- **Avril, J.L. 1997.** Nouveau dictionnaire de bactériologie clinique. Ed : ELLIPSES. Paris. p1447.

B

- Baudry, C et Brézelle, H.2006.** Microbiologie-Immunologie : exercices d'application .2 eme edition. :56-58.
  
- Barbut, F.A., Denis, N.A.2006.** Revue Francophone des Laboratoires. p 382.
  
- **Baquero, F., Martinez, J-L et Cantoné, R .2008.** Antibiotics and antibiotic résistance in water environments, curropère Biotechnol: 260-265.



- **Bekkari, H., Touijer, J., Berrada, S., Ettaybi, M., Benchemsi, S., Maniar, S., El Ouali Lalami, A. 2016.** Evaluation de la contamination des eaux utilisées en milieu hospitalier : Effets d'antibiotiques et de désinfectant usuels sur les germes isolés (Surveillance of bacteriological quality and resistance to disinfectants and antibiotics in a provincial hospital in Morocco). *J. Mater. Environ. Sci:* 2028-2508.
  
- **Bernet, S., Fines, M. 2000.** Effluents du CHU de CAEN : Etude qualitative et quantitative de la flore microbienne et recherche de bactéries multirésistantes. Poster. Quatrième journée du Réseau Régional d'Hygiène de Basse-Normandie, Caen. p 1.
  
- **Blech, M.F., Hartemann, P. 1988.** Les antiseptiques : familles, critères d'efficacité et règle d'emploi, in *Hygiene hospitaliers*. p 10,3,32.
  
- **Berche, P., Gaillard, J. L., Simonet, M. (1991).** Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. *Médecine- Sciences Flammarion, 3eme édition, France*, pp.77-601.
  
- **Bocq-Callberg, C.M et Dusart, J. 2007.** *Microbiologie*. Prescott., Harley et Klein, - .2e édition française. p 818.
  
- **Boller, M., 1997.** Small wastewater treatment plants-a challenge to wastewater engineers. *Wat. Sci. Technol.* **35** :1-12.
  
- **Bryskier, A. 1999.** Antibiotique et antifongique et anti parasitaire : p 41-75,85-250,790, 901.
  
- **Brill, E-J. 1951.** Third World Petroleum Congress The Hague: p 100.
  
- **Burgman, H. 2014.** Entrée des antibiotiques et la résistance aux antibiotiques dans les systemesd'eau du suisse-prévention et promotion de la santé.

C

- **Cavalli S. 2003.** Application de la méthode HACCP en établissement d'abattage : modèles théoriques et essai de mise en place. Thèse de Médecine Vétérinaire, ENVL, Lyon, p132.
  
- **Carip, C. 2008.** *Microbiologie d'Hygiène, Bases microbiologiques de la diététique*. Éditions TEC et DOC. p 251.
  
- **Crouzilles, C., 2012.** *Infectiologie et hygiène - Gestion des risques et soins infirmiers : Unités d'Enseignement 2*. p: 4-10.

D

- **Daurel, C., Leclercq, R. 2008.** L'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*. Revue francophone des laboratoires **407** : 81-90.
  
- **Darsy, C., Lescure, I., Payot, V., Rouland, G. 2002.** Effluents des établissements hospitaliers : teneur en microorganismes pathogènes, risques sanitaires, procédures particulières d'épuration et de gestion des boues, Office International de l'Eau.
  
- **Deloffre Bounamour, N. 1995.** Les rejets des établissements de santé : des effluents liquides aux déchets solides mémoire de maîtrise, université Claude Bernard – Lyon 1. Institut universitaire professionnalisé. Génie de l'environnement –Ecodéveloppement, Lyon. 75. p 43.
  
- **Delarras, C. (1998).** Microbiologie. 90 heures de Travaux pratiques. © *Gaëtan Morin, France*, pp.40-275.
  
- Delarras, C. 2007** : Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou contrôle sanitaire. Edition Lavoisier. Paris.
  
- **Delarras, C., Trébaol, B., Durand, J. 2010.** Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux :87,98.
  
