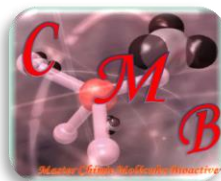




DRS
Université Sidi Mohammed Ben Abdellah
Faculté des Sciences et Techniques
www.fst-usmba.ac.ma

Année Universitaire : 2016-2017

Master Sciences et Techniques : CMBA
Chimie des Molécules Bio Actives



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Validation d'un protocole de désinfection des surfaces d'un service hospitalier

Présenté par:

JAOUHAR Mourad

Encadré par:

- ✓ Dr BERRADA S. (LRDEHM)
- ✓ Pr BOULAHNA A. (FSTF)

Soutenu Le 15 juin 2017 devant le jury composé de:

- Dr BERRADA S. (LRDEHM)
- Pr BOULAHNA A. (FSTF)
- Pr AMEZIANE C. (FSTF)
- Pr FARAH A. (FSTF)

Stage effectué à : Laboratoire régional de diagnostic épidémiologique et
d'hygiène du Milieu.



Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques



Nom et prénom: JAOUHAR Mourad

Année Universitaire : 2016/2017

Titre: Validation d'un protocole de désinfection des surfaces d'un service hospitalier

Résumé

La réalité du risque infectieux en hémodialyse a été étudiée par plusieurs publications selon lesquelles les infections nosocomiales y seraient 100 fois plus fréquentes que dans la population générale. La surveillance microbiologique de l'environnement hospitalier représente un des axes de la politique de lutte contre ces infections, quoique l'implication de l'environnement dans leur survenue ne soit pas connue avec précision

Dans le cadre de la maîtrise du risque infectieux lié à l'environnement d'hémodialyse, nous avons mené ce travail dont les objectifs ont consisté à évaluer in situ un protocole de désinfection, à vérifier l'efficacité de certains désinfectants, à rechercher les dilutions minimales d'inhibition et le temps d'action, et à valider le Protocole de désinfection.

144 tables prélevées au niveau du centre d'hémodialyse de l'hôpital AL GHASSANI, par la technique d'écouvillonnage, ont fait l'objet des contrôles réalisés. Leurs analyses ont été effectuées au Laboratoire régional de diagnostic épidémiologique et d'hygiène du Milieux (LRDEHM) de Fès.

Les tests du protocole expérimental soulignent l'existence d'une diminution de l'efficacité des désinfectants. L'application de désinfectant D1 à une dilution minimale d'inhibition (1/25), a permis une réduction de 325UFC. Pour le désinfectant D2 dilué au 1/50, la réduction est de 666 UFC. La variation pour les deux désinfectants n'était pas significative. Quant à la validation du protocole de désinfection appliquée après recherche et application des dilutions minimales d'inhibition et du temps d'action, et après procédure de nettoyage, elle a révélé une efficacité très importante du désinfectant D1 appartenant à la classe des ammoniums quaternaires et du désinfectant D2 qui se classe parmi les aldéhydes.



Leurs dilutions minimales respectives étaient 1/12 et 1/25. Le TMI du désinfectant D1 et D2 est respectivement de 60 min et 80min pour la quasi-totalité des germes. Le désinfectant D1 a montré une réduction de la charge microbienne de 12623,07 UFC. Pour le désinfectant D2, la réduction est de 12630 UFC, ce qui correspond à un effet bactéricide maximum.

Pour prévenir le risque infectieux en hémodialyse, il est recommandé de sensibiliser les responsables et tous les intervenants sur l'importance et le respect de la désinfection de l'environnement, de réaliser systématiquement un nettoyage et une désinfection selon un protocole adéquat et validé, d'alterner périodiquement les désinfectants et de respecter les recommandations et les bonnes pratiques d'hygiène.

Mots clés : Infections nosocomiales, hygiène, désinfection, nettoyage, Environnement hospitalier, protocole, validation.



DEDICACES

Je tiens à dédier cet humble travail :

- ❖ A Ma famille avec tous mes sentiments de respect, d'amour, de gratitude et de reconnaissance pour tous les sacrifices déployés pour m'élever dignement et assurer mon éducation dans les meilleures conditions.
- ❖ A Mes enseignants, sans exception, pour leurs efforts afin de m'assurer une formation solide et gravée dans mon esprit.
- ❖ A l'ensemble du personnel et stagiaires du Laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu de Fès (LRDEHM).
- ❖ A Mes amis et à tous ceux qui me sont chers pour leur aide, leur soutien, leur encouragement et leur assistance.



REMERCIEMENTS

Je remercie, tout d'abord, Dieu, le tout Puissant, le Miséricordieux, qui m'a donné la force et la volonté pour élaborer ce travail.

J'adresse mes vifs remerciements et ma gratitude :

Au Dr. **BELOUTI M.** Directeur régional de la santé de la région Fès-Meknès, de m'avoir accordé l'opportunité d'effectuer mon projet de fin d'études au sein de cet honorable établissement.

A Mr **IJJAALI M.**, doyen de la Faculté des Sciences Techniques Fès, et Mr le Pr **OUAZZANI F.**, responsable du Master Sciences et Techniques : CMBA

Chimie des Molécules Bio Actives

A Mr **CHERIGUI M.**, responsable du Laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu pour l'accueil et l'aide qu'il m'a assuré pour mener à bien ce travail.

A mon encadrant de stage Dr. **BERRADA S.**, responsable qualité du LRDEHM, et responsable de l'unité de dépistage néonatal de l'hypothyroïdie congénitale, et Au Pr **BOULAHNA A.**, encadrant interne de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès (FSTF), pour la qualité de l'encadrement scientifique et méthodologique qu'ils m'ont assurés, leur encouragement, leur attention très précieuse, leur aide attentive, les conseils qui m'ont orientés aux résultats de mes ambitions souhaitées pour la réussite.

Vous n'avez jamais lésiné ni sur votre temps ni sur votre savoir tout le long de ce travail. Sans votre Clairvoyance, vos corrections méticuleuses, ce travail n'aurait pu être préparé et dirigé dans des conditions favorables. Vous avez toujours réservé le meilleur accueil, malgré vos obligations professionnelles. Merci pour votre soutien, votre patience, vos encouragements et votre optimisme infailible, merci d'avoir trouvé les mots qu'il faut aux moments qu'il faut.

Au Pr **AMEZIANE C.** et au Pr **FARAH A.**, d'avoir accepté de juger ce travail.

A Mr **SABREI H.** coordonnateur du LRDEHM, ainsi qu'à tous les membres du LRDEHM-Fès d'avoir contribué au bon déroulement de mon stage, aussi bien pour leur aide que pour leur convivialité.

Au Dr **MAAROUFI C.**, médecin-chef du centre d'hémodialyse de l'hôpital AL GHASSANI de Fès, ainsi qu'à tout le personnel du service, pour leur accueil chaleureux et l'aide qu'ils m'ont apporté pour mener à bien ce travail.

A tous.....Merci



LISTE DES ABREVIATIONS

IN : Infection nosocomiale.

USD: United States Dollar.

PHMD: Polyhexaméthylènes biguanides.

HTAB: Bromure d'hexatriméthylammonium.

HPCl.: Chlorure d'hexadécyl pyridinium.

ADN : Adénine désoxyribonucléique.

ARN: Acide ribonucléique.

ONPG: Ortho-nitro-phényl-galactoside.

UFC : Unité Formant Colonie.

VND : validation du nettoyage et de désinfection.

BPF : Bonnes pratiques de fabrication.

PCA : Plate Count Agar.

BHI : Brain Heart Infusion.

BGP : Bacilles Gram positif .

BGN F: Bacilles Gram négatif oxydase négatif fermentaires.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

TMI : Temps minimal d'inhibition = temps minimal de contact.

FST : Faculté des sciences et technique.

LRDEHM : Laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu.

OMS : Organisation Mondiale de la Sante.

SIAAP : Service d'Infrastructure d'Action Ambulatoire et Préfectoral

DRS : Direction Régionale de la Santé



LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

1. Liste des Tableaux

Tableau 1: Spectres d'activités des principaux désinfectants	19
Tableau 2: Moyenne des dénombrements en UFC au cours des 2 1 ^{ers} cycles (48sites contrôlés)	45
Tableau 3: Moyenne des dénombrements en UFC au cours du 3 ^{ème} et 4 ^{ème} cycles (48sites contrôlés)	45
Tableau 4: Dilution minimale d'inhibition du désinfectant D1.....	46
Tableau 5: Temps minimal de contact du désinfectant D1	48
Tableau 6: Dilution minimale d'inhibition du désinfectant D2.....	49
Tableau 7: Temps minimal de contact du désinfectant D2	50
Tableau 8: Moyenne des dénombrements en UFC au cours du 5 ^{ème} et 6 ^{ème} cycles (48sites contrôlés)	50

2. Liste des Figures

Figure 1: Représentation schématique d'un agent tensioactif.....	8
Figure 2: Exemple de tensioactif anionique :le dodécylsulfate de sodium (SDS).....	8
Figure 3: Exemple de tensioactif cationique : le HTAB et le HPCL.....	9
Figure 4: Exemples de tensioactifs zwitterionique : la sulfobétaine et la carboxybétaine	9
Figure 5: Exemple de polyoxyéthylène POE	9
Figure 6: Schématisation de l'action du détergent sur une souillure	11
Figure 7: Structure des ammoniums quaternaires	14
Figure 8: Structure des Dérivés phénoliques	15
Figure 9: Structure d'acide peracétique.....	17
Figure 10: Structure chimique de la chlorhexidine.....	17
Figure 11: Schéma de la sédimentation des particules	28
Figure 12: Schéma de la méthode de prélèvement de l'air par aspiration	28



Figure 13: Schématisation des étapes de la validation d'un protocole de désinfection	31
Figure 14: Variation de l'absorbance en fonction des dilutions du désinfectant D1	47
Figure 15: Variation de l'absorbance en fonction des dilution du désinfectant D2	49
Figure 16: Pourcentage de contamination de l'air	51
Figure 17: Répartition des bactéries isolées des prélèvements d'air en fonction de la coloration de Gram	52
Figure 18: Distribution globale des bactéries isolées des prélèvements de l'air.....	52



GLOSSAIRE

- + **Bactéricide** : Agent antimicrobien pouvant détruire les cellules végétatives bactériennes.
- + **Bactériémie** : Présence éphémère de bactéries dans le sang.
- + **Biocides** : Ensemble des produits chimiques dont l'action est de détruire ou d'empêcher le développement des micro-organismes.
- + **Biofilm** : Enduit bactérien complexe se créant sur des conduits naturels ou artificiel.
- + **Cathéter** : Tige creuse que l'on place dans un canal naturel.
- + **Contamination** : Présence d'une substance étrangère dans un lieu ou dans un produit
- + **Contrôle** : Série planifiée d'observations ou de mesures d'un paramètre donné (p. ex., contrôle du nettoyage des chambres des clients/patients/résidents).
- + **Désinfection chimique** : Réduction du nombre de micro-organismes dans ou sur une matrice inanimée, obtenue grâce à l'action irréversible d'un produit sur leur structure ou leur métabolisme, à un niveau jugé approprié en fonction d'un objectif donné.
- + **Epidémie** : Développement et propagation rapide d'une maladie contagieuse, le plus souvent d'origine infectieuse, dans une population
- + **Infections nosocomiales** : Ce sont des infections contractées au cours d'un séjour dans un établissement de santé. Elles sont aussi appelées infections associées aux soins.
- + **Prélèvement** : Opération qui consiste à prendre une fraction d'une masse ou d'une population selon une procédure définie.
- + **Prévalence** : Mesure à un instant donné du nombre de cas d'une maladie. (Nouveaux et anciens) rapporté à l'effectif de la population étudiée.
- + **Procédé** : Ensemble de moyens et d'activités liés qui transforment des éléments entrants en éléments sortants.
- + **Qualification** : Opération destinée à démontrer qu'un matériel fonctionne correctement et donne réellement les résultats attendus. Le concept de validation est parfois élargi pour comprendre celui de qualification.
- + **Sonde** : Instrument cylindrique en forme de tige ou de tube fin, introduit à l'intérieur du corps dans un dessein diagnostique ou thérapeutique.
- + **Tensioactivité** : Aptitude des corps mis en solution à modifier la tension superficielle du solvant.
- + **UFC** : Unité formant colonie, c'est le moyen de rendre compte du nombre de germe isolé dans un prélèvement.
- + **Validation** : Etablissement de la preuve documentée avec un haut degré d'assurance qu'un procédé spécifique produira régulièrement les résultats ses comptés en termes de qualité et de spécifications.



Présentation du LRDEHM

Le laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu (LRDEHM) de Fès, fait actuellement partie de la Direction Régionale de la Santé (DRS) du Ministère de la Santé (MS), est une personne morale mandataire de l'État. L'unité du paludisme a été créée depuis 1960 et était liée au Service d'Infrastructure d'Action Ambulatoire et Préfectoral (SIAAP). Les unités de l'hygiène Alimentaire et de la syphilis étaient attachées au laboratoire d'analyse médicale. C'est en 1997 que l'ensemble de ces unités ont été regroupées dans une seule structure le LRDEHM.

La parasitologie de la leishmaniose cutanée est devenue opérationnelle et intégrée à l'unité des maladies parasitaires à partir de l'année 2000. Les tests de la sensibilité OMS des larves et des moustiques aux insecticides et le dépistage de porteurs des germes ont été instaurés au LRDEHM respectivement en 2004 et en 2008. Les activités de la sérologie de la syphilis (VDRL+TPHA) et celles du dépistage de porteurs des germes ont été réintégrées au laboratoire clinique de l'hôpital El GHSSANI en décembre 2009. Actuellement, le LRDEHM est composé de cinq unités, d'une cellule du système qualité et statistique (voir organigramme). Le LRDEHM de Fès est installé à Hôpital Al GHASSANI, Dhar EL Mahraz.

En plus du responsable du laboratoire, il comporte en personnel 12 cadres répartis en 5 Docteurs Scientifiques, 2 ingénieurs d'état, 4 techniciens et l'infirmier-chef.

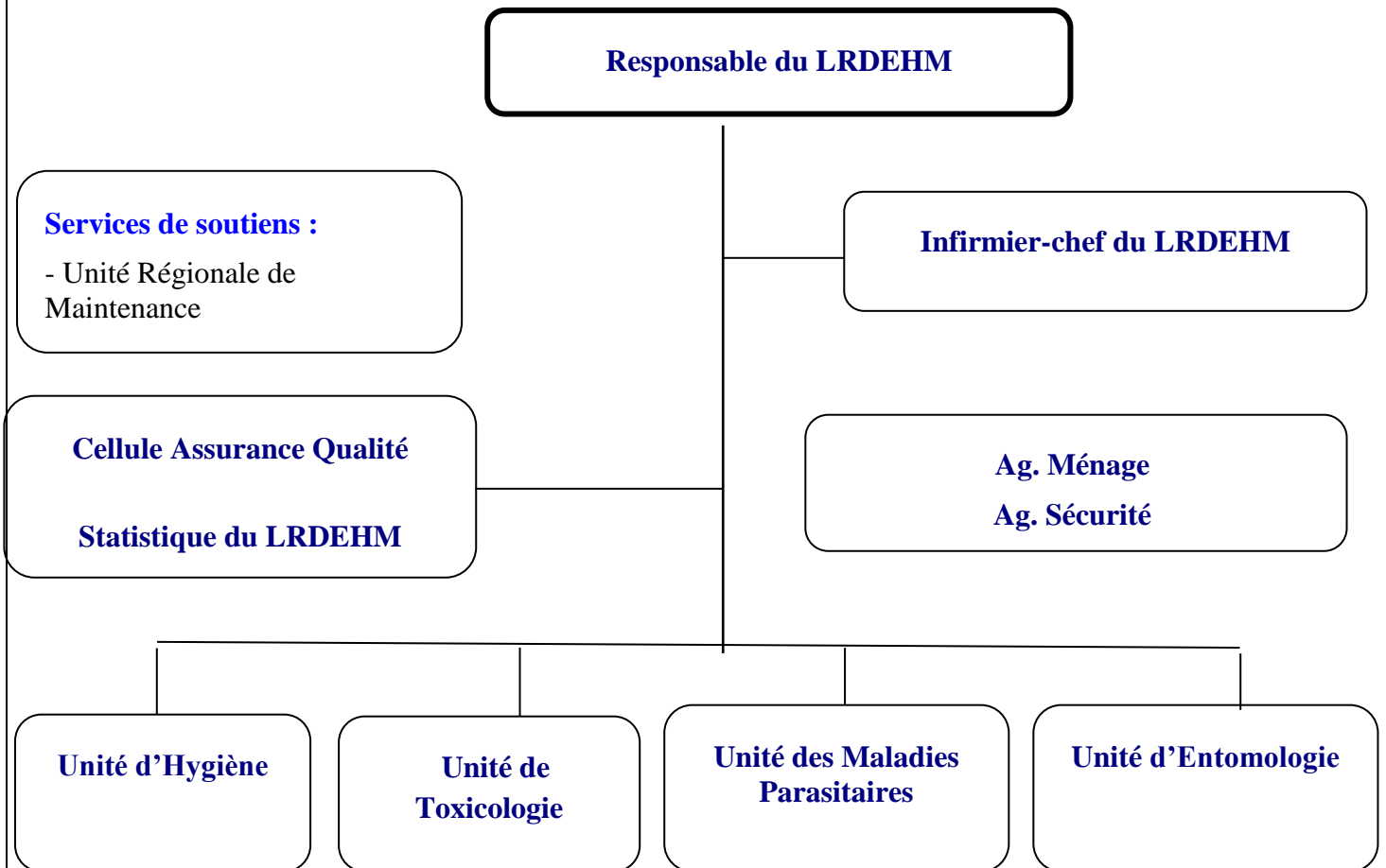
Ce laboratoire a été accrédité dans le volet des eaux d'alimentation humaine en avril 2012, selon la norme NM ISO 17025. L'accréditation obtenue atteste de la compétence du personnel et de l'impartialité des analyses et permet, au niveau national et international, la reconnaissance des prestations d'analyses effectuées par ce laboratoire dont la portée est spécifiée par l'accréditation.



DRS



ORGANIGRAMME DU LRDEHM -Fès





Sommaire

DEDICACES	<i>i</i>
REMERCIEMENTS	<i>ii</i>
LISTE DES ABREVIATIONS	<i>iii</i>
LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES	<i>iv</i>
GLOSSAIRE	<i>v</i>
Présentation du LRDEHM	<i>vi</i>
INTRODUCTION GENERALE	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	2
I. Les infections nosocomiales	2
I.1.Définition.....	2
I .2.Modes de transmission des infections nosocomiales	2
I.3.Mécanismes de transmission.....	2
I.4.Germes en cause.....	3
I.5.Origines des germes	3
I.6.Principales infections nosocomiales.....	4
I.7.Facteurs favorisant les infections nosocomiales	4
I.8.Epidémiologie des infections nosocomiales	5
I.9.Conséquences des infections nosocomiales	5
I.10.Prévention des infections nosocomiales	5
I.10.1.L'Hygiène	6
I.10.2.Isolement.....	6
I.10.3.Mesures spécifiques.....	7
II. Nettoyage et désinfection	7
II.1.Nettoyage	7
II.1.1. Produits de nettoyage	7
II.1.2.Composition des détergents	8



II.1.3.Types de détergents.....	8
II.1.4.Facteurs influençant le nettoyage	10
II.1.5.Mécanisme de nettoyage.....	11
II.2. Désinfection	12
II.2.1.Désinfectants.....	12
II.2.2. Distinction entre détergents et désinfectants	13
II.2.3. Classes de désinfectants	13
II.2.4.Mécanisme d'action générale.....	18
II.2.5. Spectre d'activité des désinfectants	18
II.2.6.Caractéristiques recherchées des désinfectants	19
II.2.7. Conservation	20
II.2.8. Evaluation de l'action antimicrobienne des désinfectants	20
II.2.9. Etapes de la procédure de désinfection.....	21
II.3.Résistance bactérienne aux antimicrobiens	23
a- Définition	23
b- Type de résistance	23
c- Mécanismes génétiques de la résistance acquise :	23
III. Validation d'un protocole de désinfection et nettoyage	24
III.1.Généralités	24
III.2.Conditions pré requises à la validation.	24
III.2.1 Niveau de propreté à atteindre	25
III.2.2.Qualification des locaux et des équipements	25
III.2.3.Qualification du personnel.....	25
III.2.4. Qualification des agents de nettoyage et désinfection	25
III.2.5. Qualification du matériel de désinfection	25
III.2.6.Procédures de nettoyage et de désinfection.....	26
III.3. Contrôle des processus de nettoyage et de désinfection	26
III.3.1. Contrôle des opérations de nettoyage	26
III.3.2. Contrôle des opérations de désinfection.....	27



III.3.2.1	Prélèvements de surface et de l'air	27
1-	<i>Prélèvement de surface</i>	27
2-	<i>Prélèvement d'air</i>	28
III.3.2.2	Analyse des prélèvements	29
III.4.	Validation d'un protocole de nettoyage et de désinfection	29
III.4.1	Plan général de la validation de nettoyage et/ou de désinfection	30
III.4.2	Etapas de validation d'un protocole de désinfection	30
III.4.3	Rapport de validation du protocole de nettoyage et de désinfection	31
III.4.4	Suivi de la validation de nettoyage	32
III.4.5	Actions correctives	32
III.4.6	Revalidation.....	32
MATERIEL ET METHODES	33
I.	Type et période d'étude	33
II.	Lieu et points de prélèvements	33
III.	Lieu d'étude	33
IV.	Matériels	33
IV.1.	Matériel et consommable utilisé pour le prélèvement	33
IV.2.	Matériel et consommable utilisé au laboratoire	33
IV.3.	Désinfectants et détergents utilisés.....	34
V.	méthodes.....	34
V.1.	Prélèvements, conservation, et transport des échantillons au laboratoire	34
V.1.1.	Prélèvement de surfaces.....	34
V.1.2.	Prélèvement d'air.....	35
V.2.	Culture des prélèvements de surfaces et de l'air.....	35
V.2.1	Prélèvements de surfaces.....	35
V.2.2.	Prélèvements d'air	35
V.3.	Identification des cultures obtenues sur gélose au sang et sur milieu PCA.....	35
V.3.1.	Coloration de Gram.....	35



V.3.2. Identification biochimique	36
V.4. Recherche de la dilution minimale d'inhibition et le temps minimal de contact des désinfectants	42
V.4.1. Détermination de la dilution minimale cible (CMI)	42
V.4.2. Détermination du temps minimal d'inhibition (TMI)	42
V.5. Validation de la procédure de nettoyage et de désinfection	42
VI. Analyse statistique	43
RESULTATS	44
I. Résultats relatifs au test du protocole expérimental	44
I.1. Procédure sans nettoyage	44
I.2. Procédure avec nettoyage	45
II. Recherche de la dilution minimale d'inhibition et le temps minimal de contact des désinfectants	46
II.1. Désinfectant D1 à base d'ammonium quaternaire	46
II.1.1. Dilution minimale d'inhibition	46
II.1.2. Temps minimal de contact	47
II.2. Désinfectant D2 à base de formaldéhyde	48
II.2.1 Dilution minimale d'inhibition	48
II.2.2. Temps minimal de contact	49
III. Résultats relatifs à la validation du protocole de désinfection	50
IV. Contrôle de l'air	51
IV.1. Pourcentage de contamination	51
IV.2. Répartition des germes isolés en fonction de la coloration de Gram	52
IV.3. Distribution globale des bactéries isolées des prélèvements d'air	52
DISCUSSION	53
CONCLUSIONS, RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES	57
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	59
ANNEXES	66



INTRODUCTION GENERALE

Les infections nosocomiales (IN) constituent une situation préoccupante dans le monde entier du fait de leurs morbidités et mortalité élevées, mais également de leur retentissement humain et économique considérable (**EL RHAZI, 2007**). En hémodialyse, la réalité du risque infectieux a été étudiée par plusieurs publications selon lesquelles les infections nosocomiales y seraient 100 fois plus fréquentes que dans la population générale (**BERRADA *et al*, 2017**).