- **Delarras, C.2014.**pratique en microbiologie de laboratoire : recherche de bactérie et levures-moisissures ». Ed : Lavoisier : p 651.
  
- **Denis, F., Phocyl, M., Martin, C., Bingen, E., Quentin, R. 2007.** Bactériologie medicale, techniques usuelles. p :259 ,256 ,333 ,327 ,328.
  
- **Diouara, M. 2006.** Thèse Doctorat : Sensibilité Des Bactéries Pathogènes Aux Antibiotiques Dans Le District De Bamako En 2006, Université De Bamako. p 41.
  
- **Diduch, M., Polkowska, Z., Namie, S.J. 2016.** Food Control. **61** :188-195.
  
- **Don, J., Brenner, N. R., Krieg, J., Staley, R. 2004.** Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, The Proteobacteria .2:514-557.
  
- **Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. 2006.** The Prokaryotes: Proteobacteria: Gamma Subclass 3<sup>ème</sup> edition Ed: springer. **6**: p536.
  
- **Dzidic, S., Bedekovic, V. 2003.** Horizontal gene transfer-emergency multidrug resistance in hospital bacteria. ActaPharmacol; **24** (6):45-57.

## E

- **Emmanuel, E. 2004.** Évaluation des risques sanitaires et écotoxicologiques liés aux effluents hospitaliers, thèse – INSA de Lyon – spécialités sciences et techniques du déchets, Lyon : p259.
- **Encyclopedia Universalis France SA. 1990, index « AD », 1 : 173, 507.**
- **Eyquem, A., Montagnier, L., Alouf, J. 2000.** Traité de microbiologie clinique. Deuxième mises jour et complément. Piccin Nouva Libraria S.P.A. Padoue. Italie. p :77-81.

## F

- **Fatou, D. 2002.** Données sur la sensibilité aux antibiotiques des souches de streptocoques déficients isolées d'infections respiratoires, ostéo-articulaires et cardiovasculaires. Thèse pour obtenir grade de Docteur en Pharmacie. Université Cheikh ANTA DIOP. Pp :40-45.
- Flandrois, J.P., Courcol, R., Lemlan, J, F., Ramiz, M., Sirot, J-C., Soussy, J.1997.** Bactériologie Médicale. p :81-135.
- **Fosse, J., Margas, C.2004.** Dnagers Biologiques et consommation des viandes. Ed : Lavoisier, Paris. p 220.
- **Fontaine, T and Hoadley, A. 1976.** Transferable drug resistance associated with coliforms isolated from hospital and domestic sewage. Health Lab. Sci. **13**: 238-245.
- Fontaine, T. and Chopade, A. 1994.** High levels of multiple metal resistances and its correlation to antibiotic resistance in environmental isolates of *Acinetobacter*. Biometals. **7**: 67-74.
- **Frederic Barbut, A., Denis Neyme, A. 2006.** *Revue Francophone des Laboratoires*. p 382.
- **Freney, J., Croze, M. 2007.** *Enterobacteriaceae – Généralités*, In Freney, J., Renaud, F., Leclercq, R., Riegel, P., *Précis de bactériologie clinique*, 2ème édition, Editions ESKA, p. 979-987.
- **Frederic Barbut A., Denis Neyme A. 2006.** *Revue Francophone des Laboratoires* .382 p.

## G

- Goñi Urriza, M., Capdepuy, M., Arpin, C., Raymond, N., Caumette, P and Quentin, C.2000.** Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. Appl. Environ. Microbiol. 66(1) :125-132.

- **Green, B.L., Clausen, E.M., Litsky, W. 1977.** Two-temperature membrane filter method for enumerating fecal coliform bacteria from chlorinated effluents. Appl. Environ. Microbiol. p247.

- **Grabow, W. and Prozesky, O. 1973.** Drug resistance of coliform bacteria in hospital and city sewage. Antimicrob. Agents Chemother. **3**: 175-180.

-**Guessennd, N.K., Ouattara, M.B., Ouattara, N.D., Nevry, R.K., Gbonon, V., Tiekoura, K.B., DOSSO, M.2013.** Étude des bactéries multirésistantes des effluents hospitaliers d'un centre hospitalier et universitaire (CHU) de la ville d'Abidjan (Côte d'Ivoire). Journal of Applied Biosciences. **69**: 5456 – 5464.

- **Guillaume, P.Y. (2004).** Les milieux de culture en microbiologie. [www.2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio/milieux](http://www.2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio/milieux)

## H

- **Halpern, B., Walbridge, S., Selkoe, K.A., Kappel, C, V., Micheli, F.2008.** A Global Map of Human Impact on Marine Ecosystems. Science :319, 5865-948.

-**Haenn, S., Accrombessi, H., Lavison, G., Moulin, L. 2007.** Concentration en antibiotique et influence sur les coliformes. In: PIREN-Seine. Rapport d'activité. <http://www.sisyph.upmc.fr/piren/book/139>.

- **Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T.1994.** in Bergey's Manual of Determinate Bacteriology, Ninth Edition. Williams &Wilkins. p 47.

- **Hygis, N. 1998.** Hygiène hospitalière. p 343,351.

## I

- **Igbiosa, R.M., Emmanuel, E., Etinosa, O., Igere, B., Igeleke, C.L. and Okoh, A. I. 2012** .Prevalence of Multiple Antibiotics Resistant (MAR) *Pseudomonas* Species in the Final Effluents of Three Municipal Wastewater Treatment Facilities in South Africa. Journal List Int. J. Environ. Res. Public Health .**9** (6) :339-366.

## J

- **Jadin, J.M et Lafontaine, A.1998.** De l'importance de la prévention des maladies nosocomiales principalement d'origine hydrique en hygiène hospitalière, Journal Européen d'Hydrologie.**28**(3) :271-282.

- **Jehannin, P.1999.** Caractérisation et gestion des rejets liquides hospitaliers – étude particulière de la station du centre hospitalier de Hyères (Var), Mémoire de fin d'étude - Spécialité Génie Sanitaire, Rennes : Ecole Nationale de la Santé Publique. p 71.

**K**

- **Kosma, C., Lambropoulou, D., Triantafyllos, A., 2010.** Occurrence and removal of ppcps in municipal and hospital wastewaters in greece. *Journal of Hazardous Materials* 179, 804–817.

- **Kümmerer, K. and Henninger, A. 2003.** Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and household into effluent. *Clinical Microbiology and Infection*, **9** (12): 1203-1214.

- **Kümmerer.K.2004.** Pharmaceuticals in the environment 2<sup>ème</sup> edition. p 9.

**L**

-**Larpent, J.P. 2000.** Introduction à la nouvelle classification bactérienne. Les principaux groupes bactériens. Ed. TEC & DOC. Paris p 280.

-**Leclerc, H., Oger, C.1974.** Les Eaux Usées des Hôpitaux et leur Importance Epidémiologique, *Rev. Epidem., Med. Soc. Et Santé Publ.***22**(3) :185 – 1998.

-**Leprat, P. 1998.** Les rejets liquides hospitaliers, quels agents et quelles solutions techniques? Troisième journée du Réseau Régional d'Hygiène de Basse- Normandie, Caen.

- **Leminor, L., Veron, M. 1989.** Bactériologie médicale. 2<sup>ème</sup> Ed : Flammarion, Médecine science. Paris. 245p.

- **Lévi, H. 2006.** Inquiétudes sur la présence d'antibiotiques et de bactéries antibiorésistantes dans les eaux. *Environnement, Risques et Santé.* 5 (4) : 261-265.

- **Liu, Q., Zhou, Y., Chen, L., Zheng, X., 2010.** Application of mbr for hospital wastewater treatment in china. *Desalination* 250, 605–608.

- **Lindemann, j and upper, C.D.1985.** Aerial dispersal of epiphytic bacteria over bean plants. *Applied and environmental Microbiology.* **50**:1229-1232.