L'implication directe de l'environnement hospitalier dans la survenue de ces infections est discutée et reste difficile à évaluer (**BERRADA, 2016**). Certains considèrent que son rôle est négligeable, d'autres pensent au contraire qu'il sert de relais dans les transmissions croisées, notamment pour les bactéries à Gram positif (BGP), et que la contamination microbiologique des surfaces favoriserait l'émergence des infections nosocomiales pour les patients les plus fragiles (**TALON 1999 ; ADNET *et al*, 2005**). La maîtrise de ce risque est donc un élément important de la prévention des infections nosocomiales (**DUMARTIN, 2011**). Elle repose sur trois paramètres : l'entretien et une désinfection rigoureuse, réalisée quotidiennement, associés à la surveillance microbiologique (**ROUILLON *et al*, 2006**).

Dans le cadre de l'amélioration de la qualité des soins et de la réduction des infections nosocomiales en hémodialyse, une étude a été menée par **BERRADA (2016)**, au centre d'hémodialyse de l'hôpital AL GHASANI de Fès. Elle avait montré une efficacité *in vitro* de certains désinfectants à base d'ammonium quaternaire et à base de formaldéhyde. Par ailleurs, une validation du protocole *in situ* visant à démontrer de manière scientifique et documentée, l'efficacité et la reproductibilité des essais expérimentaux devrait être menée. La validation du processus de nettoyage-désinfection permet en effet de prouver que l'application de ses différentes étapes dans des conditions préétablies, aboutit à une surface ne comportant pas de contamination supérieure aux limites préalablement fixées (**LEDOUX CHLOE, 2014**).

Dans ce contexte et dans le cadre de notre projet de fin d'études, nous avons mené ce travail intitulé :

« Validation d'un protocole de désinfection des surfaces d'un service hospitalier »

Les objectifs ont consisté à :

- Tester le protocole expérimental préalablement établi ,
- Evaluer la procédure de nettoyage ainsi que celle de la désinfection,
- Déterminer la dilution minimale d'inhibition ainsi que le temps minimal de contact,
- Contrôler la qualité microbiologique de l'air,
- Valider le protocole de nettoyage et de désinfection
- Identifier la flore bactérienne retrouvée.



REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les infections nosocomiales

I.1. Définition

L'adjectif « nosocomial » vient du grec : *nosos*=maladie, *komein*= soigner, «*nosokomeion*», signifiant « hôpital ». (LANTERO, 2016).

Selon l'OMS, une infection nosocomiale ou infection hospitalière peut être définie comme étant une infection survenant à l'hôpital ou dans un autre établissement de santé, chez un patient admis pour une raison autre que cette infection et chez qui cette infection n'était ni présente ni en incubation au moment de l'admission (OMS, 2009).

I.2. Modes de transmission des infections nosocomiales

En milieu hospitalier, la transmission peut se faire par contact direct ou indirect.

- ✚ Transmission par contact direct: favorisée par les mains du personnel soignant, qui jouent en effet un rôle important dans le transfert passif des micro-organismes d'un malade à l'autre ;
- ✚ Transmission par contact indirect: les objets et les matériaux présents à l'hôpital peuvent servir de support de transmission. Ces objets comportent les instruments de chirurgie, le matériel destiné au sondage, aux injections, les endoscopes, les stéthoscopes...

Des autres modes de transmission existent quoiqu'ils jouent un rôle moins important dans l'hôpital. C'est le cas par exemple de la transmission par voie aérienne qui peut affecter des patients particulièrement susceptibles (patients en salle d'opération, ou sévèrement immunodéprimés); et de la transmission par l'intermédiaire d'un support contaminé (nourriture, liquide de perfusion...) qui s'observe sporadiquement dans le cadre d'épidémies (QASSIMI, 2010).

I.3. Mécanismes de transmission

La transmission peut se faire par auto infection, hétéro infection, xéno infection ou par exo infection.

- ✚ **L'auto-infection** : elle s'observe lorsque le malade s'infecte par ses propres germes soit in situ, soit à partir de l'environnement immédiat comme la surface de la peau, les vêtements et les lits. Ces infections sont dues généralement aux germes saprophytes qui deviennent pathogènes à la suite d'une antibiothérapie itérative ou d'un traitement immunosuppresseur. Les complications infectieuses respiratoires liées au décubitus et ses conséquences sur le drainage des voies aériennes peuvent être des auto- infections (KONE, 2010).



- ✚ **L'hétéro-infection** : c'est la contamination d'un patient par les germes d'un autre patient transmis de manière indirecte
- ✚ **La xéno-infection** : la contamination du patient est causée par des germes importés au sein de la structure de soins par l'admission de nouveaux malades, plus rarement de personnel ou des visiteurs porteurs d'une maladie infectieuse.
- ✚ **L'exo-infection** : elle résulte d'une défaillance de type erreur ou à une insuffisance dans les procédures d'asepsie (**HADDADI, 2013**).

I.4. Germes en cause

Les agents en cause sont variés. Il peut s'agir de bactéries, de champignons, de virus ou de parasites.

✚ **Les bactéries** : Elles représentent les agents responsables des infections nosocomiales les plus fréquents. Elles seraient responsables dans 90% à 95% des cas. Ce sont surtout les bactéries aérobies ou aéro-anaérobies facultatives qui représentent la quasi-totalité des espèces bactériennes responsables de ces infections. Elles peuvent être des bactéries pathogènes comme *Staphylococcus aureus*, ou des bactéries opportunistes comme les Entérobactéries, les *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, et les entérocoques (**BOUAZIZ, 2005**).

✚ **Les virus** : Il existe une possibilité de transmission nosocomiale pour de nombreux virus, notamment ceux des hépatites B et C lors des transfusions, de dialyse, ou des injections ; le virus respiratoire syncytial, les rotavirus et les entérovirus transmis par contact main-bouche et par voie féco-orale (**OMS, 2008**).

✚ **Les parasites et les champignons** : Certains parasites se transmettent facilement, c'est le cas du *Giardia lamblia*. De nombreux champignons, tels que *Candida albicans*, *Aspergillus* sp, et *Cryptosporidium* sont des agents opportunistes et provoquent des infections en cas de traitement antibiotique prolongé et d'immunodépression sévère. L'*Aspergillus* est en effet très répandu dans les circuits d'aération et transmissible par l'air et dont la diffusion est favorisée par les travaux de bâtiments (**BOYE et al, 2010**).

I.5. Origines des germes

Les réservoirs des micro-organismes à l'origine des infections sont multiples. Ils peuvent être classés en deux catégories : environnementaux et humains.

C'est l'hôpital qui constitue le réservoir environnemental : l'eau utilisée, le matériel, l'alimentation, le linge, l'air, les bâtiments, etc.

Le réservoir humain, qui est la source la plus importante, a des origines variées : d'une part, la flore commensale propre aux patients hospitalisés, et d'autre part, les infections des autres patients. Dans cette catégorie peuvent être ajoutés les micro-organismes transmis par les produits sanguins (**BOYE et al, 2010**).



I.6.Principales infections nosocomiales

L'étiologie des IN est très variable, selon la région étudiée, le type de service hospitalier et les patients concernés. Quelques catégories d'infections se distinguent néanmoins des autres (ZEROUAL, 2010). On note :

- + **Les infections nosocomiales urinaires** : Etant souvent asymptomatique, leur principal facteur de risque est l'existence d'une sonde urétrale (CHAMOUNE, 2009 ; BECHIN *et al*, 2014),
- + **La pneumonie nosocomiale** : La pneumonie est une inflammation du parenchyme pulmonaire produite par une bactérie (Pneumocoque) ou par un virus (BECHIN *et al*, 2014).
- + **Les infections sur cathéter** : L'infection sur cathéter est l'une des causes essentielles des bactériémies et des septicémies en milieu hospitalier (CHAMOUNE, 2009).
- + **Les infections du site opératoire** : Elles sont caractérisées par la présence de pus ou de nombreux polynucléaires altérés, avec ou sans isolement d'un germe, au niveau de l'incision chirurgicale ou entre l'aponévrose et la peau. Les infections profondes sont caractérisées par la présence des mêmes signes dans la région sous-aponévrotique ou au site même de l'intervention (BRUNBUISSON, 2015).

I.7.Facteurs favorisant les infections nosocomiales

Tous les patients ne sont pas égaux devant les infections nosocomiales. La colonisation de certains individus est favorisée par les mécanismes facilitant et garantissant l'accès des agents pathogènes jusqu'au patient voire jusqu'à un organe ou milieu habituellement stérile (BAUDIN, 2012).

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

- + **Les facteurs intrinsèques** : Ils ne sont pas tous maîtrisables et dépendent de :
 - L'âge : Les âges extrêmes sont des facteurs de risque ;
 - Le sexe : l'infection urinaire est plus fréquente chez les femmes ;
 - Le poids de naissance chez les prématurés : un poids inférieur à 1kg double l'incidence des infections sur les cathéters des nouveaux nés ventilés. Les sujets obèses semblent plus exposés aux infections nosocomiales ;
 - La présence d'un déficit immunitaire ;
 - La profession : Le risque d'infection nosocomiale est plus grand au laboratoire et dans les services où sont traités les malades contagieux (BECHIN *et al*, 2014).
- + **Les facteurs extrinsèques**: tels que les prothèses, les sondes urinaires, les cathéters vasculaires, les drains, les sondes digestives. En effet, l'infection est favorisée par :
 - La durée de maintien en place des prothèses et leurs manipulations ;
 - L'utilisation mal maîtrisée des prothèses ;
 - Les actes invasifs autres que la chirurgie, comme l'endoscopie (REMEDE, 2003).



I.8.Épidémiologie des infections nosocomiales

Les infections nosocomiales sont connues dans le monde entier et touchent aussi bien les pays développés que les pays pauvres en ressources. Une enquête de prévalence réalisée pour l'OMS dans 55 hôpitaux de 14 pays et représentant quatre régions : L'Europe, La méditerranée orientale, L'Asie du Sud-Est et le Pacifique occidental, a montré qu'à tout moment, plus de 1,4 million de personnes dans le monde souffrent de complications infectieuses acquises à l'hôpital. Les fréquences maximales ont été rapportées dans les hôpitaux des régions de la Méditerranée orientale et de l'Asie du Sud-Est à 11,8 % et 10,0 % respectivement. La prévalence atteignait 7,7 % en Europe et 9,0 % dans le Pacifique occidental (OMS, 2008).

Au Maroc, des recherches ont été menées sur la prévalence des IN. Ainsi, l'enquête nationale menée en 1994, avait révélé un taux de prévalence de 14 % (AMRANI, 1994). En 2007, une nouvelle étude initiée par le CHU Hassan II de Fès a montré un taux de prévalence de 6,7 %. Par ailleurs, une étude de prévalence menée en 2010 dans les hôpitaux relevant du CHU de Rabat, indique un taux de 10% (OMS, 2014).

I.9.Conséquences des infections nosocomiales

Les infections nosocomiales constituent un important problème s'exprimant en termes de morbidité, qui peut être apprécié par l'allongement de la durée d'hospitalisation, de mortalité. (MCHICH, 2002). Il est aussi mesuré par leur coût socioéconomique, représentant une charge considérable pour les patients et pour le système de santé. Le surcoût estimé varie d'un pays à l'autre. A titre d'exemple, aux Etats Unis, les dépenses supplémentaires sont estimées de 4,5 à 5,7 milliards de dollars USD par an (ZERROUK, 2013). Dans un hôpital de Manchester, le surcoût est de 75 000 livres en plus des frais additionnels liés aux traitements, aux complications et prolongations de durée de séjour des patients atteints lors d'une épidémie importante de diarrhées dues à *Clostridium difficile* (BAUDIN, 2012) .

I.10.Prévention des infections nosocomiales

La prévention des infections nosocomiales passe par l'ensemble des personnes et des services impliqués dans les soins de santé. La prévention nécessite un programme intégré, contrôlé, dont les éléments clés sont les suivants :

- Limiter la transmission d'agents microbiens de patient à patient pendant les activités de soins directs ;
- Maîtriser les risques infectieux liés à l'environnement ;
- Limiter le risque d'infection ;



- Surveiller les infections, identifier et maîtriser les flambées
- Renforcer les pratiques de soins et assurer la formation continue du personnel (OMS, 2008).

A cet effet, il est nécessaire d'agir sur tous les niveaux de la chaîne de transmission des infections nosocomiales à savoir :

I.10.1.L'Hygiène

D'après **LEON BERNARD**, l'hygiène hospitalière n'est pas une science contemplative mais une science active (cité par **BEN AMAR *et al*, 1998**). La principale prévention comprend l'ensemble des moyens à mettre en œuvre pour prévenir et combattre les risques et les nuisances auxquels sont soumis les malades, le personnel et les visiteurs. Elle constitue un indicateur de qualité des soins et de sécurité, et vise :

- ❖ **Le lavage des mains** qui est considéré comme la première mesure de prévention des IN. Il peut s'agir du :
 - **Lavage simple des mains** dont l'objectif est de prévenir la transmission manu portée et éliminer la flore transitoire ;
 - **Lavage antiseptique des mains** dont les objectifs consistent à éliminer la flore transitoire et à diminuer la flore commensale. Geste invasif et mise en œuvre de techniques d'isolement septique ou aseptique, soin au technique aseptique (exemple : sondage urinaire, cathétérisme périphérique).
- ❖ **Port de gants** : Il est nécessaire lors de tout contact avec un liquide biologique tel que le sang et l'urine, sans exclure le lavage des mains avant et après leur utilisation.
- ❖ **Désinfection et stérilisation** : Il est préférable d'utiliser au maximum du matériel à usage unique (**MIS J. ,2003**).

I.10.2.Isolement

Les mesures d'isolement ont pour objectif d'établir des barrières à la transmission des micro-organismes d'un patient à un autre patient, d'un personnel soignant ou de l'environnement à un patient. On distingue :

- **Les mesures d'isolement protecteur** : Elles sont mises en place pour protéger les patients fragiles.
- **Les mesures d'isolement septique** : Elles sont indiquées pour un patient atteint d'une maladie contagieuse ou porteur d'un agent infectieux susceptible de disséminer lors de gestes de soins (**MIS, 2003**).



I.10.3. Mesures spécifiques

Elles visent à dépister et si possible éliminer les réservoirs. Ainsi, elles comportent :

- Le traitement des patients infectés ;
- Le dépistage systématique des malades colonisés. La colonisation digestive est dépistée par écouvillonnage rectal. Ce dépistage est indiqué chez les malades hospitalisés dans les services de réanimation ;
- La décontamination : Elle vise à prévenir la diffusion des germes, c'est l'exemple de la décontamination nasale dans le cas des Staphylocoques, ou digestive dans le cas des entérobactéries.
- L'utilisation de matériaux aux propriétés antibactérienne intrinsèque qui concernent essentiellement des revêtements de murs (vinylique ou peintures) (**BECHINA *et al*, 2014**).

II. Nettoyage et désinfection

La désinfection constitue l'un des moyens permettant de limiter la transmission des maladies infectieuses. En outre, il est important de choisir les bonnes méthodes de nettoyage et de désinfection. Dans plusieurs cas, il est préférable d'utiliser deux méthodes ou plus pour le nettoyage des surfaces parce que les micro-organismes peuvent s'adapter à toutes les techniques pour survivre. Si le nettoyage et la désinfection sont insuffisants, les cellules microbiennes pourraient survivre sur la surface des équipements, développer une résistance et pourraient ainsi causer la contamination de l'environnement (**DIDOUH, 2015**).

II.1. Nettoyage

C'est une opération qui a pour but de rendre physiquement propres les surfaces, en les débarrassant de leurs souillures physiques ou chimiques. Une surface ainsi nettoyée est alors qualifiée de physiquement propre (**MANGO, 2005**).

II.1.1. Produits de nettoyage

Ce sont des produits dont la composition est spécialement étudiée pour le nettoyage selon un processus mettant en œuvre les phénomènes de détergence (**MENARD, 1998**). La détergence est un processus selon lequel les salissures ou souillures sont détachées de leur substrat et mises en solution ou en dispersion. Au sens ordinaire, la détergence a pour effet le nettoyage des surfaces. Elle est la résultante de la mise en œuvre de plusieurs phénomènes physicochimiques (**BARICAULT, 2015**).



II.1.2. Composition des détergents

Les détergents se composent d'agents tensio-actifs, d'agents de renforcement de solvants et d'additifs spécialisés (PARENTEA, 1997).

Agents Tensioactifs : une molécule tensioactive se définit par la présence conjointe d'une partie hydrophile et d'une partie hydrophobe, qui lui donne son caractère amphiphile (Figure 1). C'est l'antagonisme de cette structure qui lui confère ses propriétés particulières. (NETO, 2007).

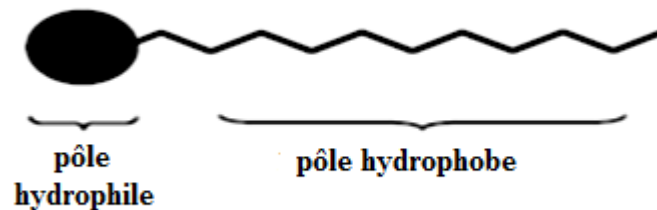


Figure 1: Représentation schématique d'un agent tensioactif

II.1.3. Types de détergents

Il existe 4 grandes catégories de détergents : les détergents anioniques, non ioniques, cationiques et zwitterioniques selon la partie de la molécule douée de propriétés détergentes (POROT, 1987).

a- Les détergents anioniques

C'est en raison de leur biodégradabilité que ces agents tensio-actifs sont les plus répandus. Ils représentent près de 80 % des agents tensio-actifs utilisés. Leur groupement hydrophile propre est : H_2SO_4 , H_2SO_3 , H_2CO_3 , H_2PO_4 ou H_3PO_3 . Leur neutralisation se fait par un sel de sodium, de magnésium ou bien de potassium. Nous retrouvons donc dans cette classe des agents tensio-actifs comme : l'alkylsulfate, l'alkylbenzène sulfonate (celui du standard utilisé, dodécylbenzène sulfonate) et l'alcane phosphate (PARENTEA, 1997).



Figure 2: Exemple de tensioactif anionique : le dodécylsulfate de sodium (SDS)



b- Les tensioactifs cationiques

Ces tensioactifs cationiques sont caractérisés par une partie hydrophile chargée positivement. Le plus souvent ce sont des sels d'ammonium quaternaires triméthylés ou des sels de pyridinium (Figure 3) (NETO, 2007).

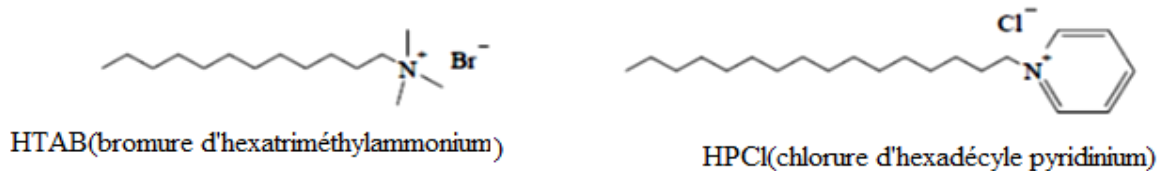


Figure 3:Exemple de tensioactif cationique : le HTAB et le HPCL

c- Les tensioactifs Zwitterioniques

Les tensioactifs zwitterioniques, ou amphotères, possèdent sur la partie hydrophile à la fois une charge positive et une charge négative (Figure 4). Ce type de tensioactifs peut alors aisément devenir cationique ou anionique selon le pH de la solution dans laquelle ils sont solubilisés. Cette structure dipolaire s'apparente à celle des phospholipides naturels et conduit à une famille de produits généralement non irritants et peu agressifs sur le plan biologique (NETO, 2007).

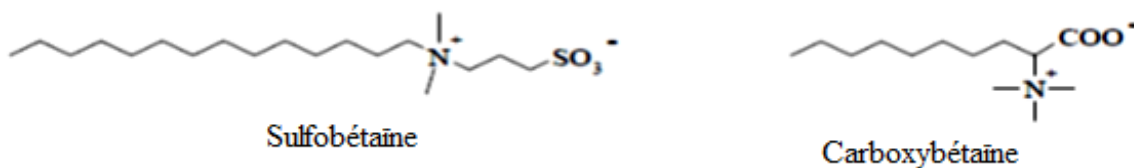


Figure 4:Exemples de tensioactifs zwitterionique : la sulfobétaïne et la carboxybétaïne

d- Les détergents non-ioniques

Les agents tensio-actifs non-ioniques sont des acides gras éthoxylés. Leur groupement hydrophile est un oxyde d'éthylène. Ces agents tensio-actifs, comme les alkylsulfonates ramifiés et les alkylphénols éthoxylés, sont peu à peu remplacés par des agents tensio-actifs plus facilement biodégradables. Les dernières tendances sont aux agents tensio-actifs biodégradables d'origine végétale, comme les polyglucosides (PARENTEA, 1997).

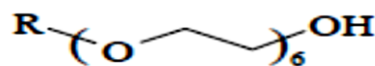


Figure 5:Exemple de polyoxyéthylène POE



II.1.4. Facteurs influençant le nettoyage

L'efficacité d'un nettoyage dépend de différents paramètres :

a- La concentration

La concentration finale d'utilisation du produit est très importante car une dilution trop élevée se traduit par une inefficacité totale. Une concentration légèrement supérieure permet d'atteindre un seuil déterminé pour lequel le produit désinfectant favorise la croissance des micro-organismes. A des concentrations supérieures à ce seuil, mais inférieures à celui optimal, préconisé par le fabricant, se situe la zone dans laquelle la croissance et la multiplication des micro-organismes sont freinées. A ce niveau correspond le phénomène d'accoutumance ou d'adaptation des bactéries à des doses sub-létales de produit. Une souche bactérienne plus résistante peut, dans ces conditions, continuer son développement et envahir le substrat (SALVAT *et al*, 1995).

b- La température

L'action thermique influence sur le résultat qualitatif de l'activité de nettoyage et de désinfection. Cette propriété est recherchée en thermo désinfection (lave bassins par exemple), mais une température trop élevée peut augmenter la toxicité des produits par émanation de vapeurs toxiques.