-**Linton, K. B., Richmond, M. H., Bevan, R. and Gillespie, W. A. 1974.** Antibiotic resistance and R factors in coliform bacilli isolated from hospital and domestic sewage. *J. Med. Microbiol.* **7**: 91-103.

M

- Madigan M., Martinko, J.2007.**Brock Biologie des microorganismes.11 édition. p 686 .
- **Marchal, N., Bourdon, J. L., Richard, C. (1982).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Biologie appliquée. *Doin, Paris*, pp.50-385.
- Mansotte, F. and Jestin, E.2000.** Les rejets liquides des établissements de santé : Caractérisation à la source et impact sur l'environnement marin côtier. Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales de la Seine Maritime, Agence de l'Eau de la Seine Normandie, Nanterre. p 73.
- **Martínez, J.L.2012.** Natural antibiotic resistance and contamination by antibiotic resistance determinants: the two ages in the evolution of resistance to antimicrobials. *Frontiers in Microbiology*.
- Mehmet, F.G., Hosoglu, S., Ayaz, C., Celen, M.K., Cemal, U. 2008.** Surveillance of nosocomial infections in Dicle University Hospital: a ten-year Experience. *Turk J Med*; **38** (6): 587-593.
- **Montiel, A.2004.** *Revue Française des Laboratoires*. p 364.
- Moriñigo, M.A., Cornax, R., Castro, D., Jimenez-Notaro, M., Romero, P., Borrego, J.J. 1990.** Antibiotic resistance of Salmonella strains isolated from natural polluted waters. *J Appl Bacteriol* **68**: 297-302.
- **Michelbriand, K.2012.** Aspects de la résistance bactérienne aux antibiotiques, Ed : harmattan. p 12.

N

- **Nauciel, C et Vlida, J-C.2005.** Bactériologie médicale. Ed : Masson : 50-64.
- **Nauciel C.2000.**Abrégés Bactériologie médicale. Ed : Masson.Paris. p 112.
- **Njall, C. Adiougo, D., Bitá, A., Ateba, N., Sume, G., Kolloo, B., Binam, F., Tshoua, R. 2013.** Ecologie bactérienne de l'infection nosocomiale au service de réanimation de l'hôpital Laquintane de Douala, Cameron. *The Pan African Medical Journal*.

**O**

- **Ould Brahim Elkory, M. (1998)**. Bacille pyocyanique : identification et sensibilité aux agents antibactériens. Thèse de Magister, Université Badji Mokhtar-Annaba, 115p.

**P**

- **Pauwels, B., Fru Ngwa, F., Deconinck, S., Verstraete, W. 2006**. Effluent quality of a conventional activated sludge and a membrane bioreactor system treating hospital wastewater. *Environ Technol.* 27 :395-402.

-**Petrovic, M., Pérez,S., Barcelo, A.D. 2013**. Analysis, Removal, effects and Risk of pharmaceuticals in the water cycle. Occurrence and transformation in the environment .**62** : 655.

- **Pebert, F. 2003**. Maladies infectieuses. Edition heures de France. Paris, p : 144-150.

**R**

- **Ramoul, A. 2014**. Thèse de Magister Sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire des bactéries responsables d'infections respiratoires basses, UNIVERSITE BADJI MOKHTAR – ANNABA. p :73-75.

- **Rodier, J., Bazin, C., Brontin, J. P., Chambon, P., Champsaur, H., Rodier, L. (1996)**. L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer. *DUNOD, 8eme édition, Paris,1135p*.

**S**

- **Schlosser, O.1999**. Exposition aux eaux usées et risques microbiologiques. p 123.

-**Schlosser, O.1999**. Exposition aux eaux usées et risques microbiologiques.68p

-**Standardisation de l'Antibiogramme à l'échelle Nationale, 2001** : Médecine Humaine et Veterinaire.6<sup>eme</sup> édition. p :160-165.

-**Stuart, B.2002**. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **1** :25-30.

**T**

- **Twedt, R.M. 1989.** *Vibrio parahaemolyticus*. in: Doyle, M.P. (ed.) *Foodborne Food Bacterial Pathogens*, New York: Marcel Dekker. p: 543- 568.

**V**

- **Verlicchi, P., Galleti, A., Petrovic, M., Barceló, D., 2010.** ‘Hospital effluents as a source of emerging pollutants: an overview of micropollutants and sustainable treatment options’. *J. Hydrol.*, **389** (3-4), 416-428.

**Y**

- **Yernault, J.CL., Demedts, M.1997.** Infections respiratoire pour les spécialistes. p 14.

**W**

- **Walter, M. V., and Vennes, J. W.1985.** Occurrence of multiple antibiotic-resistant enteric bacteria in domestic sewage and oxidation lagoons. *Appl. Environ. Microbiol.* **50** p :930-933.

- **Willey, J.M., Sherwood, L, M., Woolverton, C.J. 2008.** Prescott, Harley et Klein, microbiology, : traduction de la 7e édition américaine par jean Dusart et Jacques Coyetteed la 3eme édition : de Boeck : p 850.

- **Willey, J.M., Linda, M.S. 2008.** Prescott, Harley, and Klein’s Microbiology” Seventh Edition :337-853.

- <http://www.historique-meteo.net/> (consulté le 03/05/2016)

- <http://www.meteo.dz/index.php> (consulté le 03/05/2016)





# Annexes

## Annexe I

Rejets de nature physico-chimique		Rejets de nature médicamenteux		Rejets biologiques
<b>Désinfectants</b>	Ce sont des produits chimiques capables de réaliser une désinfection, c'est-à-dire de détruire les germes pathogènes. Les désinfectants n'étant pas considérés comme des médicaments, leur fabrication et leur distribution sont libres ( <b>Carip, 2008</b> ).	<b>Antibiotique</b>	Substance chimique produite par un microorganisme détruisant ou empêchant la croissance d'un autre microorganisme ( <b>Madigan et Martinko, 2007</b> ).	<b>Urines</b>
<b>Solvants</b>	C'est un composé chimique qui en dissout un autre. Par exemple, l'eau dissout le sel de cuisine ou le sucre ( <b>Thomas, 2006</b> ).	<b>Antiseptique</b>	C'est un médicament (au sens du Code de la santé publique) utilisé pour réaliser une antiseptie. Les antiseptiques sont fabriqués et distribués par le réseau pharmaceutique. ( <b>Carip, 2008</b> ).	<b>L.C.R</b>
<b>Déchets de radioactive</b>	Toute substance dont aucun usage n'est prévu et dont le niveau de radioactivité ne permet pas la décharge sans contrôle dans l'environnement.	<b>Anticoagulant</b>	Substances réduisant la coagulabilité du sang en agissant sur l'une ou plusieurs étapes de la coagulation ( <b>Encyclopedia Universalis, 1990</b> ).	<b>Sang</b>
<b>Pollution thermique</b>	Rejets d'eau chaude.			
<b>Détergents</b>	Un détergent est défini comme étant une matière tensio-active qui est dissoute dans de l'eau ou un solvant organique afin d'augmenter le pouvoir de nettoyage de l'eau ou de solvant ( <b>Brill, 1951</b> ).	<b>Autres</b>	-Anti-inflammatoire - Anti-oxydants - Antiviraux -Comprimé, sirop, solutions nasales... etc.	<b>Selles</b>

**Tableau XX** : les différents rejets des effluents hospitaliers.

**Tableau XXI** : Les différentes caractéristiques du genre *Staphylococcus*.

		<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	Autres
<b>Coagulase</b>		-	-	-	-
<b>Fermentation</b>	<b>Glucose</b>	+	+	+	+
	<b>Mannitol</b>	-	V	+	V
	<b>Xylitol</b>	-	-	+	-
<b>Phosphatase</b>		+	-	-	V
<b>Dnase</b>		+	-	-	V

(Denis *et al.*, 2007)