En règle générale, une augmentation de la température augmente l'activité du produit désinfectant (DUCRUET, 2010).

c- Temps de contact

Le temps de contact entre le produit et la surface peut être modifié. En effet, si une durée insuffisante diminue l'action bactéricide du produit, celle-ci augmente en fonction du temps de contact. Il pourrait par conséquent être intéressant de prolonger ce laps de temps pendant une heure, deux heures ou plus, en évitant toutefois l'apparition de problèmes de dessèchement de la solution sur les supports (traces) (SALVAT *et al*, 1995).

d- L'action mécanique

L'action mécanique permet de décoller les salissures et les micro-organismes de leur support et de les évacuer soit par rinçage, cas par exemple du traitement des endoscopes, soit par captation sur un support (ex : lingette).

L'action mécanique est obtenue par frottement d'un linge sur une surface, par écouvillonnage ou par circulation d'eau sous pression (DUCRUET, 2010).



e- L'action chimique

La méthode et le produit à employer dépendent de la nature de la souillure et de la fragilité de la surface à traiter. À titre d'exemple, une souillure grasseuse nécessitera l'utilisation d'un savon dégraisseur. Il est important de se souvenir que pour optimiser l'action chimique d'un désinfectant, il faut une surface propre (MASSICOTTE, 2009).

f- Qualité de l'eau

En effet, les concentrations en agent de nettoyage doivent être adaptées selon la dureté de l'eau. De même la qualité de l'eau influence le degré de propreté obtenu suite au nettoyage. C'est pour cela que les phases de rinçage utilisent le plus souvent de l'eau purifiée (CHLOE, 2014).

II.1.5.Mécanisme de nettoyage

Le nettoyage se définit par le phénomène physique de l'élimination à un milieu solide des souillures qui adhèrent, on parle alors plus spécifiquement de détergence. Celle-ci va représenter tous les phénomènes physiques qui visent à éliminer les souillures pour leur mise en suspension ou en dispersion dans la solution de lavage. Les trois phénomènes essentiels de la détergence sont le mouillage, le déplacement de la souillure et son anti-redéposition (BARICAULT, 2014).



Figure 6: Schématisation de l'action du détergent sur une souillure (BARICAULT, 2014).

a- Mouillage

La composition détergente va entrer en contact avec la souillure de la surface, puis va établir une force d'adhésion détergent-souillure plus grande que celle existant entre la surface et la souillure.

Dans ces conditions, l'étalement puis la pénétration de la solution de nettoyage deviennent possible, il en résulte la séparation de la souillure de la surface (MOURNA, 2010).



b- Déplacement de la souillure

La composition détergente mouille le support, s'adsorbe sur celui-ci, diminue son attraction pour la souillure et la détache jusqu'à ce qu'elle n'adhère plus au support.

Sa force intervient pour modifier les interfaces selon le schéma suivant :

Surface-Souillure + détergent \longrightarrow Surface-détergent + Souillure-détergent
(MOURNA, 2010).

c- Mécanisme d'anti-redéposition

Une fois la souillure écartée du substrat, le rôle du produit détergent est d'éviter que cette salissure ne se redépose sur le support, c'est le mécanisme d'anti-redéposition.

La surface et les micelles « Souillure-détergent » portent des charges de même signe. Ceci a pour conséquence une répulsion entre la surface et les micelles, et entre les micelles elles-mêmes. Ainsi, les souillures décrochées des surfaces restent en suspension dans l'eau de lavage (BARICAULT, 2014).

II.2. Désinfection

Opération aux résultats momentanés, la désinfection permet d'éliminer ou de tuer les microorganismes et/ou d'inactiver les virus indésirables sur les milieux inertes contaminés en fonction des objectifs fixés (MANGO, 2005).

Cette destruction des germes indésirables portés par des matériaux inertes peut se faire soit par des procédés physiques (chaleur, ultra-sons, irradiation) ou chimiques (désinfectants) soit par une combinaison des deux (ALLION, 2004).

II.2.1. Désinfectants

Ce sont des produits qui luttent contre la prolifération des micro-organismes en diminuant leur nombre et en inactivant les virus présents au moment de l'opération sur des surfaces inertes (résultat momentané). Les désinfectants peuvent être **bactéricides** et donc détruisent les bactéries, ou **bactériostatiques**, et donc empêche la croissance et le développement des bactéries (MICHEL et al, 2007).

En outre, les utilisateurs de désinfectants et les agents responsables de l'utilisation de désinfectants doivent avoir des objectifs clairs et un programme d'action bien établi. Ils doivent nettoyer et préparer convenablement le site et prendre les mesures nécessaires pour garantir la sécurité des personnes, des équipements et de l'environnement. En effet, les désinfectants sont conçus pour être utilisés sur les objets inanimés et les surfaces afin de détruire les microorganismes. Ils peuvent avoir des effets indésirables sur les tissus vivants qui y sont exposés (KAHRS, 1995 ; FONG et al, 2012).



II.2.2. Distinction entre détergents et désinfectants

Souvent, les termes détergents et désinfectants sont confondus alors que tous les deux font appel à des réalités physicochimiques différentes. Par conséquent, ces produits ont un rôle différent qui peut cependant être complémentaire, selon la nature de l'intervention désirée. Il y a donc lieu de faire la distinction entre un détergent et un désinfectant.

Un détergent cherche à déloger les organismes ou les salissures qui adhèrent à une surface. Le fait qu'un organisme soit détaché de son support augmente la surface de contact avec un désinfectant, ce qui se traduit par une augmentation de l'efficacité de ce dernier.

Un désinfectant a pour objectif de s'attaquer aux constituants d'un organisme. Selon Santé Canada, un désinfectant est comme un agent antimicrobien pouvant détruire des micro-organismes pathogènes et susceptibles d'être pathogènes sur les surfaces inanimées (**MASSICOTTE, 2009**).

Dans les établissements de santé, plusieurs types de désinfectants sont utilisés. De nombreux sont des oxydants, ils réagissent spontanément avec d'autres composés et forment des sous-produits toxiques pouvant causer des effets indésirables sur la santé. L'eau de Javel, désinfectant à base de chlore, est un désinfectant facile à obtenir qui, une fois mélangé avec d'autres désinfectants ou produits de nettoyage, peut être dangereux. Les inspecteurs en santé publique peuvent examiner les procédures sanitaires avec les exploitants pour éviter le mélange des produits incompatibles (**FONG et al, 2012**).

II.2.3. Classes de désinfectants

Les désinfectants peuvent être groupés en différentes classifications. Ce classement est essentiellement basé sur le principe actif dominant. En outre, des combinaisons des atomes actifs peuvent avoir lieu. Ainsi, plusieurs substances peuvent contenir à la fois du chlore et de l'oxygène, alors que dans certains cas, on assiste à la dominance d'un principe actif comme le chlore (**MASSICOTTE, 2009**).

a- Halogénés : Produits chlorés

Le chlore peut être utilisé sous trois formes différentes :

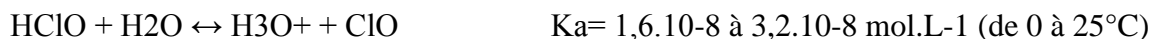
- le chlore gazeux Cl_2 , stocké sous pression en phase liquide (bouteilles, tanks) ;
- l'hypochlorite de sodium, ou eau de javel NaOCl (liquide) ;
- l'hypochlorite de calcium $\text{Ca}(\text{ClO})_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (solide).

Dans les trois cas, la mise en contact du désinfectant avec l'eau à traiter donne le véritable agent de désinfection : l'acide hypochloreux HClO (**DEVILLIERS, 2011**).



✚ Propriétés physico-chimiques

L'acide hypochloreux HClO étant un acide faible, il se dissocie partiellement en anions hypochlorites (ClO⁻) selon l'équilibre suivant :



A 25°C et à un pH voisin de celui des eaux naturelles à potabiliser (environ pH = 7), l'acide hypochloreux et l'ion hypochlorite sont en concentration équimolaire. Les concentrations relatives de ces composés varient de manière significative en fonction de la température, mais aussi du pH (DEVILLIERS, 2011).

✚ Facteurs influençant l'activité et la stabilité

- La concentration en chlore actif :
 - Plus le titre en chlore est élevé, plus l'activité est importante en règle générale ;
 - Plus le produit est concentré, moins le produit est stable : l'extrait de Javel à 48° chlorométrique se conserve seulement trois mois, l'eau de Javel à 12° chlorométrique peut se conserver jusqu'à 6 mois.
- Les matières organiques, les savons, l'ammoniaque et les dérivés azotés réduisent le pouvoir antimicrobien (CCLIN, 2000).

b- Ammoniums quaternaires

Les ammoniums quaternaires sont des tensio-actifs cationiques à pouvoir détergeant et antimicrobien. On les retrouve dans la composition de plusieurs préparations commerciales à cause de leurs propriétés (LAWIN, 2016).

✚ Structure

La structure chimique générale des sels d'ammonium quaternaire est présentée sur la figure 7. Les hydrogènes sont substitués par des groupements alkyls (R), l'anion (X⁻) est généralement un atome de chlore ou de brome (ALLION, 2004).

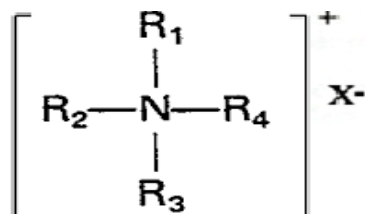


Figure 7: Structure des ammoniums quaternaires



✚ Propriétés physico-chimiques

Grâce à leurs propriétés tensioactives, les ammoniums quaternaires sont des agents mouillants, émulsionnants et solubilisants. Les solutions sont légèrement moussantes avec formation de micelles. Ils forment des complexes avec les protéines et les graisses, d'où leur pouvoir détersif sur les plaies. Les solutions aqueuses sont légèrement alcalines.

Les ammoniums quaternaires sont incompatibles avec les détergents anioniques, avec lesquels ils forment des précipités insolubles dans l'eau, et avec de nombreux agents comme les dérivés halogénés ou encore certains phénoliques. Par ailleurs, ils sont compatibles avec l'alcool (GELLER, 2010).

✚ Facteurs influençant l'activité

- L'activité des ammoniums quaternaires est diminuée par les matières organiques et par l'eau dure ;
- Ils sont plus actifs à pH neutre ou légèrement alcalin (entre 7 et 11) et aucune activité à pH <3,5).
- Leur activité augmente avec la température (CCLIN, 2000).

c- Dérivés phénoliques

Le phénol est constitué d'un noyau aromatique sur lequel est greffée une fonction hydroxyle.

✚ Structure

La formule générale des dérivés phénoliques se présente comme suit :

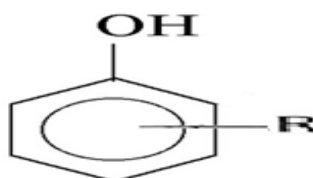


Figure 8: Structure des Dérivés phénoliques

✚ Propriétés physico-chimiques

Du fait de leur nature lipophile, les composés phénoliques sont peu solubles dans l'eau et de ce fait, souvent associés à des savons anioniques et alcalins qui en facilitent la solubilisation. La structure et la substitution de ces phénols influencent largement leurs propriétés antibactériennes. Quatre facteurs principaux influencent cette activité : la longueur de la chaîne de ramification, la position de cette chaîne, la nature de l'halogène dans le cas des halogénophénols et l'encombrement du noyau.



Les molécules présentant le plus d'intérêt sont les halogénophénols comme le chlorophénol, les acides-phénols et les polyphénols (**GELLER, 2010**).

✚ Facteurs influençant l'activité

L'activité des dérivés phénoliques est diminuée par les matières organiques et par l'eau dure.

- les dérivés phénoliques sont faiblement solubles dans l'eau. En augmentant le pH des solutions, on augmente la solubilité, mais les propriétés antibactériennes sont diminuées.
- les substances interférentes en quantité importante, telles que les matières organiques, les protéines ou l'eau dure, peuvent diminuer l'activité des dérivés phénoliques.
- l'addition de surfactifs anioniques et alcalins augmente la stabilité des solutions.
- l'activité augmente avec la température (**CCLIN, 2000**).

d- Alcools

Parmi les différents types d'alcools les plus utilisés, on trouve les molécules d'éthanol (alcool éthylique) et d'isopropanol (alcool isopropylique appelé alcool à friction).

La formule de l'éthanol est la suivante : $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$.

La formule brute de l'alcool isopropylique est la suivante : $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ (**MASSICOTTE, 2009**).

✚ Facteurs influençant l'activité

Son hydratation facilite la pénétration dans les cellules bactériennes.

Son efficacité est réduite en présence de matières organiques. Il coagule les protéines.

Délai d'action : 2 minutes à condition que la peau soit maintenue humide.

Durée d'action : activité antimicrobienne brève car l'alcool est très volatil (**C.CLIN 2000**).

e- Oxydants

Les oxydants sont des composés qui agissent sur les micro-organismes par libération d'oxygène qui entraîne la production d'hypochlorite ou de radicaux hydroxyles. On retrouve, entre autres, le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) et l'acide peracétique (**GELLER, 2010**).

➤ Acide peracétique

L'acide peracétique, ayant un large spectre microbicide, trouve quant à lui un usage élargi puisqu'il est recommandé dans la désinfection des endoscopes, en remplacement du glutaraldéhyde. On l'obtient par l'action de l'eau oxygénée sur l'anhydride acétique selon l'équation suivante :



Il n'existe pratiquement pas à l'état pur et se présente sous forme de solution aqueuse en mélange avec l'acide acétique et le peroxyde d'hydrogène (LAWIN, 2016).

Structure : C₂H₄O₃

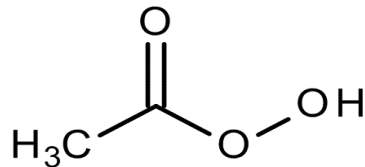


Figure 9: Structure d'acide peracétique.

✚ Facteurs influençant l'activité

L'activité est meilleure à pH acide et fortement réduite en présence de matières organiques. (C.CLIN 2000).

f- Biguanides

Les biguanides sont utilisés généralement sous forme de digluconate ou de diacétate de Chlorhexidine (LAWIN, 2016).

✚ Structure

Cette famille est composée entre autres de la chlorhexidine et des polyhexaméthylènes biguanides (PHMB), polymères formés de groupes biguanides liés par des chaînes hexaméthylène. Ce sont des substances cationiques. La chlorhexidine (ou 1,6 dichlorophényl diguanohexane) (Figure 10) est probablement l'un des biocides les plus utilisés (ALLION, 2004).

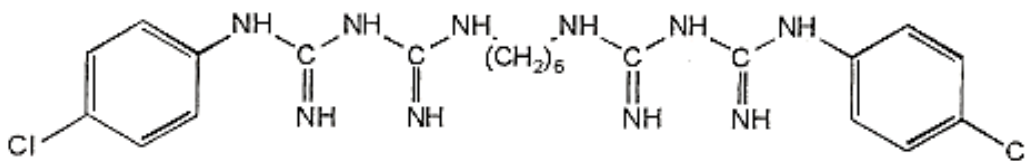


Figure 10: Structure chimique de la chlorhexidine.

✚ Facteurs influençant l'activité

- Les protéines et les matières organiques diminuent l'activité ;
- Les minéraux, l'eau dure et un pH > 8 provoquent une précipitation de la chlorhexidine.
- L'association avec les ammoniums quaternaires et l'alcool potentialise l'activité (CCLIN 2000).



g- Aldéhydes

Les principaux produits désinfectants qui font partie de cette catégorie sont : le Formaldéhyde et le glutaraldéhyde (Massicotte, 2009).

➤ Formaldéhyde

Le formaldéhyde est un gaz très volatil (pression de vapeur élevée), très soluble dans l'eau mais instable. Le formaldéhyde n'est pas commercialisé sous forme gazeuse, et se présente principalement sous forme liquide, le formol (ALFORT, 2009).

La forme liquide (formaline) est une solution aqueuse, qui contient approximativement 34-38% de formaldéhyde ainsi que du méthanol pour ralentir la polymérisation (BERGHMANS, 2006).

➤ Glutaraldéhyde

✚ Propriétés

Les propriétés du glutaraldéhyde sont comparables à celles du formaldéhyde, mais il est moins volatil. Il peut également être utilisé comme stérilisant et comme désinfectant de « haut niveau ». La solution aqueuse de glutaraldéhyde est un acide. Les propriétés sporicides du glutaraldéhyde sont activées à pH légèrement alcalin (7.5 – 8.5) (BERGHMANS, 2006).

✚ Formule chimique: CHO-CH₂-CH₂-CH₂-CHO]

II.2.4.Mécanisme d'action générale

Quelle que soit l'entité microbienne considérée et la molécule désinfectante utilisée, on sait aujourd'hui que l'action des biocides peut se caractériser par les trois phases suivantes :

- **Adsorption du désinfectant à la surface de l'enveloppe microbienne :** Phénomène de nature physico-chimique dépendant notamment de la concentration et du mouvement brownien des bactéries.
- **Pénétration de l'agent antimicrobien dans la cellule :** La solubilité, l'ionisation et l'encombrement stérique des molécules antibactériennes sont des facteurs clés de cette phase.
- **Action proprement dite du principe actif :** Elle peut avoir lieu au niveau de différentes cibles cellulaires possibles telles que la membrane cytoplasmique dont l'altération de la structure provoque une désorganisation du métabolisme, une fuite de substances, et la dégénérescence de la cellule et finalement sa mort ; ou encore le cytoplasme et plus précisément les protéines cytoplasmiques, les acides nucléiques ou les ribosomes (ALLION, 2004).

II.2.5. Spectre d'activité des désinfectants

La plupart des désinfectants modernes sont des mélanges complexes de substances chimiques. Ils ont une activité satisfaisante sur les bactéries et les virus. Par contre, l'activité



sur les virus nus, les mycobactéries, les moisissures ou les spores varie d'un produit à l'autre. (CAPP-INFO, 2007).

Le tableau suivant présente les différents spectres d'activités des principaux désinfectants (CCLIN, 2000).

Tableau 1: Spectres d'activités des principaux désinfectants (CAPP-INFO, 2007 ; RUSSEL *et al*, 2013).

familles	Spectre d'activité							
	Gram ⁺	Gram ⁻	Mycobactéries	Levures	Moisissures	Virus nus	Virus enveloppés	Spores
Alcools	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+	-
Aldéhydes	+	+	+	+	+	+	+	+
Ammoniums Quaternaires	+	+/-	-	+	+	+/-	+	-
Halogénés chlorés et iodés	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydants	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) : Produits actifs (+/-) : Produits inconstamment actifs (-) : Produits inactifs

II.2.6. Caractéristiques recherchées des désinfectants

Un désinfectant « idéal » doit répondre aux critères suivants :

- Avoir un spectre d'activité conforme aux objectifs fixés ;
- Avoir une action rapide ;
- Etre compatible et sans danger pour le matériel ;
- Etre actif même en présence de salissures (sang, pus, eau dure...) ;
- Avoir un effet rémanent (effet prolongé dans le temps) ;
- Etre peu ou pas toxique pour le personnel ;
- Etre hypoallergénique ;
- Etre adapté à l'usage prévu sans risque pour le personnel soignant ni pour l'environnement ;
- Etre facile à doser ;
- Ne pas avoir d'odeur désagréable ;
- Avoir un coût abordable (LAWIN, 2016).



II.2.7. Conservation

La durée et le mode de conservation des désinfectants est un point très important. Elle a pour but d'éviter deux risques majeurs : l'inactivation du produit et la contamination microbienne.

L'inactivation du produit est due surtout à l'exposition à la lumière et/ou à une température trop élevée, et à la conservation du produit dans des récipients inadaptés.

La contamination microbienne n'est pas rare. Les désinfectants font l'objet de contrôles de fabrication garantissant l'absence de contamination du produit dans son conditionnement d'origine (VENANT, 2008).

II.2.8. Evaluation de l'action antimicrobienne des désinfectants

Plusieurs méthodes ont été mises en œuvre pour vérifier l'efficacité antibactérienne des désinfectants.

a. Techniques en milieu solide.

Deux méthodes peuvent être utilisées en milieu solide :

- **Méthode des puits** : Elle correspond à la technique des disques stériles mais légèrement modifiée. Elle consiste à faire des trous dans la gélose coulée et solidifiéeensemencé par inondation avec une souche bactérienne dans les boîte de pétrie et à les remplir d'un volume donnée de détergent qui va diffuser dans la gélose. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les zones d'inhibition apparaissent autour des disques stériles sont évaluées (BURNICHONN, 2003).
- **Méthode de diffusion par utilisation des disques stériles** : Elle consiste à utiliser des disques formés par des papiers filtre stérilisés de 6 mm de diamètres, imbibés de désinfectant et déposés à la surface d'un milieu gélosé,ensemencé par inondation avec une souche bactérienne en bouillon nutritif de titre connu. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les zones d'inhibition apparaissent autour des disques stériles sont évaluées (BURNICHONN, 2003).

b. Technique en microméthode

La technique en microméthode repose sur l'utilisation de microplaques stériles de 96 puits à fond plat. La croissance bactérienne est détectée grâce à un lecteur de microplaque et un spectrophotomètre (MolecularDevices® Spectromax). Le logiciel (MolecularDevices® SoftMaxPro) permet l'exploitation des données.

Chaque puits de la microplaque stérile de 96 puits à fond plat (Costar®) est inoculé par une quantité déterminée (X) de la suspension bactérienne de travail et d'une même quantité (Y) d'une des dilutions du désinfectant à tester. Les puits témoins sont inoculés par la quantité X



de la suspension bactérienne de travail pour le test de fertilité ou de bouillon BHI stérile pour le test de stérilité, et de Y d'eau distillée stérile.

Pour chaque souche étudiée, trois puits tests et un puits témoin de fertilité sont utilisés. Une microplaque permet de tester 23 souches en une seule analyse.

La microplaque est recouverte d'un film étirable plastique puis disposée dans le lecteur programmé. Le schéma de plaque est établi et la lecture de l'absorbance à 490 nm est programmée pour chaque puits toutes les cinq minutes pendant 18 heures, après agitation de la plaque thermostatée à 37 °C. Le lecteur restitue une représentation graphique de l'absorbance en fonction du temps : toute augmentation progressive des valeurs au cours du temps et pour un même puits est interprété comme une croissance bactérienne. À l'inverse, une densité optique stable et nulle sera considérée comme une absence de croissance bactérienne due à l'effet au moins bactériostatique du détergent (**ROUILLON et al, 2006 ; SCHMITT et al, 2009**).

c. Technique en macrométhode : méthode de référence

Elle repose sur l'utilisation de tubes à hémolyses stériles dans lesquels est mise la suspension bactérienne (préalablement préparé par ensemencement d'un bouillon BHI et incubation à 37°C pendant 3h) à laquelle différentes concentrations de désinfectant sont rajoutées. Les tubes sont agités et incubés à 37 °C pendant 18 heures. L'absence de trouble du milieu de culture dans un des tubes permet de déterminer la dilution du désinfectant suffisante pour empêcher le développement de la souche étudiée (dilution cible) (**ROUILLON et al, 2006**).