V : Variable

+ : 90% ou plus de souches positives

- : 90% ou plus de souches négatives

**Tableau XXII** : Les caractères biochimiques de différentes espèces de *Pseudomonas*.

Espèce		<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. monteilii</i>
Caractères					
<b>Pigment</b>		PC+PV	PV	PV	PV
<b>Nombre flagelles</b>		1	>1	>1	>1
<b>Oxydase</b>		+	+	+	+
<b>Croissance</b>	À 47 C°	+	-	-	-
	À 4 C°	+	+	+	-
<b>Réduction NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>		+	-	-	-
<b>ADH</b>		+	+	+	+
<b>Hydrolyse</b>	<b>Gélatine</b>	+	-	-	-
	Lécithinase	V	-	-	-
	Urée	V	-	-	V
<b>Citrate Simmons</b>		+	+	+	+
<b>Acidification</b>	Glucose	+	+	+	+
	Tréhalose	-	+	-	-
	Mannitol	+	+	-	-
	Xylose	+	+	+	-
	Maltose	-	-	V	-

(Denis et al., 2007)

V : variable

+ : 90% ou plus de souches positives a

- :90% ou plus de souches négatives

## **Annexe II :**

### **Matériel non biologique :**

#### **Milieux de culture liquides :**

- Rothe (Glucose à l'azide de sodium)
- EVA LITSKY
- Giolitti Cantoni
- EPA : Eau Peptonée Alcaline

#### **Milieux de culture solides :**

- Chapman
- Gélose au cétrimide
- GNAB : Gélose Nutritive Alcaline Biliée
- VF : Gélose viande de foie
- Mueller Hinton
- King A
- King B

#### **Réactifs et colorants**

- Tellurite de potassium
- Alun de fer
- Sulfite de sodium
- Kovacs
- TDA (tryptophane désaminase)
- VPI ET VP II (Voges-Proskauer)
- Violet de gentiane
- Fuschine.
- Lugol
- Alcool
- Huile de vaseline

#### **Petits matériels**

- Bouteilles stériles de 250 ml
- Glacière
- Bloc réfrigérant
- Tubes à essai
- Portoir pour tubes à essai
- Pipettes pasteur
- Pipettes graduées
- Ecouillons
- Anse d'inoculation et support
- Boîtes de Pétri stériles

- Eau physiologique stérile
- Lames et lamelles
- Microscope
- Pied à coulisse
- Pincés stériles
- Bec Bunsen

**Tableau XXIII : Table NPP**

<b>1 x 50 ml</b>	<b>5 x 10 ml</b>	<b>5 x 1ml</b>	<b>Nombre caractéristique</b>
0	0	0	<1
0	0	1	1
0	0	2	2
0	1	0	1
0	1	1	2
0	1	2	3
0	2	0	2
0	2	1	3
0	2	2	4
0	3	0	3
0	3	1	5
0	4	0	5
1	0	0	1
1	0	1	3
1	0	2	4
1	0	3	6
1	1	0	3
1	1	1	5
1	1	2	7
1	1	3	9
1	2	0	5
1	2	1	7
1	2	2	10
1	2	3	12
1	3	0	8

1	3	1	11
1	3	2	14
1	3	3	18
1	3	4	21
1	4	0	13
1	4	1	17
1	4	2	22
1	4	3	28
1	4	4	35
1	4	5	43
1	5	0	24
1	5	1	35
1	5	2	54
1	5	3	92
1	5	4	160
1	5	5	>240

**Tableau XXIV** : Méthodes de dénombrement de *Staphylococcus aureus* sur milieu solide

Boites \ Dilution	Dilution			UFC/ml
	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	
<b>1</b>	+	+	+	1000
<b>2</b>	+	+	-	100
<b>3</b>	+	-	-	10



**Tableau XXV : Lecture de la galerie miniaturisée Api 20E**

<b>Tableau de la lecture de la galerie miniaturisée Api 20<sup>E</sup></b>				
<b>Tests</b>	<b>Substrat</b>	<b>Réactions-enzymes</b>	<b>Résultats</b>	
			<b>Négatif</b>	<b>Positif</b>
<b>ONPG</b>	Ortho-nitro-phenyl-galactosidase	Beta-galactosidase	Incolore	Jaune
<b>ADH</b>	Arginine	Arginine dé hydrolase	Jaune	Rouge/orange
<b>LDC</b>	Lysine	Lysine décarboxylase		
<b>ODC</b>	Ornithine	Ornithine décarboxylase		
<b>CIT</b>	Citrate de sodium	Utilisation de citrate	Vert pale /jaune	Bleu-vert/vert
<b>H2S</b>	Thiosulfate de sodium	Production de H2S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir
<b>URE</b>	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orange
<b>TDA</b>	Tryptophane	Tryptophane désaminase	<b>Réactif TDA</b>	
			Jaune	Marron foncé
<b>IND</b>	Tryptophane	Production d indole	<b>Réactif de KOVACS</b>	
			Jaune	Anneau rouge
<b>VP</b>	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	<b>VP1+VP2/10min</b>	
			Incolore	Rose/Rouge
<b>GEL</b>	Gélatine de Kohn	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion de pigment noir
<b>GLU</b>	Glucose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>MAN</b>	Mannitol			
<b>INO</b>	Inositol			
<b>SOR</b>	Sorbitol			
<b>RHA</b>	Rhamanose			
<b>SAC</b>	Saccharose			
<b>MEL</b>	Melibiose			
<b>AMY</b>	Amyglaline			
<b>ARA</b>	Arabinose			

**Tableau XXVI :** Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour *Pseudomonas aeruginosa*

Antibiotiques testés	Charges des disques	Diamètres critiques (mm)		
		R	I	S
Imipenème	10µg	≤13	14-15	≥16
Gentamycine	10µg	≤12	13-14	≥15
Tobramycine	10µg	≤12	13-14	≥15
Colistine	10µg	≤10	-----	≥11

**Tableau XXVII :** Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour *Staphylococcus spp.*

Antibiotiques testés	Charges des disques	Diamètres critiques (mm)		
		R	I	S
Oxacilline (S. aureus)	10µg	≤10	11-12	≥13
Gentamycine	10µg	≤12	13-14	≥15
Kanamycine	30µg	≤13	14-17	≥18
Erythromycine	15µg	≤13	14-22	≥23
Clindamycine	15µg	≤14	15-20	≥21
Vancomycine	30µg	----	-----	-----
Ofloxacine	5µg	≤14	15-17	≥18
Tétracycline	30µg	≤14	15-18	≥19
Chloramphénicol	30µg	≤12	13-17	≥18
Pristinamycine	15µg	<19	19-21	≥22
Acide fusidique	10µg	<24	-----	≥24

**Tableau XXVIII : Les charges bactériennes dans l'ensemble des prélèvements**

Date	31/01/2016			14-29/02/2016						13-27/03/2016						10-24/04/2016						02/05/2016		
Prélèvement	P1			P2			P3			P4			P5			P6			P7			P8		
Hôpital	BT	BB	FF	BT	BB	FF	BT	BB	FF	BT	BB	FF	BT	BB	FF	BT	BB	FF	BT	BB	FF	BT	BB	FF
<b>Unité :UFC/100 ml dans une solution mère</b>																								
Strep-D	6	7	5	5	3	-	-	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Unité : 10<sup>6</sup>/ml dans une dilution de 10<sup>-5</sup></b>																								
Aero	-	-	-	79	-	-	-	-	-	3,1	-	18,2	-	10,5	14,3	66	-	69,1	-	-	-	88,1	-	141
Pseudo	-	-	-	107	-	-	-	-	80,1	-	-	-	69,1	-	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vib	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22,3	-	-
<b>Unité :spore/20ml dans une dilution de 10<sup>-2</sup></b>																								
Clos	63	72	105	-	12	-	-	-	-	-	-	-	15	22	200	-	-	-	-	-	-	-	70	-
<b>Unité : UFC/ml</b>																								
Staph.a	1000	100	1000	-	-	-	-	1000	100	-	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100

**BT : Brahim Tirichine / BB: Ben Bouali / FF: Frantz Fanon**