II.2.9. Etapes de la procédure de désinfection

Le processus de la désinfection comporte plusieurs opérations distinctes mais totalement liées les unes aux autres. En ce sens que le résultat définitif ne sera acceptable que si toutes les étapes sont correctement exécutées (**MANGO, 2005**).

a- Pré-désinfection

C'est une opération qui consiste à immerger les instruments dans une solution détergente et désinfectante (bactéricide) aussitôt après leur utilisation. Elle permet d'éviter la fixation des matières organiques par la contamination du personnel et la contamination de l'environnement.

Pour certains objets, une pré-désinfection suivie du nettoyage avec un produit détergent-désinfectant peut s'avérer suffisante, cas par exemple du plateau, du garrot, des cuvettes, du thermomètre et du haricot. Pour d'autres objets, ce premier traitement sera complété par une stérilisation, cas des instruments, ou par une désinfection de haut niveau ou de niveau intermédiaire, cas des endoscopes par exemple (**GOULLET et al, 2004**).



b- Nettoyage

Un nettoyage efficace permet d'abaisser la charge microbienne initiale et d'éliminer les matières organiques. Par ailleurs, il peut inactiver le produit utilisé lors de l'étape de désinfection et de prévenir la formation de biofilm.

Le nettoyage conjugue l'action physico-chimique du produit et l'action mécanique du brossage (écouvillonnage) et du rinçage (MENARD,1998).

c- Rinçage intermédiaire

Le rinçage intermédiaire permet dans un premier temps de détacher les souillures les plus tenaces grâce à l'utilisation de la haute pression. Dans un deuxième temps, le complexe «détergent-support moussant-souillure », est éliminé des surfaces. A cet instant, une autre partie importante du nettoyage a été réalisée : le matériel présente un aspect de propreté, non seulement visuel, mais également au toucher. Cette phase doit d'une grande partie des micro-organismes piégés non seulement de par leur attachement aux particules organiques, mais également de par leur mise en suspension dans la solution détergente (SALVAT *et al*, 1995).

d- Désinfection

La désinfection a pour but d'éliminer les micro-organismes encore présents sur les surfaces, présence favorisée par l'émission de points d'ancrage. Certaines bactéries se stabilisent à quelques nanomètres de la surface, d'autres produisent des substances permettant une adhérence plus difficilement réversible (biofilm). Cette phase de désinfection consiste en l'application d'un produit autorisé, à action désinfectante. Ce produit, pour être actif, doit pouvoir atteindre les micro-organismes dans tous les endroits où ils peuvent encore se trouver (bon pouvoir mouillant) (SALVAT *et al*, 1995).

e- Rinçage final

Éliminer les traces de solution désinfectante, par utilisation d'eau l'eau potable, par un jet à basse pression, ou une aspersion ou une circulation d'eau, après avoir laissé agir le désinfectant (LE ROUX, 2013).

A l'issue de l'étape de désinfection, tout doit être mis en œuvre pour éviter la recontamination :

- Le rinçage final doit être abondant pour éliminer tout résidu de produit ;
- La qualité de l'eau doit être adaptée au niveau des exigences déterminées (MENARD, 1998).



II.3.Résistance bactérienne aux antimicrobiens

a- Définition

Un micro-organisme est considéré « résistant » à un produit lorsque sa concentration minimale inhibitrice (CMI) est plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce. En fait, une souche est dite « résistante » lorsque la concentration de désinfectant qu'elle est capable de supporter est plus élevée que la concentration que l'on peut atteindre in vivo à la suite d'un traitement (DALI, 2015).

b- Type de résistance

Deux types de résistance aux antimicrobiens peuvent alors être distingués : la résistance intrinsèque et la résistance acquise.

➤ Résistance naturelle ou intrinsèque

Les gènes de résistance font partie du patrimoine génétique de la bactérie. La résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce (DALI, 2015).

La résistance naturelle est un caractère d'espèce qui touche toutes les bactéries de l'espèce considérée. Elle est stable, transmise à la descendance (elle a pour support génétique le chromosome bactérien), mais elle n'est pas transmissible sur un mode horizontal, autrement dit d'une bactérie à l'autre au sein d'une même espèce ou entre espèces différentes (CCLIN, 2010).

➤ Résistance acquise

La résistance acquise est due à un événement imprévisible qui, au sein d'une espèce, a pour conséquence l'apparition d'une ou plusieurs souches ayant une résistance plus élevée à un antimicrobien. Une sélection de cette souche est ainsi possible quand les concentrations d'utilisation habituelles du produit sont inférieures à la concentration active. Ce phénomène étant connu et doit donc être surveillé (ALLION, 2004).

c- Mécanismes génétiques de la résistance acquise :

Le potentiel génétique d'une bactérie est constitué du chromosome et d'un ou de plusieurs génophores facultatifs et extra-chromosomiques, les plasmides. Des gènes sont également portés par des éléments génétiques transposables et par des intégrons. Une bactérie peut ainsi acquérir une résistance aux biocides par deux grands mécanismes génétiques. L'un a pour support le chromosome et définit une résistance chromosomique, l'autre a pour



support les plasmides ou les éléments transposables ou les intégrons et ils définissent une résistance extra-chromosomique (**CCLIN, 2010**).

- **La résistance chromosomique** : Il s'agit d'une mutation stable et héréditaire d'un gène du chromosome et le produit du gène muté est ainsi lui-même modifié. Généralement, la résistance est acquise lorsque la mutation concerne un ou plusieurs gènes structuraux de la cellule, codant soit pour un élément cible de l'antimicrobien, soit pour un élément de fixation ou de pénétration du désinfectant. Ainsi, le mécanisme biochimique de base de la résistance chromosomique bactérienne peut être lié à une modification de la membrane cellulaire empêchant ainsi la fixation et la pénétration du produit (**ALLION, 2004**).
- **La résistance extra-chromosomique ou résistance plasmidique** : Elle est liée à la synthèse de protéines additionnelles et non à une modification des constituants normaux de la bactérie. Les bactéries porteuses de plasmides sont normales alors que les bactéries résistantes par mutation sont souvent fragilisées. Aussi, les bactéries porteuses de plasmides ne sont pas ou peu contre-sélectionnées en l'absence d'antimicrobien (**CCLIN, 2010**).

III. Validation d'un protocole de désinfection et nettoyage

III.1.Généralités

La validation se définit comme la confirmation par examen et l'apport de preuves objectifs du fait que les prescriptions particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies (**DESENFANT, 2000**). Elle s'appuie sur la collecte et l'évaluation de données scientifiques, techniques et d'observations, dans le but de déterminer si le plan de nettoyage et de désinfection envisagé permet ou non de maîtriser le danger (**LE ROUX, 2013**).

En matière de validation des méthodes, il est nécessaire de distinguer deux cas :

- **Les méthodes de type quantitatif** : Elles fournissent un résultat chiffré, sur une échelle continue à partir de la mesure d'un signal en relation directe avec une quantité (analyte, molécule, substance, cellule ou organisme,...) ou une activité donnée de l'analyte (enzymes)
- **Les méthodes de type qualitatif** : Le résultat de ce type de méthode n'apporte pas d'information sur la quantité de l'analyte (cellule ou organisme), mais seulement sur sa présence ou son absence (positif/négatif), ou l'identification de la caractéristique recherchée (**BRANGER, 2014**)

III.2.Conditions pré requises à la validation.

Avant de réaliser une validation de procédé de nettoyage, certaines étapes préalables doivent être réalisées, on parle de prérequis (**KHORMANE, 2014**).



III.2.1 Niveau de propreté à atteindre

Avant d'envisager toute validation, il faut définir les niveaux de propreté à atteindre en fonction du niveau de risque pour le produit, les opérateurs et l'environnement, ainsi que les moyens les mieux adaptés à la mise en œuvre de la validation (**CONTE, 2003**).

III.2.2. Qualification des locaux et des équipements

Avant la validation, il faut s'assurer que les fonctionnalités des équipements intervenant lors de la désinfection sont qualifiées et que les caractéristiques environnementales des locaux sont spécifiées et maîtrisées: température, pression, hygrométrie (**CONTE, 2003**).

III.2.3. Qualification du personnel

La qualification du personnel est obligatoire selon les BPF. Le personnel participant aux activités de validation doit avoir reçu une formation appropriée. La démarche de qualification du personnel consiste à déclarer ou à confirmer la capacité d'une personne à occuper un poste de façon autonome. De plus, les opérateurs doivent avoir le niveau de formation théorique et pratique adéquat. Cette qualification est d'autant plus importante que la désinfection comporte des étapes manuelles. Les opérateurs devront être formés, évalués et faire l'objet d'une requalification périodique (**LEDOUX CHLOE, 2014**).

III.2.4. Qualification des agents de nettoyage et désinfection

Les agents de nettoyage doivent être achetés auprès de fournisseurs sélectionnés ou agréés par l'entreprise. Ceux-ci doivent transmettre pour les agents de nettoyage, en fonction de leur utilisation, une documentation comprenant la composition qualitative, les données de sécurité, le mode d'emploi, la méthode de dosage et la méthode de recherche des traces. Les fournisseurs doivent aussi garantir la constance de la qualité des agents de nettoyage (**LEDOUX CHLOE, 2014**).

III.2.5. Qualification du matériel de désinfection

Qualifier un matériel, c'est prouver que ce matériel est adapté au mode de nettoyage, qu'il n'altère pas la surface à nettoyer et ne génère ni ne transfère de contaminants. Le matériel de nettoyage est sélectionné en fonction du niveau de risque pour l'environnement. Il doit être adapté aux surfaces à nettoyer, si nécessaire réservé à l'usage exclusif de secteurs bien déterminés (**TERTRAISE, 2003**).



DRS

III.2.6. Procédures de nettoyage et de désinfection

La procédure est la première étape documentaire de la mise sous assurance qualité du procédé de nettoyage et désinfection. Elle donne les informations détaillées et séquentielles du procédé. Elle doit être claire et précise afin de garantir la reproductibilité du nettoyage effectué par différents opérateurs (CONTE, 2003).

III.3. Contrôle des processus de nettoyage et de désinfection

III.3.1. Contrôle des opérations de nettoyage

Les opérations de nettoyage (ou détergence) visent à éliminer les souillures telles que les protéines d'origine animale ou végétale qui constituent des facteurs favorisant le développement bactérien (substrat nutritif pour les micro-organismes). Par ailleurs, la présence de protéines sur une surface peut réduire l'efficacité des désinfectants par piégeage des molécules actives. Par conséquent, avant toute opération de désinfection, il convient de réaliser un nettoyage (ou détergence) minutieux (GARRY, 2011)

D'un point de vue pratique, plusieurs méthodologies existent :

➤ Contrôle visuel

Le contrôle visuel représente sans aucun doute, dans la routine, une méthode d'évaluation importante du succès du nettoyage. Mis en évidence d'absence de résidus organiques, absence de traces de minéraux, le degré de rangement, la présence d'éléments inutiles, etc. Cependant, la seule méthode de "contrôle visuel" ne suffit pas à évaluer avec fiabilité le succès d'un procédé de nettoyage ... (LE ROUX, 2013).

➤ Test rapide de détection de protéines/sucre réducteurs

Avec des bandelettes/stylo à usage unique, résultat semi-quantitatif en moins de 10 min. Interprétation facile des résultats par virage coloré basé sur la réaction du biuret (LE ROUX, 2013).

➤ Utilisation d'un colorant

Dans l'eau de rinçage des surfaces, qui laisse une coloration aux endroits où des souillures sont encore présentes (LE ROUX, 2013).

➤ ATP-métrie

Méthode rapide qui permet de contrôler la qualité du nettoyage en temps réel et donc de re-nettoyer si nécessaire. Toutes les cellules vivantes contiennent de l'ATP (Adénosine TriPhosphate). Le dosage de cette molécule par une méthode de fluorescence permet donc d'avoir rapidement une idée de la quantité de souillures présentes, souillures organiques et micro-organismes (LE ROUX, 2013).



III.3.2. Contrôle des opérations de désinfection

III.3.2.1 Prélèvements de surface et de l'air

1- Prélèvement de surface

Il existe deux types d'échantillonnage jugés acceptables: l'échantillonnage direct de la surface qui se fait par écouvillonnage et l'échantillonnage indirect par utilisation de solutions de rinçage. L'idéal consiste généralement à associer les deux méthodes, particulièrement dans le cas où certaines pièces d'équipement ne sont pas assez accessibles pour permettre un échantillonnage direct des surfaces (MOURNA, 2010).

a- Méthodes directes

Il s'agit de réaliser une empreinte de la contamination par utilisation d'un dispositif permettant d'appliquer une gélose sur la surface à analyser. Il existe plusieurs méthodes de prélèvement (ANSES, 2014).

✚ **Pétrifilm** : Il est composé de deux feuillets perméables et contient, sous forme déshydratée, le milieu de culture associé à un agent gélifiant. La quantité de milieu disponible pour la croissance bactérienne est faible dans le cas du Pétrifilm et ne s'applique pas sur les surfaces non planes, Il en est de même que la boîte de contact (SOW, 2003).

✚ **Les lames gélosées** : Elles sont constituées d'une lame de plastique biface de 10cm² environ et recouverte d'une gélose nutritive. Dans certains cas, les deux faces de la lame sont équivalentes, alors que dans d'autres cas elles contiennent des milieux différents (MANGO, 2005).

✚ **La boîte de contact**: C'est une boîte en plastique de 15 à 25 cm² de surface, contenant une gélose nutritive coulée de manière à former un ménisque convexe de 1 à 2 mm d'épaisseur qui entraînera au cours du prélèvement une partie des germes présents sur la surface (MANGO, 2005).

b- Méthodes indirectes

Elles nécessitent une ou deux étapes intermédiaires réalisées le plus souvent au laboratoire de microbiologie. Les principales méthodes indirectes sont l'écouvillonnage et le frottis

✚ **L'écouvillonnage** : Cette méthode consiste en un prélèvement d'une surface déterminée avec un écouvillon en cellulose, stérile et humide. Cette technique permet de rechercher toutes les flores désirées et autorise des dénombrements (SOW, 2003).

✚ **Chifonnage** : Une variante à l'écouvillon est l'utilisation de chifonnettes. La chifonnette est un tissu de coton, stérile et préalablement imbibé par un milieu de culture spécifique de la flore à analyser. Au laboratoire, un volume déterminé de liquide contenu dans la chifonnette est récupéré puis ensemencé. Elle est cependant intéressante pour la recherche de certains gènes spécifiques comme *Salmonella* ou le *Listeria*, ainsi que pour tester des surfaces non planes ou non accessibles par d'autres méthodes de prélèvement (SOW, 2003).



2- Prélèvement d'air

La surveillance de l'aéro-biocontamination peut s'effectuer par prélèvement d'air de façon active ou passive.

a. Méthode par sédimentation-prélèvement passif

Cette méthode est réalisée par simple exposition d'une boîte de Pétri ouverte. Les particules vont alors se déposer sur le milieu gélosé par sédimentation. Les boîtes de Pétri sont généralement exposées quatre heures afin d'éviter une éventuelle perte de fertilité du milieu de culture en raison de son dessèchement (BENSAID, 2016).

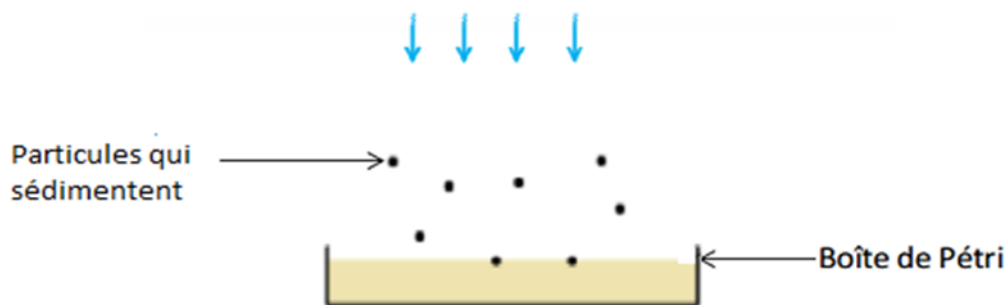


Figure 11: Schéma de la sédimentation des particules (BENSAID, 2016).

b. Méthode par sédimentation-prélèvement actif

Ce prélèvement s'effectue à l'aide d'un biocollecteur. Un certain volume d'air est aspiré au travers d'un crible qui permet d'impacter les micro-organismes et particules sur une boîte de pétri contenant un milieu gélosé. Le volume aspiré doit être représentatif de la zone considérée. Le débit d'air doit être suffisant pour pouvoir prélever 1 m² d'air dans un temps raisonnable et afin d'obtenir une vitesse d'impaction appropriées, afin d'assurer l'impaction des particules, tout en assurant la conservation de la viabilité des particules (BENSAID, 2016).

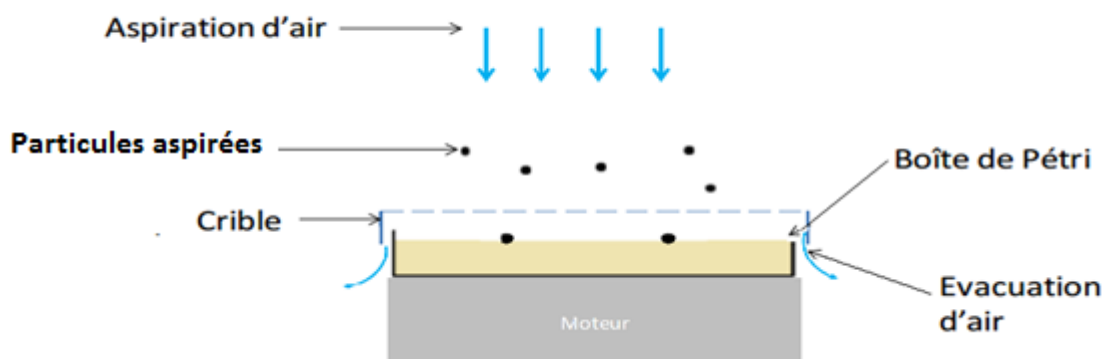


Figure 12: Schéma de la méthode de prélèvement de l'air par aspiration (BENSAID, 2016).



III.3.2.2. Analyse des prélèvements

Qu'il s'agisse de quantifier ou d'identifier les espèces présentes sur un échantillon, les différentes méthodes d'analyse microbiologique existantes sont relativement nombreuses et variées. Ainsi, le choix d'une technique préférentiellement à une autre dépend généralement du temps et du coût de réalisation, mais aussi de l'objectif de l'étude (**Québec ,2008**) :

- **Méthodes par culture** : La culture de micro-organismes peut être réalisée en amont de toute technique d'analyse permettant l'évaluation quantitative et/ou qualitative de micro-organismes.
- **Méthodes d'observation** : Les méthodes d'observation, macro ou microscopique permettent d'estimer quantitativement des populations microbiennes par dénombrement direct (cellules, propagules fongiques, etc.), par coloration plus ou moins spécifique ou par marquage fluorescent suivi d'analyses d'images. L'identification fongique est possible jusqu'au niveau du genre ou de l'espèce par reconnaissance de caractères morphologiques typiques.
- **Méthodes chimiques** : Les méthodes chimiques permettent l'analyse de divers paramètres liés aux micro-organismes. Elles sont le plus souvent utilisées afin d'estimer l'activité métabolique et donner ainsi une information sur la toxicité potentielle d'une population microbienne présente sur un substrat. Généralement, ce type d'analyse repose sur le principe de l'évaluation de composés chimiques issus de cellules microbiennes.
- **Méthodes biologie moléculaire** : Les méthodes d'analyse utilisant la technologie de biologie moléculaire reposent sur le principe de l'isolement de séquences ADN ou d'ARN précises, de manière à cibler un gène et/ou un phénotype particulier, caractéristique d'une espèce, d'un genre ou d'une famille d'organismes.

Depuis sa découverte dans les années 80 par **K. Mullis**, la réaction de polymérisation en chaîne (PCR en anglais), est devenue un outil quasiment incontournable de la caractérisation des micro-organismes (**VERDIER, 2015**).

III.4. Validation d'un protocole de nettoyage et de désinfection

Il convient d'établir un protocole écrit précisant les modalités de mise en œuvre des activités de VDN. Le protocole doit être revu et approuvé. Il doit définir les étapes critiques et les critères d'acceptation.

Un protocole de validation des procédés de nettoyage et de désinfection est requis pour décrire comment le procédé va être validé. Il doit comporter :

- ❖ L'objectif de la validation du procédé de nettoyage-désinfection ;
- ❖ Les responsabilités pour effectuer et approuver les études de validation ;
- ❖ L'équipement à nettoyer ;



- ❖ Les procédures de nettoyage ;
- ❖ Le matériel utilisé dans la VND ;
- ❖ Les critères d'acceptation ;
- ❖ Les méthodes analytiques ;
- ❖ Le type de prélèvements obtenus et comment ils peuvent être réalisés et analysés ;
- ❖ Les paramètres de contrôle et de suivi.

Les essais de VN doivent être réalisés suivant le protocole dressé et accompagné des enregistrements des résultats obtenus (**MOURNA, 2010**).

III.4.1 Plan général de la validation de nettoyage et/ou de désinfection

Le plan documentaire de validation (PDV) doit être un document bref, clair et concis. Il présente les activités de validation des procédures de nettoyage, qualification des équipements et utilités. Il doit comporter au minimum les données suivantes :

- Politique de validation ;
- Structure organisationnelle des activités de validation de nettoyage et de désinfection;
- Relevé des équipements et procédés de nettoyage et désinfection à valider ;
- Format de la documentation à utiliser pour les protocoles et les rapports de VND ;
- Planification et programmation ;
- Maîtrise des changements ;
- Référence aux documents existants.

Il en découle une procédure générale de validation de VND qui indique comment se déroulera la validation en général (**MOURNA, 2010**).

III.4.2. Etapes de validation d'un protocole de désinfection

Les différentes étapes de validation d'un protocole de désinfection sont illustrés dans la figure 13 (**LE ROUX, 2013**).

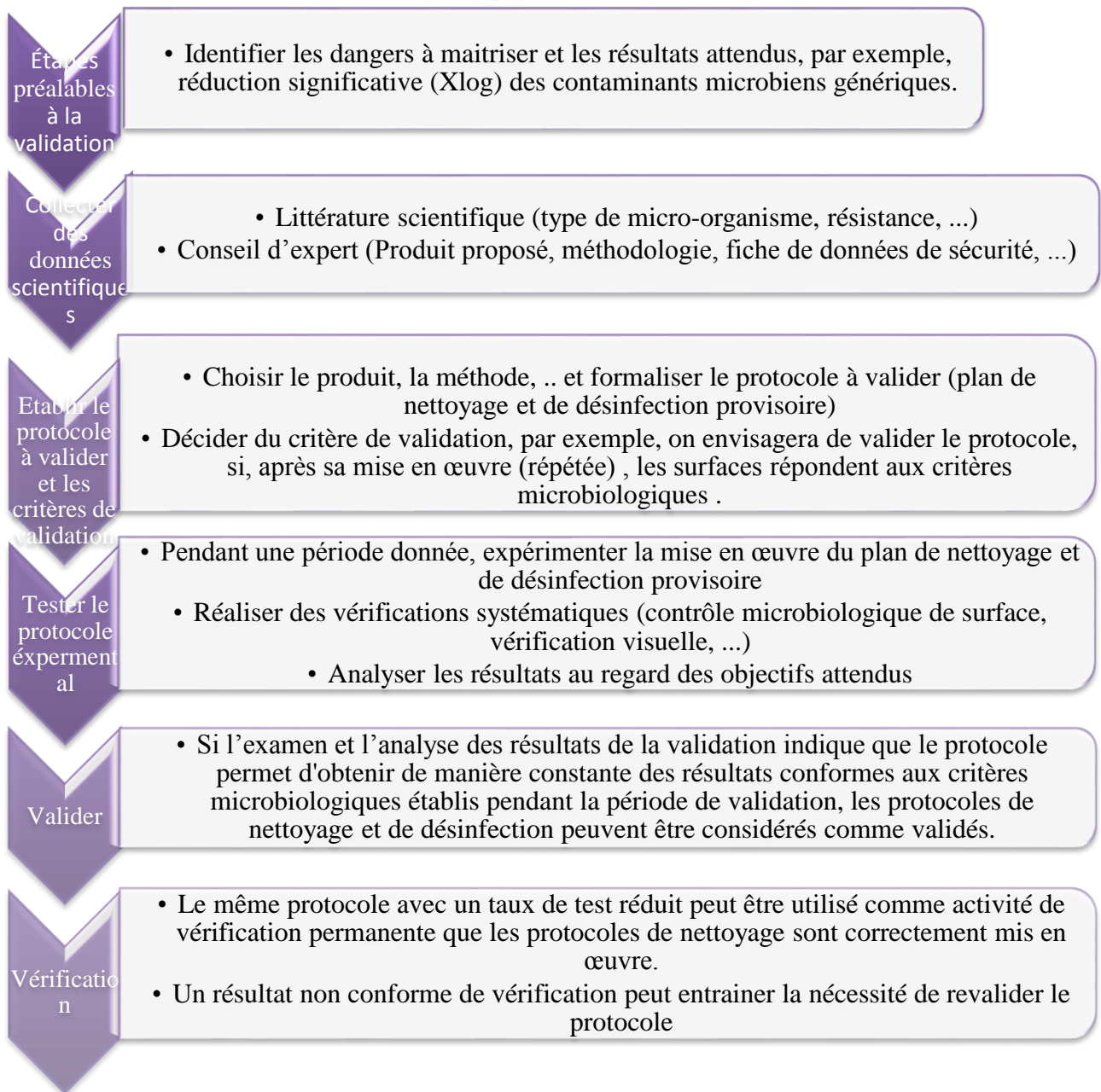


Figure 13: Schématisation des étapes de la validation d'un protocole de désinfection

III.4.3. Rapport de validation du protocole de nettoyage et de désinfection

Ce document a pour fonction d'analyser les données brutes dans le but de prendre une décision ou de traduire une tendance. Il est rédigé en rappelant le principe de la validation, les critères d'acceptation et en tenant compte des éventuelles déviations par rapport au protocole initial.



Les résultats doivent être présentés de façon synthétique et doivent donner lieu à une analyse. Les conclusions doivent être claires et objectives. Elles doivent conduire à des propositions et des recommandations pour améliorer, changer ou entériner les procédures de nettoyage et désinfection. Au terme de la validation, la procédure de nettoyage doit être mise à jour ou confirmée (CONTE, 2003).

III.4.4. Suivi de la validation de nettoyage

Les procédures de nettoyage doivent être suivies dans des intervalles appropriés après la validation afin d'assurer que ces procédures sont efficaces quand elles sont utilisées en routine. Le suivi de la validation peut se réaliser selon deux grands axes :

- Le contrôle des résultats : Les résultats doivent donner lieu à un enregistrement pour permettre une analyse de tendance. Ces contrôles peuvent également mettre en évidence une dérive du procédé de nettoyage, cette éventualité devant donner lieu à la mise en application d'actions correctives.
- Le contrôle des moyens : La qualité de la désinfection repose sur une bonne application des procédés, c'est pourquoi, en plus des contrôles, le suivi doit inclure des audits de désinfection. Ceux-ci permettent de vérifier que les moyens humains et matériels mis en œuvre sont toujours adéquats (suivi de qualification du matériel, de formation du personnel) (CONTE, 2003 ; MOURNA, 2010).

III.4.5. Actions correctives

Le suivi de la validation permet, dans certains cas, de mettre en évidence des non-conformités dans le procédé de nettoyage et désinfection. Ces dérives doivent donner lieu à une enquête et à la mise en œuvre d'actions correctives.

Si les actions correctives portent sur les modalités d'application du procédé telles que le temps de nettoyage mal appliqué et les dérives dans la technique de nettoyage manuel, ce procédé est conservé et la validation reste valable.

En revanche, si les actions correctives conduisent à modifier le procédé lui-même ou les conditions dans lesquelles la validation a été faite, elles doivent donner lieu à une nouvelle validation, changement de matériel ou d'agent de nettoyage par exemple (CONTE, 2003).

III.4.6. Revalidation

La validation de nettoyage et désinfection doit être renouvelée périodiquement selon une fréquence qui tient compte des spécificités liées à l'activité ou ponctuellement lors d'un changement d'équipement d'un désinfectant ou de la procédure de désinfection elle-même. Lorsqu'aucun changement important est intervenu au niveau du statut validé, un examen attestant que les installations, systèmes, équipements et procédés satisfont aux exigences prescrites tient lieu de revalidation (TERTRAIS, 2003).



MATERIEL ET METHODES

I. Type et période d'étude

Il s'agit d'une étude prospective analytique, réalisée sur une durée de 3 mois allant du 01 mars au 31 mai 2017. Elle a comporté 5 volets :

- Le 1^{er} volet a consisté en une évaluation de l'activité antibactérienne de différents désinfectants sur les surfaces d'un service hospitalier ;
- Le second volet a été consacré à l'identification des germes isolés ;
- Le 3^{ème} volet a comporté la recherche de la dilution minimale d'inhibition et le temps minimal de contact des désinfectants ;
- Le 4^{ème} volet pour vérifier les résultats expérimentaux obtenus.
- Le 5^{ème} volet a comporté le contrôle de l'air

II. Lieu et points de prélèvements

Les prélèvements ont été réalisés au centre d'hémodialyse de l'hôpital EL GHASSANI de Fès. Ils ont concerné aussi bien la surface que l'air de la salle d'hémodialyse. Les surfaces choisies sont celles des tables et des chariots.

III. Lieu d'étude

Les analyses microbiologiques ont été effectuées au Laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du milieu (LRDEHM) de Fès.

IV. Matériels

IV.1. Matériel et consommable utilisé pour le prélèvement

Ce matériel comporte les écouvillons stériles humidifiés avec le sérum physiologique stérile, les boîtes de pétri contenant le milieu PCA, le portoir, les lingettes stériles, le sérum physiologique, l'eau distillée stérile et la glacière.

IV.2. Matériel et consommable utilisé au laboratoire

Le matériel et le consommable utilisé comporte le matériel de routine usuel d'un laboratoire de microbiologie tel que : l'autoclave ($121\pm 3^{\circ}\text{C}$), le four pasteur ($175\pm 5^{\circ}\text{C}$), le bec bunsen, le compteur colonies et les boîtes de pétri,



Les milieux de culture et les réactifs d'identification utilisés comportent le milieu BHI, les Kits de la coloration Gram, la Gélose au sang, le milieu PCA, gélose nutritive, le milieu Chapman, le milieu Kligler, le milieu Cétrimide, le milieu DNase. Les disques oxydase, les réactifs pour test catalase, le plasma de lapin, l'urée et le kovacs.

N.B : La composition, la préparation, et les contrôles qualités des milieux de culture sont décrits en annexe 3.

IV.3. Désinfectants et détergents utilisés

Nous avons évalué l'activité antibactérienne de 2 désinfectants. Il s'agit de :

- Désinfectant désigné par **D1** : un désinfectant appartenant à la classe des ammoniums quaternaires un désinfectant appartenant à la classe des ammoniums quaternaires à base de chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium dont la molécule est un sel d'ammonium quaternaire représentée par un atome d'azote lié à 4 alkyles ,2 groupes de méthyles et deux groupes de decyles.
- Désinfectant désigné par **D2** : un désinfectant dont la molécule active principale est le formaldéhyde de la classe des aldéhydes.

Le détergent utilisé est : SAPRO à base de citron qui est un détergent contient des tensio actifs non ioniques. Son aspect est liquide limpide jaune. C'est une base forte de pH : 9,0 +/- 0,5. Sa densité à 20° C est de 1,010 +/- 0,01. Il présente une biodégradabilité supérieure à 90%.

V. méthodes

V.1. Prélèvements, conservation, et transport des échantillons au laboratoire

V.1.1. Prélèvement de surfaces

Les prélèvements de surface ont été faits par la technique d'écouvillonnage qui consiste à frotter chaque point de prélèvement avec un écouvillon stérile préalablement humidifié dans le sérum physiologique contenu dans son étui, en effectuant des stries parallèles rapprochées, et en le faisant tourner légèrement dans le même point en stries perpendiculaires aux premiers et sur une surface de 25 cm², la même opération est répétée quatre fois sur d'autres surfaces du même point de prélèvement, en ayant soin de rincer l'écouvillon dans son étui entre chaque prélèvement (voir annexe 1).



V.1.2. Prélèvement d'air

La technique de prélèvement consiste à exposer une boîte de Pétri contenant le milieu PCA dans une surface de 1 m², à enlever le couvercle, et à laisser la boîte ouverte à l'air ambiant pendant 16 minutes (voir annexe 2.)

Les échantillons de surfaces et d'air prélevés ont été acheminés rapidement au laboratoire dans une glacière à 4°C pour être analysés.

V.2. Culture des prélèvements de surfaces et de l'air

V.2.1 Prélèvements de surfaces

L'analyse des prélèvements de surface est pratiquée selon la méthode décrite par Meunier (30). Arrivé au laboratoire, chaque écouvillon a été immergé dans un bouillon nutritif liquide (BHI), puis incubé à 37±1°C pendant 18 h. Ce bouillon a servi à ensemercer par épuisement la gélose au sang. L'incubation a été réalisée à 37±1°C pendant 48 h.

V.2.2. Prélèvements d'air

Les boîtes de PCA préalablement ouvertes et exposées ont été incubées à 37±1°C pendant 48 h.

V.3. Identification des cultures obtenues sur gélose au sang et sur milieu PCA

Après 48 h d'incubation, l'aspect, la taille, la forme et la couleur des colonies ont été notées, ensuite une purification de chaque type de colonie a été réalisée par ensemencement par épuisement sur milieu PCA. Les souches purifiées ont fait l'objet d'une identification microbiologique se basant sur l'aspect, la forme, la coloration de Gram et la galerie biochimique classique.

V.3.1. Coloration de Gram

C'est la coloration de base en bactériologie, elle permet une classification des bactéries selon leur structure, leur forme et leur Gram (BERRADA, 2016). Ainsi, à partir de la culture purifiée, on réalise un étalement sur une lame à l'aide d'une anse, puis on fixe à la chaleur, ensuite on couvre par la solution de violet de gentiane pendant

30 s, puis on élimine le violet de gentiane en rinçant avec le lugol, 2 fois pendant 15 secondes. Ensuite on décolore à l'alcool-acétone par un mouvement de bascule, jusqu'à ce que l'alcool acétone n'entraîne plus de violet et soit bien incolore, On lave après à l'eau courante et on recolore avec la fuchsine diluée pendant 15 secondes. Ensuite, on rince bien et on sèche, et enfin, on observe à l'huile d'immersion au fort grossissement. Les germes à Gram positif apparaissent violets, et ceux à Gram négatif apparaissent roses (Annexe 4).



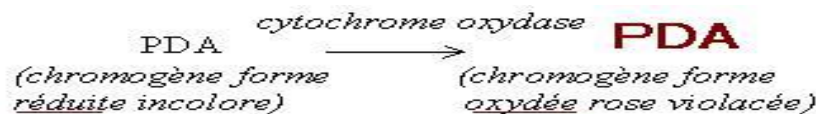
V.3.2. Identification biochimique

Le schéma général de l'identification des bactéries est montré en (annexe 5)

a- Identification biochimique des Bacilles Gram Négatif (BGN)

➤ Recherche de l'oxydase

Si une bactérie possède l'enzyme respiratoire, appelée cytochrome oxydase, alors elle peut faire la réaction suivante :



Les cytochromes sont des protéines qui appartiennent à la chaîne respiratoire, composée d'une succession de transporteurs d'électrons, en particulier les cytochromes c. En fait, ce test recherche le cytochrome c-oxydase.

La recherche de l'oxydase est un des critères les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des bactéries, surtout celles à Gram négatif. Cette recherche consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée, à oxyder la forme réduite incolore de dérivés N-méthylé du paraphénylène diamine, en leurs formes oxydées semi-quinoniques rose-violacées.

Ainsi, à partir de la culture purifiée, un inoculum bactérien est déposé sur un disque d'oxydase à l'aide d'une pipette pasteur. La réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration violette à l'endroit où nous avons déposé la colonie, soit immédiatement, soit quelques secondes après (Voir annexe 5).

➤ Test ONPG (Orthonitrophényl -D-Galactopyranoside)

Le terme ONPG hydrolase est plus propre que celui de D-galactosidase dans la mesure où il précise que le substrat utilisé est l'ONPG et non le lactose.

En effet, il existe des germes qui reconnaissent l'ONPG du côté nitro-2-phénol et non celui du D-galactoside. Ces germes ont donc une activité ONPG hydrolase sans fermenter le lactose. Le test à l'ONPG est une technique basée sur l'action directe de l'enzyme sur une molécule chromogène pouvant être l'Orthonitrophényl-D-Galactopyranoside, ou le 2-naphtol-D-galactopyranoside.

Ceux-ci sont utilisés comme substrat et libèrent respectivement l'orthonitrophénol (jaune) et le b-naphtol.



Ce test est réalisé pour les BGN oxydase négative.

Ainsi, à partir d'une culture purifiée de bacille Gram négatif et oxydase négative, nous avons réalisé une suspension dans 1 ml d'eau distillée stérile, puis nous avons ajouté un disque imprégné d'ONPG. Une réaction positive se traduit par un virage du milieu au jaune (Voir annexe 5.).

➤ Milieu lactose-glucose-H₂S (Kligler-Hajna)

Ce milieu est un milieu complexe, qui permet la recherche de plusieurs caractères biochimiques. Il est très utilisé dans l'identification des *Enterobacteriaceae*.

Il s'agit d'un milieu différentiel de couleur rouge qui permet de confirmer la fermentation du glucose et du lactose, la production des gaz, et aussi la réduction des composés soufrés qui se traduit par la production de H₂S. Comme ces milieux contiennent des sels de fer, la production de H₂S est révélée par la formation du sulfure métallique de couleur noire.

Ainsi, à partir d'une culture purifiée de bacille Gram négatif oxydase négative, on ensemence la pente du milieu Kligler en stries serrées et parallèles, et le culot par piqûre centrale, on incube ensuite à 37±1°C pendant 18 à 24 h.

- Si la souche fermente le lactose, la surface inclinée vire au jaune. Sinon, sa couleur reste inchangée ;
- Si la souche fermente le glucose, le culot vire au jaune. Sinon, sa couleur reste inchangée ;
- Si la souche produit l'H₂S, il se produit un noircissement de la zone joignant le culot à la pente ;
- Si la souche produit du gaz, elle se traduit par la présence de bulles de gaz au niveau du culot (Voir annexe 5).

➤ Test uréase

Ce test se fait sur milieu urée tryptophane, appelé improprement milieu Urée Indole. Le milieu Urée Tryptophane est un milieu synthétique. C'est un milieu complexe qui permet de rechercher l'uréase et l'indole, utiles à l'identification de nombreuses bactéries appartenant aux *Enterobacteriaceae*.

Les bactéries Uréase (+) hydrolysent l'urée en ammoniac, ce qui entraîne une forte alcalinisation du milieu qui sera révélée par un virage de l'indicateur de pH, le rouge de phénol, à sa teinte basique de couleur rouge (Voir annexe 5).



Uréase



Ainsi, on ensemence le milieu urée avec l'isolat purifié sur milieu gélosé, puis on incube à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 18 à 24 h. L'apparition d'une couleur rouge traduit une alcalinisation du milieu, suite à l'hydrolyse de l'urée et formation de carbonate d'ammonium, la bactérie est Uréase positive. La persistance de la couleur orange montre qu'il n'y a pas eu d'alcalinisation, la bactérie est Uréase négative.

➤ Test Indole

Après addition du réactif de Kovacs, le diméthyl-amino-4-benzaldéhyde contenu dans le réactif de Kovacs réagit avec l'indole produit par l'activité de la tryptophanase, et produit un anneau rouge à la partie supérieure du milieu urée-indole préalablement ensemencé.

On ajoute une goutte de Kovacs au milieu Urée-indole préalablement ensemencé. Si formation d'un anneau rouge, la bactérie est indole positif. Si absence d'un anneau rouge. Elle est indole négatif (Voir annexe 5).

b- Identification de *Pseudomonas*

Pour les BGN oxydase positive, on les cultive sur milieu cétrimide et s'il le faut sur King A et King B.

➤ Milieu cétrimide

La gélose au cétrimide est un milieu sélectif, qui permet l'isolement des *Pseudomonas* et notamment de *Pseudomonas aeruginosa*. Ce milieu est relativement pauvre et contient un antiseptique, le cétrimide (bromure de N-cétyl-N, N, N-triméthylammonium), composé ammonium quaternaire, qui agit comme inhibiteur d'une grande variété de germes, y compris les espèces de *Pseudomonas* autres que *Pseudomonas aeruginosa*.

Ce milieu, proche du milieu King A, favorise aussi la production par *Pseudomonas aeruginosa* de pigments.

La confirmation de *Pseudomonas aeruginosa* se fait sur milieu King A et King B qui favorisent le développement des pigments tels que la pyocyanine et la pyoverdine.

➤ Milieux de King

Les milieux King (KingA et KingB) permettent de différencier entre elles les différentes espèces du genre *Pseudomonas* par la mise en évidence de la production de 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, due spécifiquement à *Pseudomonas aeruginosa*, est favorisée par la présence d'ions inorganiques. La recherche de la production de pyocyanine est effectuée sur milieu King A ;
- la production de pyoverdine, est favorisée par une teneur élevée en phosphate. La recherche de la production de pyoverdine est effectuée sur milieu King B.

Ainsi, à partir d'une culture purifiée de bacille Gram négatif oxydase positive, on ensemence la surface du milieu, puis on incube pendant 24 heures à 37°C, voire même de préférence à 42°C (l'incubation à 42°C permet un isolement spécifique de *P.aeruginosa*).

La présence de pigments diffusibles se traduit par l'apparition d'une couleur qui peut diffuser. Ainsi, sur toute la pente, si :

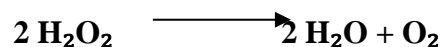
- couleur bleue sur le milieu King A, King A positif, la souche possède la pyocyanine
- couleur jaune-vert fluorescent sur le milieu King B, King B positif, la souche présente la pyoverdine (Voir annexe 5).

c- Identification des Staphylocoques

➤ Test catalase

Certaines réactions métaboliques aboutissent, dans les conditions de l'aérobiose, à la production de peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée ou H₂O₂). Ce composé peut être le produit de la chaîne respiratoire. Cependant, ce peroxyde d'hydrogène doit être éliminé car il est un poison cellulaire. Sa décomposition dans l'organisme microbien peut être réalisée soit par des peroxydases, soit par la catalase (la peroxydase ayant toutefois une activité plus faible). En l'absence de système enzymatique destructeur, la vie en aérobie devient généralement impossible : les micro-organismes sont alors anaérobies strictes.

La catalase est une enzyme importante. Elle joue un rôle majeur dans l'élimination du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



La plupart des micro-organismes aérobies possèdent une catalase. Parmi les bactéries Gram positif, seules les *Streptococcaceae*, les *Lactobacillus* sont dépourvus de catalase.

Ce test a été appliqué pour les cocci Gram positif, ce qui a permis de différencier entre les *Streptococcus*, les *Micrococcus* et les *Staphylococcus*.

Ainsi, à partir de la culture de cocci Gram positif purifiée, nous avons prélevé à l'aide d'une pipette pasteur stérile une quantité suffisante de culture, et on l'a mise en suspension dans une goutte d'eau oxygénée. Une réaction positive se traduit par un dégagement gazeux d'oxygène (Voir annexe 5).



➤ Milieu Chapman-mannité

Le milieu de Chapman est un milieu sélectif, utilisé surtout en microbiologie médicale. Il permet la croissance des germes halophiles, parmi lesquels figurent au premier rang les bactéries du genre *Staphylococcus*, mais aussi les *Micrococcus*, les *Enterococcus*, les *Bacillus*, et de rares bactéries à Gram négatif.

Ce milieu contient du chlorure de sodium en forte concentration (75 g/l), ce qui permet un isolement sélectif de *Staphylococcus* tolérant les fortes concentrations en NaCl. Cependant, l'identification des *Staphylococcus* a été faite par le test catalase. Ce milieu permet aussi d'étudier la fermentation du mannitol par virage au jaune de l'indicateur coloré, le rouge de phénol, autour des colonies.

Ainsi, à partir d'une culture purifiée de cocci Gram positif oxydase négative et catalase positive, on ensemence en stries serrées la surface du milieu Chapman mannité, puis on incube à 37°C pendant 18-24 heures.

Les colonies mannitol + sont entourées d'une auréole jaune. Les colonies pigmentées en jaunes et mannitol + : forte suspicion de *S. aureus*

N.B : Ne pas confondre la pigmentation des colonies et le virage de l'indicateur coloré (Voir annexe 5).

➤ Milieu DNase

Le milieu gélose à l'acide désoxyribonucléique permet la recherche de l'ADN des bactéries, et particulièrement celle des *Staphylococcus aureus*.

La révélation se fait par l'acide chlorhydrique (1fois normal) qui, une fois appliqué et laissé pénétrer dans le milieu, les microorganismes positifs à la DNase, comme *Staphylococcus aureus*, sont entourés d'une zone claire d'ADN dépolymérisé, tandis que les parties du milieu plus éloignées de la bande d'ensemencement sont opaques et blanchâtres, sous l'effet de l'ADN polymérisé. Les colonies de microorganismes négatifs à la DNase ne présentent pas de zones plus claires en périphérie des colonies. Si la zone autour de la strie est claire, la souche est DNase (+) ; sinon, elle est DNase (-).

A partir d'une culture purifiée identifiée de *Staphylococcus*, on ensemence par épuisement le milieu Gélosé à l'acide désoxyribonucléique à l'aide d'une anse à fil droit, on incube à 37°C pendant 24 h. Si après addition de l'acide chlorhydrique, la zone autour de la strie est claire, la souche est DNase (+) (Voir annexe 5).



➤ Test coagulase

Le plasma de lapin est un milieu idéal pour la recherche de la coagulase libre de *Staphylococcus aureus*. La production de la coagulase permet de différencier les souches de *Staphylococcus aureus* des autres souches (*epidermis*,...).

Les souches de *Staphylococcus aureus* provoquent la coagulation du plasma le plus souvent au cours des 3 premières heures. Dans certains cas, la coagulation est plus légère et plus tardive, mais la réaction ne doit être considérée comme négative que si le phénomène n'intervient pas après la 24ème heure.

Après une étape d'enrichissement sur milieu BHI de l'inoculum de *Staphylococcus* préalablement identifié et confirmé DNase+, on prélève 0,5 ml de ce dernier, et on l'ajoute à 0,5 ml du plasma de lapin et on incube à $37\pm 1^\circ\text{C}$ pendant 24 h.

Si la coagulation se produit dans les 24 h, la souche de *Staphylococcus* à coagulase positive (voir annexe 5).

d-Identification des Streptocoques

Pour l'identification des Streptocoques, on se base sur la coloration de Gram, et la catalase, et sur le milieu Slanetz. Ainsi, les cocci Gram positif et catalase négatif sont cultivés sur milieu Slanetz.

✓ Milieu Slanetz

La gélose de Slanetz est un milieu sélectif utilisé pour le dénombrement des entérocoques intestinaux. L'azide de sodium permet d'inhiber la croissance des microorganismes à Gram négatif. Le TTC est un indicateur de la croissance bactérienne. Il est réduit en format insoluble à l'intérieur de la cellule. Cette réaction se manifeste par l'apparition de colonies de couleur rouge à marron doivent être considérées comme caractéristiques des Streptocoques intestinaux. Procéder à la confirmation des colonies typiques en utilisant une gélose BEA (annexe 5).

✓ Milieu BEA

Milieu d'isolement sélectif des bactéries du genre *Streptococcus* appartenant au groupe D et les bactéries du genre *Enterococcus*. L'ensemencement se fait sur milieu BEA à partir des colonies rouges briques ayant poussé sur milieu slanetz, puis incubé à 44°C pendant 2 h. La présence de noircissement indique une présomption des bactéries du genre *Streptococcus* appartenant au groupe D et les bactéries du genre *Enterococcus* (uniquement présomption car les milieux ne sont pas sélectifs à 100%) (annexe 5).



V.4. Recherche de la dilution minimale d'inhibition et le temps minimal de contact des désinfectants

V.4.1. Détermination de la dilution minimale cible (CMI)

A partir des souches purifiées sur gélose nutritive ou sur milieu PCA on prépare l'inoculum par ensemencement de la souche testée dans 1,8ml de bouillon BHI et incubation pendant 3 heures à 37°C. Par la suite, nous avons réalisé une dilution en cascade (de 1/25 au 1/250) des désinfectants dans de l'eau distillée stérile. L'ajout dans chaque tube, contenant la suspension bactérienne, de 200 µl de chaque dilution du désinfectant, a été ensuite effectué. L'incubation des tubes après homogénéisation a été enfin réalisée à 37°C pendant 18 à 24h.

L'absence de trouble du milieu de culture dans un des tubes permet de déterminer la dilution du désinfectant suffisante pour empêcher le développement de la souche étudiée ; dilution cible.

V.4.2. Détermination du temps minimal d'inhibition (TMI)

La suspension bactérienne déjà préparé dans le BHI et incubée à 37°±1C pendant 3h, est distribuée dans des tubes, puis un ajout de 200µl de la dilution cible du désinfectant jugé efficace a été réalisé, une mesure de l'absorbance a été effectuée au temps initial et après incubation à 37°±1C tous les 10 min (Soit t₀, t₂₀, t₄₀, ...), jusqu'au moment où le trouble disparaît et l'absorbance devienne nulle.

V.5. Validation de la procédure de nettoyage et de désinfection

Les opérations de nettoyage et de désinfection ont eu lieu successivement

a- Nettoyage

Pour cela, nous avons préparé la solution détergente selon les prescriptions du fabricant. Ensuite, nous avons appliqué la solution manuellement à l'aide de lingettes stériles sur les surfaces, tout en les frottant. Le temps de contact était en moyenne de 10 minutes.

b- Rinçage intermédiaire

Pour enlever les saletés détachées et les résidus de détergent, nous avons procédé à un rinçage avec l'eau stérile.

c- Désinfection

Elle est réalisée avec une solution contenant un désinfectant. Ainsi, à l'aide d'un flacon pulvérisateur, nous avons appliqué manuellement la solution sur les surfaces avec des lingettes stériles. Nous avons laissé agir le désinfectant pendant un temps de contact spécifique pour chaque désinfectant.



d- Rinçage final

Les surfaces sont rincées avec de l'eau douce jusqu'à élimination complète de toute trace de la solution de désinfection.

e- Contrôle qualité de la procédure de nettoyage et de désinfection

Ce contrôle a consisté à faire des prélèvements de surface par la technique d'écouvillonnage, mentionnée dessous. Les prélèvements ont été enrichis au BHI et incubés à $37\pm 1^\circ\text{C}$ pendant 18 h. Ce bouillon a servi à ensemencer par épuisement la gélose au sang. Les boîtes de gélose ensemencées ont été incubées à $37\pm 1^\circ\text{C}$ pendant 48 h.

Un dénombrement des colonies et une identification des germes ont été effectués pour les boîtes ayant montré une culture positive.

VI. Analyse statistique

Les variables quantitatives (moyenne des colonies dénombrées) sont décrites en termes de moyenne écart-type. La comparaison des moyennes est faite par le test de Khi deux. Les tests sont considérés comme significatifs pour les valeurs de $p < 0,05$.

La saisie et le traitement des données sont faits à l'aide du logiciel Epi 3.4 version 2007.



RESULTATS

Suite aux études in vitro ayant montré l'efficacité de certains désinfectants sur des souches bactériennes isolées des surfaces du centre d'hémodialyse (**BERRADA, 2016**), nous avons jugé important d'évaluer l'efficacité de ces désinfectants in situ. Le contrôle de la désinfection pouvant être réalisé par des méthodes basées sur la récupération des germes présents sur les surfaces nettoyées et leur mise en culture. La méthode d'écouvillonnage, l'une des méthodes de contrôle, est la méthode que nous avons choisie. Les critères choisis sont la propreté visuelle, la réduction qualitative et quantitative des germes avec une diminution de 3 décimales logarithmiques, ainsi que le test de répétabilité.

Ainsi, nous avons effectué 6 cycles de contrôles microbiologiques des surfaces d'hémodialyse. Durant ces cycles, nous avons testé d'abord le protocole expérimental, évalué la procédure de nettoyage ainsi que celle de la désinfection, déterminé la dilution minimale d'inhibition ainsi que le temps d'action, contrôlé la qualité microbiologique de l'air et validé le protocole de nettoyage et de désinfection.

I. Résultats relatifs au test du protocole expérimental

Afin de quantifier le pouvoir antibactérien d'un désinfectant, l'activité antibactérienne se calcule comme la différence entre le nombre d'unités formant colonies présents sur les témoins et le nombre d'unités formant colonies retrouvées sur les surfaces désinfectés.

I.1. Procédure sans nettoyage

Comme présenté en tableau 2, la moyenne des dénombrements en UFC pour les témoins est de 14535UFC. En appliquant le désinfectant D1 non précédé d'un nettoyage, la moyenne des dénombrements en UFC est de 14037,5 UFC, la réduction est de 493,5UFC. Pour le désinfectant D2, la moyenne des dénombrements en UFC est de 14062,35UFC, la réduction est de 472,5 UFC. La variation pour les deux désinfectants n'était pas significative.



Tableau 2: Moyenne des dénombrements en UFC au cours des 2 1^{ers} cycles (48 sites contrôlés)

	Témoin	Désinfectant D1 à base d'ammonium quaternaire	Désinfectant D2 à base de formaldéhyde	p
Moyenne (UFC)	14535±786,2	14037,5±966,3	14062,5±935,57	>0,05

Par ailleurs, l'identification des germes retrouvés a montré la présence des mêmes genres de bactéries aussi bien pour les témoins que pour les cas de désinfectants D1 et D2. Il s'agit de souches de *Staphylococcus* coagulase positive, de *Streptococcus sp*, de bacilles Gram positif (BGP), et de bacilles Gram négatif oxydase négatif fermentaires (BGN F). Les désinfectants appliqués n'ont pas inhibé la croissance des bactéries.

I.2 .Procédure avec nettoyage

Comme le montre le tableau 3, la moyenne des dénombrements en UFC pour les témoins est de 14617UFC. En appliquant le nettoyage, la moyenne des dénombrements en UFC est de 13090 UFC, la réduction est de 1527UFC. L'amélioration notée est nettement significative.

En appliquant le désinfectant D1 précédé d'un nettoyage et à la dilution minimale d'inhibition (1/25), la moyenne des dénombrements en UFC est de 12765 UFC, la réduction obtenue après l'étape de nettoyage est de 325UFC. Pour le désinfectant D2 dilué au 1/50, la moyenne des dénombrements en UFC notée après l'étape de nettoyage est de 12424UFC, la réduction est de 666 UFC. La variation pour les deux désinfectants n'était pas significative.

Tableau 3: Moyenne des dénombrements en UFC au cours du 3ème et 4ème cycles (48 sites contrôlés)

	Témoin	Nettoyage	p	Nettoyage	D1	p	Nettoyage	D2	p
Moyenne (UFC)	14617±895,37	13090±1075,	<0,05	13090±1075,2	12765±1102	>0,05	13090±1075,2	12424±1181,8	>0,05



Par ailleurs, 60 souches bactériennes ont été isolées au niveau des témoins. Elles sont représentées par les *Staphylococcus* coagulase positive, les *Streptococcus sp*, les bacilles Gram positif (BGP), et les bacilles Gram négatif oxydase négatif fermentaires (BGN F). L'application du désinfectant D2 a permis d'isoler 42 souches alors que celle du désinfectant D3 a permis de retrouver 37 souches bactériennes. Par ailleurs, nous avons remarqué la présence des mêmes genres bactériens même après application des désinfectants D2 et D3.

II. Recherche de la dilution minimale d'inhibition et le temps minimal de contact des désinfectants

A la suite de la contamination abondante retrouvée après nettoyage et désinfection aussi bien par le désinfectant D1 que par le désinfectant D2 et aux dilutions minimales d'inhibitions retrouvées par **BERRADA (2016)**, nous avons jugé intéressant de rechercher l'efficacité in vitro et de déterminer la dilution minimale d'inhibition et le temps minimal de contact de ces désinfectants. La dilution minimale d'inhibition et le temps de contact ont été réalisés par la technique en macrométhode.

II.1. Désinfectant D1 à base d'ammonium quaternaire

II.1.1. Dilution minimale d'inhibition

Les résultats relatifs à la dilution minimale du désinfectant D1 sont montrés dans le tableau 4 et en figure 13.

Tableau 4: Dilution minimale d'inhibition du désinfectant D1

Dilution	BGN F	BGP	St. coagulase négative	<i>Streptococcus sp</i>
1/6	-	-	-	-
1/12	-	-	-	-
1/25	-	+	-	+
1/50	+	+	+	+
1/100	+	+	+	+

(-) : inhibition de croissance ; (+) : présence de croissance



Nous avons noté d'après le tableau ci-dessus, que le désinfectant D1 a inhibé la croissance des bacilles Gram négatif oxydase négative fermentaires (BGN F) et des Staphylocoques coagulase négative à la dilution 1/25, alors que les Streptocoques et les BGP ont été inhibés à la dilution de 1/12. Par ailleurs et comme montré en figure 14, l'absorbance est devenue nulle à la dilution minimale d'inhibition.

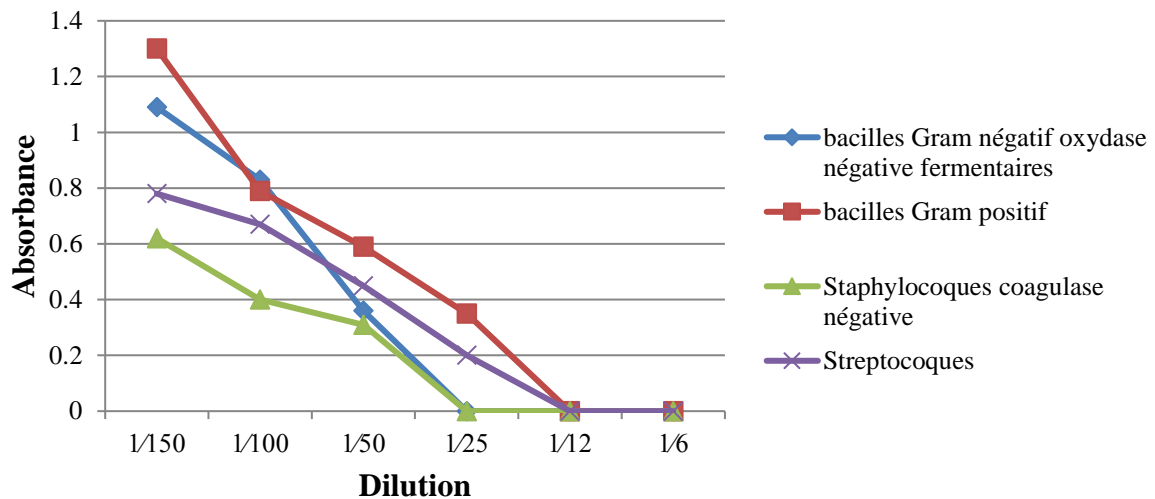


Figure 14: Variation de l'absorbance en fonction des dilutions du désinfectant D1

II.1.2. Temps minimal de contact

Comme présenté dans le tableau 5, l'effet est dépendant du temps et du genre bactérien.

A la dilution de 1/25, l'absorbance s'annule après un temps de contact de 100 min pour les BGN F et les *Staphylococcus* coagulase négative, alors qu'elle ne s'annule pas pour les BGP et les *Streptococcus* même après un contact de 120 min. Elle n'a donc pas été retenue pour la suite des essais.

À 1/12, après 10 min de traitement, aucun effet n'est détecté. Après 60 min de contact, les BGN F et les *Staphylococcus* coagulase négative ont été inhibés, alors que les BGP et les *Streptococcus* ont été inhibés après un temps de contact de 80 min.

A 1/6, le temps de contact diminue, il est de 40 min pour les BGN F et les *Staphylococcus* coagulase négative et de 60 min pour les BGP et les *Streptococcus*.



Tableau 5:Temps minimal de contact du désinfectant D1

Dilution	Temps (min)	BGN	BGP	St.CN	Str
1/25	20	+	+	+	+
	40	+	+	+	+
	60	+	+	+	+
	80	+	+	+	+
	100	-	+	-	+
	120	-	+	-	+
1/12	20	+	+	+	+
	40	+	+	+	+
	60	-	+	-	+
	80	-	-	-	-
	100	-	-	-	-
	120	-	-	-	-
1/6	20	+	+	+	+
	40	-	+	-	+
	60	-	-	-	-
	80	-	-	-	-
	100	-	-	-	-
	120	-	-	-	-

(-) : inhibition de croissance ; (+) : présence de croissance

II.2. Désinfectant D2 à base de formaldéhyde

II.2.1 Dilution minimale d'inhibition

Les résultats relatifs à la dilution minimale du désinfectant D2 sont montrés dans le tableau 6 et en figure 15. Nous avons constaté que le désinfectant D2 a inhibé la croissance des bacilles Gram négatif oxydase négative fermentaires (BGN F) à la dilution 1/50, alors que les BGP, les Staphylocoques coagulase négative et les Streptocoques ont été inhibés à la dilution de 1/25. Ces résultats sont confirmés par l'annulation de l'absorbance aux dilutions cibles.



Tableau 6:Dilution minimale d'inhibition du désinfectant D2

Dilution	BGN F	BGP	St. coagulase négative	<i>Streptococcus sp</i>
1/12	-	-	-	-
1/25	-	-	-	-
1/50	-	+	+	+
1/100	+	+	+	+

(-) : inhibition de croissance ; (+) : présence de croissance

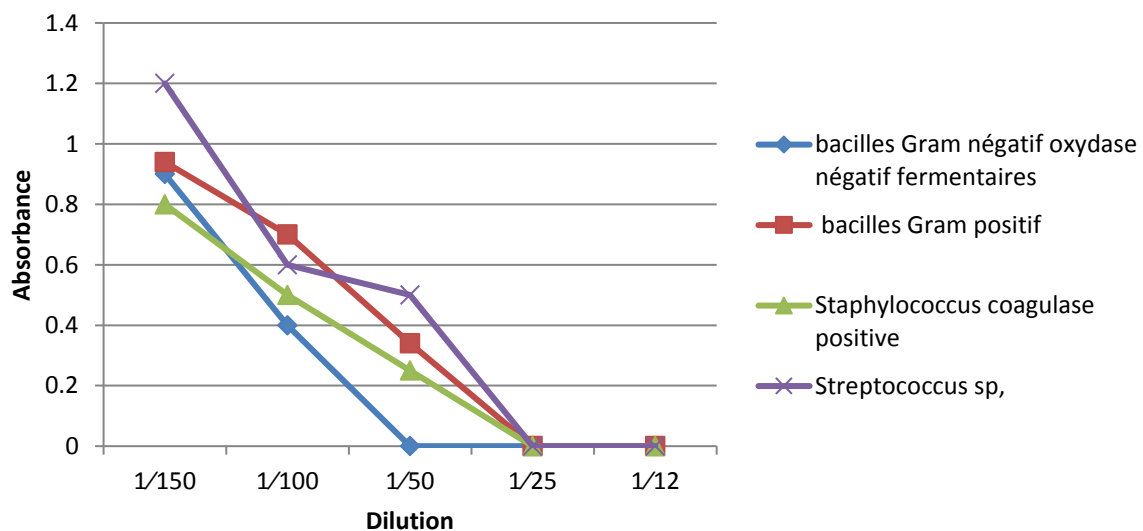


Figure 15:Variation de l'absorbance en fonction des dilution du désinfectant D2

II.2.2. Temps minimal de contact

Comme présenté dans le tableau 7 nous avons noté que le temps de contact varie en fonction de la dilution et du genre bactérien testé.

A la dilution de 1/50, l'absorbance ne s'est annulé après un temps de contact de 100min que pour les BGN F.

À 1/25, le temps de contact est de 40 min pour les BGN F et les *Staphylococcus coagulase négative* et de 60 min pour les BGP et les *Streptococcus*.



Tableau 7:Temps minimal de contact du désinfectant D2

Dilution	Temps (min)	BGN F	BGP	St.CN	Str
1/50	20	+	+	+	+
	40	+	+	+	+
	60	+	+	+	+
	80	+	+	+	+
	100	-	+	+	+
1/25	20	+	+	+	+
	40	-	+	-	+
	60	-	-	-	-
	80	-	-	-	-
	100	-	-	-	-

(-) : inhibition de croissance ; (+) : présence de croissance

III. Résultats relatifs à la validation du protocole de désinfection

Suite aux résultats trouvés concernant l'efficacité des désinfectants D1 et D2, nous avons appliqué la procédure de nettoyage et de désinfection. Une surveillance visuelle et un contrôle microbiologiques ont été réalisés à toutes les étapes. Le tableau suivant montre les moyennes des dénombrements en UFC pour les témoins, le nettoyage et les désinfectants.

Tableau 8:Moyenne des dénombrements en UFC au cours du 5^{ème} et 6^{ème} cycles (48sites contrôlés)

	Témoin	Nettoyage	p	Nettoyage	D1	p	Nettoyage	D2	p
5 ^{ème} cycle	14667±1074,4	12990±1136,9	<0,05	12990±1136,9	12,37±8,65	<0,005	12990±1136,9	5,5±5,32	<0,005
6 ^{ème} cycle	14677,5±894,24	12635±1213,4	<0,05	12635±1213,4	11,93±8,69	<0,005	12635±1213,4	4,87±5,35	<0,005

Au cours du 5^{ème} cycle, la moyenne des dénombrements en UFC pour les témoins est de 14667UFC. En appliquant le nettoyage, la moyenne des dénombrements en UFC est de 12990 UFC, la réduction est de 1677 UFC. L'amélioration notée est nettement significative.



En appliquant le désinfectant D1 précédé d'un nettoyage et à la dilution minimale d'inhibition (1/12), la moyenne des dénombrements en UFC est de 12,37 UFC, la réduction obtenue après l'étape de nettoyage est de 12977,63UFC. Pour le désinfectant D2 dilué au 1/25, la moyenne des dénombrements en UFC notée après l'étape de nettoyage est de 5,5 UFC, la réduction est de 12984,5UFC. La variation pour les deux désinfectants était nettement significative ($P < 0,005$).

Le test de répétabilité réalisé lors du 6^{ème} cycle a montré des résultats similaires à ceux trouvés lors du 5^{ème} cycle. La moyenne des dénombrements en UFC pour les témoins est de 14677,5 UFC. En appliquant le nettoyage, la moyenne des dénombrements en UFC est de 12635 UFC, la réduction est de 2042,5 UFC. L'amélioration notée est nettement significative.

En appliquant le désinfectant D1 précédé d'un nettoyage et à la dilution minimale d'inhibition (1/12), la moyenne des dénombrements en UFC est de 11,93 UFC, la réduction obtenue après l'étape de nettoyage est de 12623,07 UFC. Pour le désinfectant D2 dilué au 1/25, la moyenne des dénombrements en UFC notée après l'étape de nettoyage est de 4,87 UFC, la réduction est de 12630 UFC. La variation pour les deux désinfectants était nettement significative ($P < 0,005$).

IV. Contrôle de l'air

Durant tous les cycles, nous avons mené un contrôle de l'air des deux salles de traitement du centre d'hémodialyse. Le nombre de prélèvements était de 12, répartis en 6 prélèvements dans la salle 1 et 6 prélèvements dans la salle 2.

IV.1. Pourcentage de contamination

Sur les 12 prélèvements réalisés, nous avons noté un pourcentage de contamination de 100%. (Figure 16).

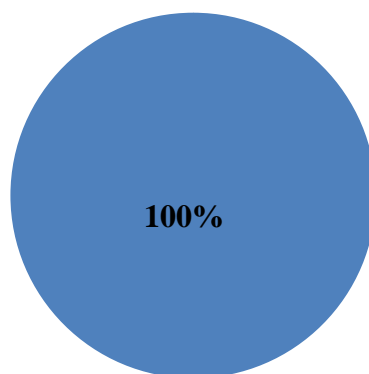


Figure 16: Pourcentage de contamination de l'air



IV.2. Répartition des germes isolés en fonction de la coloration de Gram

L'identification des germes par la coloration de Gram a montré que les cocci à Gram positif ont été les plus fréquents de 65,82 %, les bacilles à Gram positif (BGP) ont été retrouvés à une fréquence de 22,16 % et les bacilles à Gram négatif (BGN) à 12,02 % (figure 17).

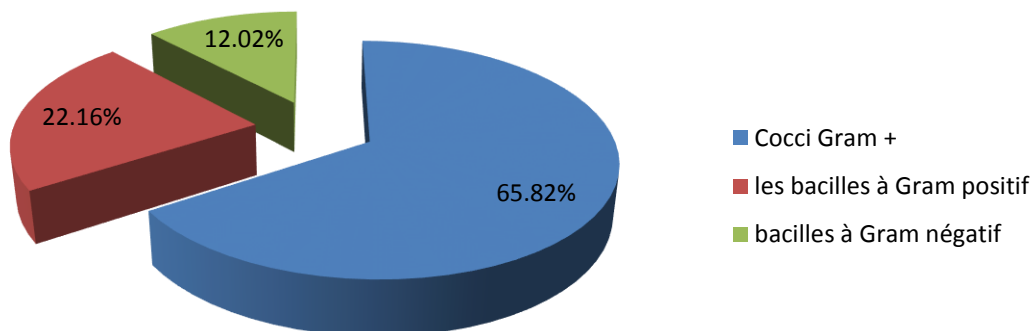


Figure 17: Répartition des bactéries isolées des prélèvements d'air en fonction de la coloration de Gram

IV.3. Distribution globale des bactéries isolées des prélèvements d'air

L'identification biochimique des bactéries isolées a montré la présence de *Staphylococcus* coagulase négative à un pourcentage de 80,62%, de *Bacillus sp*, à un pourcentage de 12,64%, de BGN oxydase négative fermentaire (BGN F) à un pourcentage de 2,5% et de BGN oxydase positive (BGNP) à une fréquence de 4,24% (figure 18).

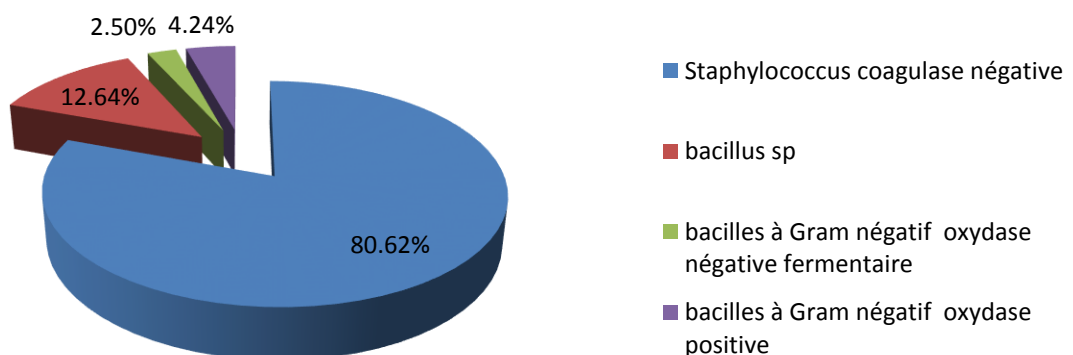


Figure 18: Distribution globale des bactéries isolées des prélèvements de l'air.



DISCUSSION

L'implication directe de l'environnement hospitalier dans la survenue des infections nosocomiales est discutée et reste difficile à évaluer. Certains considèrent que son rôle est négligeable, d'autres pensent au contraire qu'il sert de relais dans les transmissions croisées (**BERRADA et al, 2017**). La réduction de ces infections impose la mise en œuvre d'une maîtrise de l'environnement, ciblée sur des actions simples et pertinentes, et reposant sur le nettoyage et la désinfection quotidienne des locaux, associés à la surveillance microbiologique de l'environnement (**MARGOUD, 2004**).

Dans ce cadre et suite à l'étude menée par **BERRADA (2016)** et qui a montré l'efficacité in vitro de certains désinfectants sur des germes isolés de l'environnement du centre d'hémodialyse, nous avons jugé important d'évaluer l'efficacité de ces désinfectants in situ. Ainsi, nous avons d'abord testé le protocole expérimental, vérifié l'effet du nettoyage, cherché de nouvelles dilutions cibles et le temps minimal de contact, et validé le protocole de désinfection selon les conditions trouvées. Ainsi, 144 points prélevés au niveau des tables par la technique d'écouvillonnage, ont fait l'objet des contrôles réalisés.

Le protocole expérimental testé a montré que tous les points étaient contaminés, soit un taux de contamination maximale (100%). Ce taux est comparable à celui noté par d'autres auteurs. L'étude réalisée à Kénitra, a montré un taux de positivité de l'ordre de 92,85 % (**SAOUIDE EL AYNE et al, 2014**). Celle menée par **BERRADA et al (2017)** au sein de ce centre a révélé un taux de contamination de l'ordre de 96 %. **MEUNIER et al (2005)** ont signalé à Strasbourg un taux de positivité de 87 %. Cependant, **MEITE et al (2010)** ont noté, à Abidjan, un taux de positivité plus faible que celui que nous avons trouvé, soit 46,7 %. Le niveau de contamination varie en effet qualitativement et quantitativement au cours du temps et en fonction des services et des patients **BERRADA (2016)**.

Nous avons aussi noté que la moyenne des dénombrements en UFC pour les témoins est de 14535UFC. Après application du désinfectant D1 non précédé d'un nettoyage et aux conditions trouvées antérieurement (dilution minimale d'inhibition et temps de contact), nous avons noté que la moyenne des dénombrements en UFC est de 14037,5 UFC. La réduction est de 493,5UFC. Pour le désinfectant D2, la moyenne des dénombrements en UFC est de 14062,35UFC, la réduction est de 472,5 UFC. Cependant, la variation pour les deux désinfectants n'était pas significative. L'identification des germes retrouvés a montré la présence de *Staphylococcus* coagulase positive, de *Streptococcus* sp, de bacilles Gram positif (BGP), et de bacilles Gram négatif oxydase négatif fermentaires (BGN F). En outre, nous avons isolé les mêmes genres de bactéries après désinfection aussi bien par le désinfectant



D1 que par le désinfectant D2. Les désinfectants appliqués n'ont pas inhibé la croissance des bactéries.

Par ailleurs, l'application du détergent a montré une amélioration significative. La moyenne des dénombrements en UFC pour les témoins est de 14617UFC, celle après nettoyage est de 13090 UFC. Le nettoyage a permis d'abaisser la charge microbienne initiale, avec une réduction de 1527UFC. Selon **MENARD (1998)**, un nettoyage efficace permet d'abaisser la charge microbienne initiale, d'éliminer les matières organiques et de prévenir la formation de biofilm. Il conjugue l'action physico-chimique du produit et l'action mécanique du brossage et du rinçage.

En appliquant le désinfectant D1 précédé du nettoyage et à la dilution minimale d'inhibition (1/25), la moyenne des dénombrements en UFC est de 12765 UFC, la réduction obtenue après l'étape de nettoyage est de 325UFC. Pour le désinfectant D2 dilué au 1/50, la moyenne des dénombrements en UFC notée après l'étape de nettoyage est de 12424UFC, la réduction est de 666 UFC. La variation pour les deux désinfectants n'était pas significative. En outre, nous avons noté la présence abondante des bactéries d'origine humaine et environnementale telles que *Staphylococcus* coagulase positive, *Streptococcus sp*, les BGP et les BGN F.

Les taux de contamination élevés et la présence abondante de ces bactéries niveau des tables pourraient être liés, d'une part, au manque de respect des précautions standards et à la déficience des mesures d'hygiène soulevée dans l'étude antérieure menée par **BERRADA et al (2017)** et, d'autre part, à l'inefficacité des désinfectants aux conditions testées (soit D1 à la dilution 1/25 et D2 à la dilution 1/50). La diminution de l'efficacité des désinfectants pourrait être principalement due au développement d'une résistance bactérienne et à la génération de biofilms sur les surfaces, favorisée par l'application inappropriée de procédures de nettoyage (**SAOUIDE EL AYNE et al, 2014 ; BERRADA, 2016**).

La résistance bactérienne aux biocides est décrite par plusieurs auteurs, elle peut même être croisée pour des biocides différents et certaines souches peuvent être multi-résistantes aux désinfectants. Des études antérieures montrent que les bactéries peuvent coloniser des biofilms formés en conditions oligotrophes constitués d'espèces bactériennes caractéristiques des surfaces (**ROGERS et al, 1992**).

Suite à ces résultats, nous avons cherché à mettre en place des actions correctives. Ainsi, nous avons vérifié l'efficacité in vitro de ces désinfectants et recherché les dilutions minimales inhibitrices et le temps minimal de contact des désinfectants D1 à base d'ammonium quaternaire et D2 à base de formaldéhyde.

Ainsi, en utilisant la technique en macro méthode préconisée par **SHMITT et al (2009)**, et par comparaison de l'aspect visuel des cultures avec les courbes d'absorbances, nous avons



noté que le désinfectant D1 a inhibé la croissance bactérienne de la totalité des souches testées à la dilution 1/12, alors que pour le désinfectant D2, la dilution était de 1/25. Ces résultats montrent une activité antibactérienne de ces désinfectants à des conditions différentes de celles notées par **BERRADA (2016)**, soit 1/25 pour D1 et 1/50 pour D2. Les résultats trouvés s'éloignent de ceux trouvés par **ROUILLON et al en 2006**. Ces auteurs avaient noté que le désinfectant D1 était efficace même à une dilution de 1/200.

La détermination du temps minimal d'inhibition (TMI) ou temps minimal de contact, a révélé que ce temps a varié d'une souche à l'autre et d'une dilution à l'autre. Le temps de contact minimal était de 40 min pour les BGN F et les *Staphylococcus* coagulase négative et de 60 min pour les BGP et les *Streptococcus* pour les deux désinfectants D1 et D2, à des dilutions respectives de 1/6 et 1/25.

La validation du protocole de désinfection a été vérifiée par application de la procédure de nettoyage et utilisation des désinfectants aux conditions trouvées, soit D1 à la dilution 1/12 et à un temps de contact de 80 min, et D2 à la dilution 1/25 et au temps de contact de 60 min. Les résultats ont montré une efficacité élevée, la réduction de la charge microbienne initiale était 12977,63UFC pour le désinfectant D1 et de 12984,5UFC. La variation pour les deux désinfectants était nettement significative ($P < 0,005$). Par ailleurs, ces résultats étaient approuvés par le test de répétabilité. Ainsi, en plus de la réduction de 3 décimales logarithmiques, le test de répétabilité était approuvé et une nette propreté visuelle était constatée.

L'efficacité des désinfectants D1 à base d'ammonium quaternaire et celle de D2 à base de formaldéhyde est prouvée par d'autres auteurs. D'après **MASSICOTTE (2009)**, les ammoniums quaternaires sont des tensio-actifs cationiques qui s'attaquent aux surfaces, entraînant une modification de la perméabilité membranaire des bactéries et en se fixant sur les groupements chargés négativement à la surface de la cellule bactérienne. Selon leur concentration, on peut obtenir un effet bactériostatique (rémanence) avec une faible concentration et un effet bactéricide avec une forte concentration. Selon **LAWIN (2016)**, les aldéhydes y compris le formaldéhyde sont bactéricides à des concentrations élevées sur les bactéries. On leur attribue également des qualités de fongicide, de virucide, de mycobactéricide et de sporidie, ils sont des agents réducteurs qui réagissent avec les acides nucléiques et les groupements amines des protéines de structure et de fonction. Ils dénaturent les glycoprotéines de surface, inhibent les fonctions enzymatiques et nucléiques des cellules

Comme la qualité de l'air intérieur dans les établissements de santé est devenue une préoccupation croissante, résultant de l'évolution des pratiques de soin et de la présence de personnes fragiles (**Guide, 2005**), son contrôle microbiologique a montré un taux de positivité maximal, causé dans la totalité des prélèvements analysés par une contamination bactérienne.



DRS

L'identification des germes retrouvés a montré présence de *Staphylococcus* coagulase négative à un pourcentage de 80,62%, de *Bacillus sp*, à un pourcentage de 12,64%, de BGN oxydase négative fermentaire (BGN F) à un pourcentage de 2,5% et de BGN oxydase positive (BGNP) à une fréquence de 4,24%.

Le niveau de contamination élevé a été rapporté par d'autres auteurs (**El KHADIR, 2011 ; TOUIJER, 2014, BERRADA, 2016**). Cependant, cette contamination ne présenterait pas un problème en soi si les contaminants resteraient en permanence dans l'air, vecteur de transmission, et serait un risque réel si les contaminants se déposeraient sur les surfaces (**BARILLER. 1998 ; COMBET, 2009**)



CONCLUSIONS, RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES

Au terme de ce travail, nous pouvons conclure que :

- ✚ Lors du test du protocole expérimental, nous avons noté que :
 - La moyenne des dénombrements en UFC pour les témoins est de 14617UFC ;
 - Après nettoyage, la moyenne des dénombrements en UFC est de 13090 UFC, la réduction est de 1527UFC ;
 - L'application du Désinfectant D1 précédé d'un nettoyage et à la dilution minimale d'inhibition (1/25), la moyenne des dénombrements en UFC est de 12765 UFC la réduction est de 325UFC ;
 - L'usage du désinfectant D2 dilué au 1/50 après nettoyage, a montré une moyenne des dénombrements en UFC de 12424UFC, la réduction est de 666 UFC.
 - Les bactéries isolées de la surface des points contrôlés sont les *Staphylococcus* coagulase positive, les *Streptococcus sp*, les bacilles Gram positif (BGP), et les bacilles Gram négatif oxydase négatif fermentaires (BGN F).

- ✚ Lors de la validation du protocole de désinfection de surface, nous avons noté :
 - Une efficacité très importante du désinfectant D1, la moyenne des dénombrements en UFC est de 11,93 UFC, la réduction obtenue après l'étape de nettoyage est de 12623,07 UFC, avec une dilution minimale d'inhibition de 1/12 et un temps de contact minimal de 80 min.
 - Une forte action du désinfectant D2, la moyenne des dénombrements en UFC notée après l'étape de nettoyage est de 4,87 UFC, la réduction est de 12630, avec une dilution minimal de 1/25 et un temps de contact minimal de 60min pour la quasi-totalité des genres bactériens.

- ✚ Le contrôle de l'air a révélé :
 - Tous les points d'air ambiant des salles étaient contaminés, soit un pourcentage de 100% ;
 - Les cocci à Gram positif ont été les plus fréquents retrouvés, soit une fréquence de 65,82 %, les bacilles à Gram positif (BGP) avec une fréquence de 22,16 % et les bacilles à Gram négatif (BGN) à 12,02 %.

Ainsi nous suggérons les recommandations suivantes:

- Le respect de l'alternance des désinfectants,



- La sensibilisation du personnel sur l'importance du respect de la procédure et du protocole de la désinfection,
- Le renforcement de la formation du personnel en hygiène;
- La dissociation des opérations de nettoyage et de désinfection,

- L'utilisation d'une eau de rinçage de bonne qualité microbiologique,
- L'accès limité des personnes étrangères dans les salles d'hémodialyse,
- La qualification du personnel chargé de la désinfection,
- L'évaluation des actions correctives mises en place,
- La traçabilité de toutes les actions

Suite à ce travail, il serait intéressant de :

- Evaluer l'action antibactérienne des antibiotiques sur les germes retrouvés,
- Mener une étude permettant de rechercher les gènes de résistance des souches isolées;
- Mesurer l'efficacité de l'association et de la synergie des désinfectants ;
- Etudier l'effet des facteurs pouvant d'amplifier l'action antimicrobienne des désinfectants ;
- Rechercher de nouvelles molécules chimiques bioactives ayant un pouvoir antimicrobien.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADNET F, 2005.** Roche Y. Maîtrise de l'environnement d'un service d'hémodialyse : mise en place, traçabilité et évaluation du bionettoyage. *Echanges de l'AfiDTN*;71:46—9.
- ALFORT, 2009,** Risques sanitaires liés à la présence de formaldéhyde, avis de l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail, Saisine Afsset n°2004/016
- ALLION, 2004.** Environnement des bactéries et sensibilité aux biocides : Mise au point d'une technique rapide pour déterminer in situ l'efficacité bactéricide d'agents antimicrobiens, pour obtenir le grade de Docteur de l'ENSA, Ecole Doctorale Agriculture Biologie et Santé.
- AMRANI J. ,1994 .**Résultats de l'enquête de prévalence des infections nosocomiales au niveau de 24 hôpitaux. Rabat, Ministère de la Santé,
- ANSES, MARS 2014.** Suivi de la réalisation et de l'efficacité des opérations de nettoyage et désinfection des surfaces, des matériels et des locaux, Fiche-outil pour un guide des bonnes pratiques d'hygiène ,
- BARICAULT A, 2015.**Validation de nettoyage dans l'industrie pharmaceutique: cas pratique d'un projet de changement d'agent de nettoyage, thèse pour l'obtention du diplôme d'état de docteur en pharmacie.
- BARILLER. J., 1998** Surveillance et validation des opérations de nettoyage et de désinfection. « Nettoyage et désinfection dans les entreprises alimentaires ». Asept éditeur, Paris, 221-232
- BAUDIN C. L. F., 2012.** Prévention des infections nosocomiales au centre hospitalier universitaire vétérinaire d'ALFORT : Étude bibliographique, évaluation expérimentale de l'hygiène des mains et rédaction de recommandations concernant l'hygiène des mains
- BECHINA Z., ASSAMI H., 2014.** Généralités sur les Infections Nosocomiales. thèse de magistère en microbiologie, Université Hadj Moktar, Annaba.
- BEN AMAR B., HELLOU B., LAHICI M et KHIAT A., 1998.** Hygiène hospitalière; Ed : comité national de formation en hygiène hospitalière, ORAN, 69p.
- BENSAID F., 2016.** Contrôle qualité de l'unité centrale de préparation de chimiothérapie cas de l'institut national d'oncologie Rabat, Thèse Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie, THESE N° : 46. Faculté de médecine et de pharmacie-Rabat.
- BERGHMANS L, 2006.** Recommandations de biosécurité relatives au traitement et aux méthodes d'inactivation des déchets biologiques contaminés.



BERRADA S. 2016, Gestion du risque infectieux en hémodialyse par la mise en place d'une démarche qualité : cas du centre d'hémodialyse de l'hôpital EL GHASSANI .Thèse de doctorat .Faculté des sciences Dhar EL Mehrez Fes.

BERRADA S., BENJELLOUN TG., BENNANI L., DIARRA A.S., OUMOKHTAR B., EL OUALI L.A., SQUALI H.F.Z., SQALLI H.T, 2017. Exploration microbiologique des surfaces d'un centre d'hémodialyse de la ville de Fès : étude descriptive transversale. Revue francophone internationale de recherche infirmière. Sous presse.

BILLAST N., DUFFET A., DUMARTIN C., FELDMAN P., FOSSE POURRIER C., RICON.G, ROBIQUET.A, SOUMAH A. ; Mai 2000. Antiseptiques et désinfectants. Centre de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales de l'inter région Paris-Nord.

BINDER , Méthodes de contrôle des processus de nettoyage, de désinfection et de stérilisation , Sterilgut-, Logistik-, Instrument en management, Wels (Autriche),4p.

BOUAZIZ S, RAMDANE A ,2005. Contrôle de l'état général d'hygiène Au niveau de service des urgences de L'hôpital de Med Boudiaf. Mémoire du Diplôme des Etudes Supérieures en Biologie ; Université kasdi Merbah -Ouargla Faculté des Sciences et Sciences de l'Ingénieur.

BOUTELDJA, 2011, Supports de cours : Hygiène Hospitalière / Antiseptiques ,3-10p

BOYE CS, SOW, 2010. AI. Les infections nosocomiales : principaux agents responsables.1-9p

BRANGER M, 2014. Démarche qualité en hématologie : application à la maîtrise du processus analytique de la numération formule sanguine, Décret n° 2012-172.

BRUNBUISSON ,2015. Hygiène et Infections Nosocomiales, Méd Mal Infect, 26,53-62 .

CAPP-INFO, N°46, juin 2007. Bulletin d'information du CAPP (Contact Avis

Pharmacologique et Pharmaceutique

CCLIN SUD-OUEST, novembre 1998. Contrôles microbiologiques en hygiène hospitalière, conseils pratiques.

C.CLIN, MAI 2000. Antiseptiques et désinfectants, Paris-Nord.

CCLIN 2010. LOZNIIEWSKI A., RABAUD C. Résistance bactérienne aux antibiotiques, Sud-Est, Nancy.

CHAMOUNE, 2009. Infectieux - Le risque d'infections nosocomiales en réanimation, Etudiante infirmière en 3ème année. Présentation de la formation · TFE - Travail de fin d'étude · DE - Diplôme d'Etat · Initiatives et projets · Archives programme.

COMBET M, 2009. Salles propres à l'hôpital : un historique. Salles propres et maîtrise de la contamination, 05(61) : 15-19.



CONTE L., 2003. Validation des procédés de nettoyage ~ application à un cas concret dans l'industrie pharmaceutique, pour obtenir le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, BP 403, 54001 NANCY Cedex, France.

DALI A. AB., 2015. Infection nosocomiale à bactéries multi résistantes en réanimation adulte à l'EHUO : profil épidémiologie, facteurs de risque et facteurs pronostiques, UNIVERSITE D'ORAN Ahmed BENBELLA.

DEVILLIERS C., 2011. Dégradation chimique du PE et influence sur le comportement, l'endommagement et la rupture en fluage : Application à la durabilité d'une canalisation sous pression. PARIS TCHEC Institut des sciences et technologies École doctorale n° 432 : Sciences des Métiers de l'Ingénieur.

DIDOUH N, 2015, Caractérisation de spores de Bacillus cereus isolées d'équipements laitiers, capacité de formation de biofilm et résistance aux procédés de nettoyage et de désinfection , Thèse de Doctorat en Biologie Moléculaire et biochimie Option : Maitrise du Développement Microbien ; UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMCEN .

DUCRUET L, 2010. Bon usage des désinfectants. Saint Genis Laval.

DUMARTIN C. 2011, Risques infectieux en hémodialyse. Formation FELIN. France: CCLIN Sud-Ouest.

EL KHADIR M. 2011. Surveillance microbiologique des surfaces de l'hôpital Ibn El Khateb de Fès. Mémoire de master en biologie. Fès (Maroc): Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, faculté des sciences et techniques;

EL RHAZI K, ELFAKIR S, BERRAHO M, TACHFOUTI N, SERHIER Z, KANJAA C, 2007. Prévalence et facteurs de risque des infection au CHU Hassan II de Fès (Maroc). Rev Sante Mediterr Orient, 56-63 .

FABRY J, 2005. Revue officielle de la Société Française d'Hygiène Hospitalière, Université Claude-Bernard

FONG D., BARN P., 2012. Nettoyage, désinfection et stérilisation dans les établissements de services personnels, Centre de collaboration nationale en santé environnementale.

GARRY, Septembre 2011. Validation des opérations de nettoyage et désinfection en IAA, Process propre agro-alimentaire, Salles Propres n° 0075

GELLER C, 2010. Développement d'une méthode originale pour l'évaluation de l'activité virucide des antiseptiques – désinfectants

GOULLET D, LYON, 2004 .PR désinfection, désinfection et stérilisation des dispositifs médicaux du matériel hôtelier : organisation générale, CCLIN.



Guide. 2005. La qualité l'air intérieur dans les établissements du réseau de la santé et des services sociaux. Québec..

HADDADI A, 2013. Construction d'un score prédictif du risque nosocomial pour des patients de réanimation, Spécialité ÉPIDÉMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTÉ ET PRÉVENTION, THÈSE Pour obtenir le grade de DOCTEUR De L'UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE - LILLE

KAHRS R.F., 1995, Principes généraux de la désinfection ; Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., ,14 (1), 123-142

KARKAR, BOUHAHA MB, DAMMANG ML, 2014. Infection control in hemodialysis nits : a quick access to essential elements .Saidi J kidney Dis Transplant 496-519.

KASTENHUBER H, 1991. - Physical factors influencing the activity of antimicrobial agents. In Disinfection, sterilization, and preservation, Lea & Febiger, Philadelphie & Londres

KHORMAN AB, 2014. Validation de la méthode de nettoyage NEP au sein du domaine agricole.

KONE, 2009-2010. Etude des infections nosocomiales dans le service de traumatologie et chirurgie orthopédique du chu gt. Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie ; UNIVERSITE DE BAMAKO.

LANTERO C., 2016. Infections Nosocomiales, Conférences en droit public à l'Université d'Auvergne – associée cabinet JudisConseil ; Intervention au sein du Café des juristes ;2-8p.

LAWIN, 2016. Choix des désinfectants à l'hôpital : expérience du bloc opératoire central, Faculte de medecine et de pharmacie ; UNIVERSITE MOHAMMED V –RABAT ; pour l'obtention du doctorat en pharmacie, thèse N:127

LEDOUX CHLOE, 2014. Analyse de risques appliquée à la validation du nettoyage des équipements de fabrication de médicaments aérosols ; Thèse de diplôme d'états de docteur en pharmacie ; UNIVERSITE DE ROUEN.

LE ROUX, 2013. Efficacité des opération de Nettoyage et désinfection dossier technique « nettoyage et désinfection » , dans le cadre de l'action collective, CRITT Agroalimentaire PACA

MANGO, 2005. Etude de l'efficacité de procédures de nettoyage et de désinfection des surfaces dans une unité de transformation laitière artisanale : cas G.I.E De NGUEKOKH. Mémoire de diplôme d'étude approfondies de productions animales UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR, faculté des Sciences et Technique ; N°7.

MARGOUD L. ; 2004. Etude bactériologique des bactéries isolées en milieu hospitalier, thèse de magistère en microbiologie de l'environnement, Université Hadj Mokhtar, Annaba



MASSICOTTE R., 2009. PH. D. Environnement. Désinfectants et désinfection en hygiène et salubrité: principes fondamentaux. Santé et services sociaux. Québec

MCHICH A., 2002. Les infections nosocomiales à propos de 55 CAS COLLIGES AU MAROC, thèse pour obtenir le grade de docteur en pharmacie UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR, N :40.

MENARD J., 1998. Guide de bonnes pratiques de désinfection des dispositifs médicaux ; comité Technique National des infections nosocomiales, Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, section prophylaxie des maladies transmissibles.

MEUNIER O, HERNANDEZ C, PIROIRD M, HEILIG R, STEINBACH D, FREYD A 2005. Prélèvements bactériologiques des surfaces : importance de l'étape d'enrichissement et du choix des milieux de culture. Ann Biol Clin;63(5):481—6.

MEITE S, BONI-CISSE C, MONEMO P, MLANTANOA AP, FAYE-KETTE H, DOSSO H 2010. Surveillance microbiologique des surfaces au niveau d'un établissement hospitalier de niveau tertiaire : exemple du CHU de Yopougon (Abidjan, Côte d'Ivoire). J Sci Pharm Biol ; 11(1):73—81.

MOURNA H, 2010. Validation de nettoyage des équipements de production des formes pâteuses, THÈSE En vue de l'obtention du DOCTORAT en PHARMACIE, Thèse N :39, UNIVERSITE MOHAMMED V FACULTE DE MEDICINE ET PHARMACIE –RABAT

MICHEL, MONTAGNE, 2007, ENTRETIEN ET NETTOYAGE, CEMEA Groupe National Gestion Accueil MIS J. ; 2003. Hygiène hospitalière et infections nosocomiales, Ed : Formus Blouse brothers, 11p

NETO V, 2007. Nouvelles méthodes d'élaboration de tensioactifs glycosylés par métathèse croisée et cycloaddition 1,3-dipolaire.

OMS, 2008. Prévention des infections nosocomiales, Guide pratique, 2e édition

OMS, 2009. Manuel D'hygiène Hospitalière Et De Prévention Des Infections Nosocomiales. Royaume du Maroc Ministère de la Santé.

OMS, 2014. Les infections nosocomiales, véritable problème de santé à travers le monde l'OMS recommande plus de vigilance

PARENTEA, 1997. Application de l'absorptiométrie UV multi-longueurs d'onde au dosage des détergents anioniques dans les eaux naturelles et résiduaires ; MÉMOIRE PRÉSENTÉ À L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES.

POROT V., 1987. LES DÉTERGENTS NON-IONIQUES DANS LES STATIONS D'ÉPURATION, DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT ET, DES RECHERCHES Océaniques, Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer, 4-7p



QASSIMI L, 2010. Épidémiologie des infections nosocomiales en milieu de réanimation Thèse N° 040/10, UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE.

QUEBEC, 2008. Guide d'échantillonnage à des fins d'analyses environnementales: Cahier – Généralités, Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, 29 29p.

REMEDE, 2003, HYGIÈNE HOSPITALIÈRE ET INFECTIONS NOSOCOMIALES

ROGERS J., DOWSETT A.B., DENNIS P.J., LEE J.V., KEEVIL C.W.1992. Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of Legionella pneumophila in a model potable water system containing complex microbial flora. Appl Environ Microbiol 60 (5): 1585-92

ROUILLON S, OURDANABIA S, JAMART S, HERNANDEZ C, MEUNIER O. 2006. Étude de l'efficacité d'un produit détergent désinfectant pour sols et surfaces sur les souches bactériennes isolées à partir de l'environnement hospitalier. Pathol Biol; 54(6):325—30.

RUSSELL A.D, 1991. Principles of Antimicrobial Activity In Disinfection, Sterilization and Preservation.

SALVAT G. ET COLIN P. ,1995. Le nettoyage et la désinfection dans les industries de la viande en Europe. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 14 (2), 313-327

SAOUIDE EL AYNE N, ECHCHELH A, CHAOUCH A, AUJJAR N, HAMAMA S, SOULAYMANI A2014. Rôle de l'environnement hospitalier dans la prévention des infections nosocomiales : Surveillance de la flore des surfaces à l'hôpital EL Idrissi de Kénitra (Maroc). Eur Sci J;10(9):238—47.

SCHMITT A, GLASSER N, STAINBACH D, MEUNIER O. 2009, Études expérimentales de l'effet rémanent d'un détergent désinfectant pour surfaces sur une souche d'Escherichia coli. Pathol Biol ; 57(6):463—9.

SOW, 2003, efficacité du nettoyage et de la désinfection du matériel et des ~ surfaces de production dans l'industrie de traitement de poissons: -cas de Sénégal pêche ; MEMOIRE DE DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES DE PRODUCTIONS ANIMALES PRESENTE ; UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR ;N°6

TALON D. 1999. The role of the hospital environment in the epidemiology of multi-resistant bacteria. J Hosp Infect 43(1):13—7.



TERTRAISE K ., 2003. Validation du nettoyage et de la décontamination d'un mélangeur OLASA 1000, Thèse de diplôme d'états de docteur en pharmacie UNIVERSITE DE NANTES FACULTE DE PHARMACIE.

TENNSTEST. D, 2008. Pathologies induites par les ammoniums quaternaires : de la maison au travail Pathologies dermatologiques. Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique 48, 246–248;

TOUIJER H, 2014. Prévention des infections nosocomiales : écologie bactérienne en milieu hospitalier et sensibilité aux antibiotiques et aux désinfectants. Mémoire de master en biologie. Fès (Maroc): Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, faculté des sciences Dhar Mehraz;

VENANT, 2008. Centre hospitalier de somain, Désinfectoguide, IDE référente en Hygiène.

VERDIER T, 2015. Élaboration de revêtements pour matériaux de construction visant à lutter contre la prolifération microbienne à l'intérieur des bâtiments : efficacité et mode d'action, THÈSE En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE, Délivré par : l'Université Toulouse III - Paul Sabatier.

VINCENT A, LAPRUGNE-GARCIA E, OCTOBRE 2008. Infections associées aux soins définition, fréquence et facteurs de risque Saint Genis Laval.

ZEROUAL Z, Janvier 2010. Profil épidémiologique et bactériologique des infections nosocomiales, à propos d'une Enquête de prévalence des infections nosocomiales du CHU Ibn Sina de Rabat.

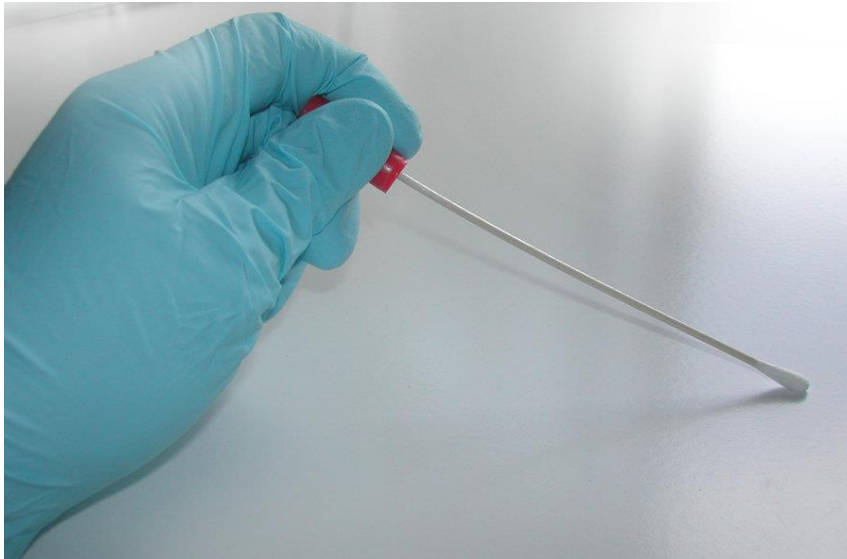
ZERROUK H, 2013. Évaluation de l'implantation du comité de lutte contre les infections nosocomiales au niveau du centre hospitalier régional El Idrissi de Kenitra, mastère en administration sanitaire et sante publique, centre collaborateur de l'OMS.



ANNEXES

Annexe1: Prélèvement de surface

Effectuer des stries parallèles rapprochées, et faire tourner légèrement dans le même point en stries perpendiculaires aux premiers et sur une surface de 25 cm², la même opération est répétée quatre fois sur d'autres surfaces du même point de prélèvement.



Annexe2: Prélèvement d'air

Laisser exposer une boîte du milieu PCA pendant 16 min dans une surface de 1m².





Annexe 3: Composition et contrôle des milieux de cultures et des réactifs

1- Composition

Les formules de chaque milieu sont données en gramme par litre d'eau distillée.

Les milieux autoclavables sont stérilisés après leur préparation à l'autoclave à $121 \pm 3^\circ\text{C}$ pendant 20 min.

Les réactifs sont commercialisés et sont contrôlés à la réception via des souches positives et négatives.

- **Base de la Gélose au sang**

Mélange spécial de peptones 23,0

Amidon 1,0 g

Chlorure de sodium 5,0

Agar 10,0

pH = 7,3

- **Milieu BHI(DIFCO)**

Infusion de cervelle de veau: 12,5

Infusion de coeur de boeuf : 5

Protéose-peptone : 10

Glucose: 2

Chlorure de sodium:5

Phosphate disodique: 2,5

- **Milieu PCA: milieu autoclavable, composé de:**

Tryptone: 5.000

Extrait au tolytique de levure: 2.500

Glucose : 1.000

Agar agar bactériologique: 12.000

pH =7 +/-0.2

- **Milieu Lactose-glucose- H_2S (Kligler-Hajna) :**

Pastone : 15

Extrait de viande de bœuf : 3

Extrait de levure : 3

Peptone pepsique de viande : 5

Chlorure de sodium : 5

Sulfate ferreux : 0.2

Thiosulfate de sodium : 0.3

Lactose : 10

Glucose : 1

Rouge de phénol : 0.024

Agar : 11

pH final : 7.5 ± 0.2 .



- **Milieu Cetrimide Agar :**

Peptone pancréatique de gélatine : 20.000

Cetrimide : 0.300

Chlorure de magnésium : 1.400

Sulfate de potassium : 10.000

Agar agar bactériologique : 15.000

Agar Agar bactériologique : 13.000

- **Milieu Chapman mannité :**

Peptone bactériologique : 10

Extrait de viande de boeuf : 1

Chlorure de sodium : 75

Mannitol : 10

Rouge de phénol : 0.025

Agar : 15

- **Kit Gram :**

Violet de gentiane phéniqué.

Solution iodo-ioduré (lugol).

Solution alcool-acétone.

Solution de fuchsine de ziehl diluée.

- **Plasma de lapin :**

Peptone de viande : 4

Peptone de gélatine : 1

Extrait de viande : 2

Chlorure de sodium : 5

pH final : 7.0±0.2.

- **Kovacs :**

Alcool amylique ou isoamylique : 150ml

P-diméthylamino-benzaldéhyde : 10g

HCl concentré : 10ml

- **Milieu Urée-Indole :**

L-Tryptophane : 0.3g

KH₂PO₄ : 0.1g

KHPO₄ : 0.1g

NaCl : 0.5g

Urée : 2g

Alcool à 95° : 1ml

Rouge de phénol à 1% : 0.25ml



Eau distillée : 100ml

- **Milieu Slanetz**

Tryptose	20g
Extrait de levure	5g
Glucose	2g
Phosphate disodique	4g
Azide de sodium	0.4g
Chlorure de tetrazolium TTC	0.1g
Agar	14g

- **Milieu BEA**

Peptone tryptique	17g
Peptone pepsique de viande	3g
Extrait de levure	5g
Bile de bœuf déshydraté	10g
Chlorure de sodium	5g
Citrate de sodium	1g
Esculine	1g
Citrate de fer ammoniacal	0.5g
Azide de sodium	0.25g
Agar	13g

Afin d'avoir des résultats fiables, nous avons procédé à un contrôle qualité de tous les paramètres (milieux de cultures, mesure Température des étuves et des réfrigérateurs, contrôle de la qualité de la verrerie et du consommable utilisé).

2. Contrôles qualité des milieux de cultures

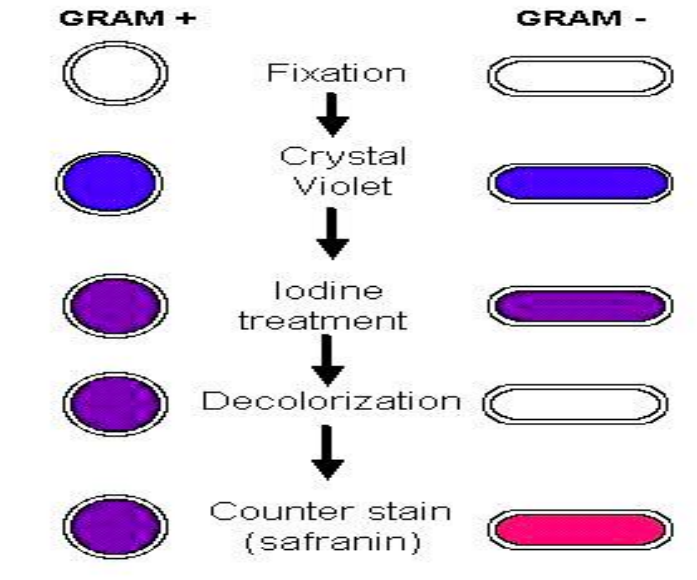
Ce contrôle est basé sur les manipulations suivantes :

- Effectuer un calibrage de la balance,
- Utiliser une eau distillée préalablement contrôlée (pH, conductivité, ...),
- Préparer les milieux de cultures dans un champ stérile, à côté d'un bec benzène,
- Utiliser une verrerie contrôlée,
- Dissoudre complètement les composants du milieu préparé,
- Respecter la durée et le temps d'autoclavage,
- Contrôler le niveau d'eau de l'autoclave avant utilisation,
- Contrôler l'efficacité de l'autoclave à chaque stérilisation par le ruban indicateur et mensuellement par l'indicateur biologique (Stérikon),
- Couler les milieux stérilisés dans un champ stérile,
- Contrôler la stérilité du milieu préparé avant utilisation, par incubation d'une boîte si milieu solide ou d'un tube si bouillon à l'étude à $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 48H.

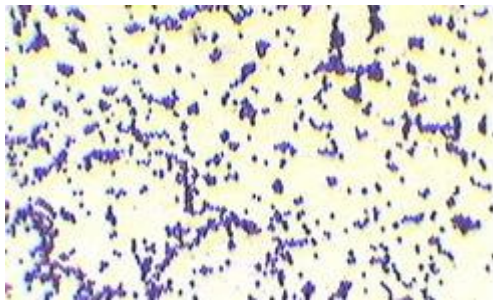


Annexe 4 : Identification bactériologique :

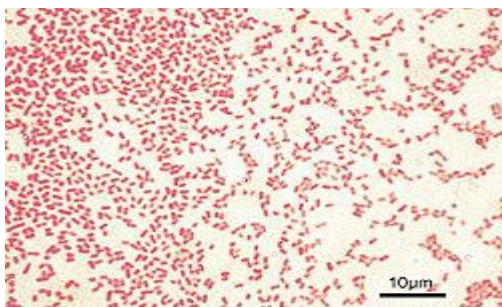
1- Les étapes de la coloration de Gram :



2- Observation microscopique après la coloration de Gram



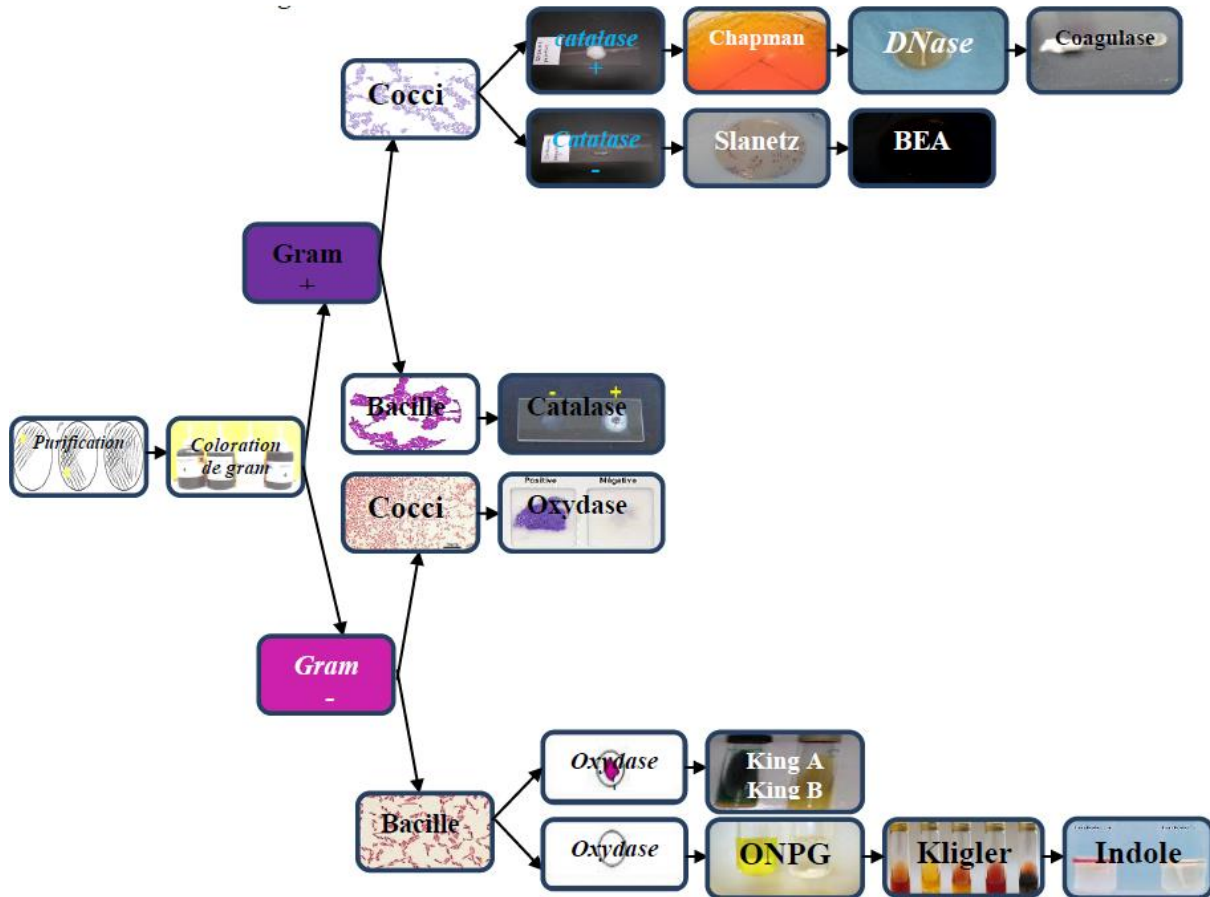
Vue microscopique de cocci Gram positif



Vue microscopique de cocci gram négatif



Annexe 5: Identification biochimique et lecture des résultats
 1. Schéma générale d'identification



Annexe 6 : Identification biochimique et lecture des résultats

1. Test d'oxydase :

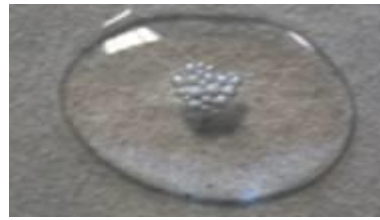


Test d'oxydase négatif



Test d'oxydase positif

2. Test de la catalase :



Test catalase positif

3. Test d'ONPG :



Test ONPG négatif



Test ONPG positif

4. Test Uréase



Test Uréase négatif



Test Uréase positif

5. Test indole



Test indole négatif

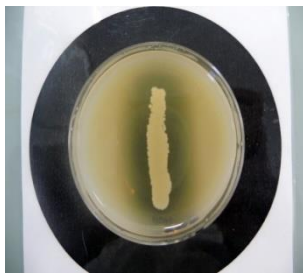


Test indole positif

6. Test DNase



Test DNase négatif



Test DNase positif

7. Test de fermentation



Milieu hajna kligler avant fermentation



Milieu hajna kligler après fermentation du glucose et du lactose

8. Test coagulase



Aspect du plasma de lapin avant utilisation



Aspect du test positif