



Evaluation de l'effet d'un désinfectant à base de Glutaraldehyde à 2 % sur le biofilm d'Acinetobacter baumannii

Evaluation of the effect of a disinfectant based on Glutaraldehyde 2% on Acinetobacter baumannii biofilm

R. Amiyare¹, A. Esmail¹, Y. Ghanmi², M. Ouhssine¹

¹ *Laboratoire de Biotechnologie, Environnement et Qualité, Département de Biologie, Université Ibn Tofaïl, Faculté des Sciences, 14000 Kenitra, Maroc.*

² *Laboratoire de Bactériologie moléculaire, Institut Pasteur, Casablanca, Maroc*

Received 03 Jul 2015, Revised 08 Nov 2015, Accepted 27 Nov 2015

* Corresponding Author: Email: rajaa-marah@hotmail.fr;

Abstract

Biofilms are an important factor in resistance to disinfectants, they are difficult to eliminate and are a major source of hospital infection. In the present work, we studied the anti-biofilm effect of a disinfectant based on glutaraldehyde 2% on a strain of *Acinetobacter baumannii* (AB), which is one of the most incriminated bacteria in nosocomial infections in the intensive care unit of the hospital EL idrissi in Kenitra in Morocco. To do this the nature of the adhesion surface and the disinfectant action time have been investigated, we used a method based on the formation of bacterial biofilm on microplates. The total biomass of biofilm was quantified by measuring the optical density (OD) at 630 nm by an ELISA reader. We conclude that (i) the AB biofilm forms on any type of surface, hence the need to develop non-stick and antibacterial materials; (ii) the choice of disinfectant and the time of action are important in eradicating biofilms; (iii) the resistance of biofilms to disinfectant agents must be taken into account when setting the cleaning procedure.

Keywords: Biofilms , *Acinetobacter baumannii*, nosocomial infections, Glutaraldéhyde 2%

Résumé

Les Biofilms constituent un facteur non négligeable dans la résistance aux désinfectants, ils sont difficiles à éliminer et constituent une source majeure d'infection hospitalière. Dans le présent travail, nous avons étudié l'effet anti-biofilm d'un désinfectant à base de Glutaraldéhyde à 2% sur une souche d'*Acinetobacter baumannii* (AB), qui est l'une des bactéries les plus incriminées dans les infections nosocomiales au sein du service de réanimation de l'hôpital EL idrissi à Kénitra au Maroc. Pour cela la nature de la surface d'adhésion ainsi que le temps d'action du désinfectant ont été étudiés, nous avons utilisé une méthode basée sur la formation du biofilm bactérien en microplaque. La biomasse totale des biofilms a été quantifiée par la mesure de la densité optique (DO) à 630 nm par un lecteur Elisa. Nous avons conclu que (i) le biofilm d'AB se forme sur n'importe quel type de surface d'où la nécessité d'élaborer des matériaux antiadhésifs et antibactériens ; (ii) le choix du désinfectant et le temps d'action sont importants lors de l'éradication des biofilms ; (iii) les résistances des biofilms aux agents désinfectants doivent être pris en compte lors de l'établissement de la procédure de nettoyage.

Mots clés : Biofilms, *Acinetobacter baumannii*, infections nosocomiales, Glutaraldéhyde à 2%

1. Introduction

Les biofilms bactériens sont des amas structurés de cellules bactériennes enrobés d'une matrice polymérique et attachés à une surface. Le biofilm protège les bactéries et leur permet de survivre dans des conditions environnementales hostiles. La formation de biofilm chez les bactéries hospitalières est un sujet relativement peu étudié [1]. La capacité de former un biofilm est maintenant reconnue comme une caractéristique propre à plusieurs microorganismes [2]. On estime d'ailleurs que 80 % de la biomasse microbienne de notre planète réside sous forme d'un biofilm [3]. De plus, les bactéries d'un biofilm sont généralement moins sensibles aux antibiotiques et aux désinfectants que ces mêmes bactéries sous forme planctonique. En fait, les bactéries d'un biofilm peuvent être de 10 à 1000 fois plus résistantes aux agents antimicrobiens [4]. Ils peuvent se former sur les implants médicaux, comme les cathéters veineux ou encore les sondes urinaires, et être à l'origine d'infections nosocomiales souvent difficiles à éradiquer [5].

C'est dans ce but que nous avons voulu évaluer l'effet d'un désinfectant à base de Glutaraldéhyde 2% sur l'éradication du biofilm d'AB

2. Matériel et méthode

La souche que nous avons choisie pour réaliser cette étude est *Acinetobacter baumannii* (AB), elle est largement impliquée dans les infections nosocomiales bactériennes au sein du service de réanimation de l'hôpital El idrissi de Kenitra selon une étude réalisée [6, 7,8]. C'est une bactérie multi résistante qui n'a gardée sa sensibilité que vis-à-vis de la colistine et de l'amikacine (figure 1).



Figure 1 : Antibiogramme de la souche d'AB étudiée

Nous avons évalué l'effet du désinfectant à base du Glutaraldéhyde à 2% sur cette souche à l'état planctonique et à l'état du biofilm sur deux supports abiotiques (polystyrène et silicone)

2.1 Effet du désinfectant sur *Acinetobacter baumannii* à l'état planctonique

L'activité antimicrobienne a été réalisée en utilisant la méthode de diffusion sur le milieu gélose de Muller-Hinton (MH) selon les recommandations de Clinical and laboratory standards Institute CLSI[9] ; Cette méthode permet d'évaluer l'activité antibactérienne ; bien qu'elle soit reconnue comme fiable et reproductible, elle est surtout utilisée en étape préliminaire à des études plus approfondies, car elle permet d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs [10]. Pour cela 2,5 ml d'une suspension bactérienne de densité équivalente au standard 0,5 de Mac Farland (10^7 UFC/mL) sont coulés par boîte de Pétri de milieu gélosé Muller Hinton. Après une imprégnation de 5 minutes, l'excédent d'inoculum est éliminé par aspiration. A la surface de chaque boîte des disques en papier absorbant stériles sont déposés :

Le premier est imbibé du désinfectant à tester (test), le deuxième est imbibé d'eau distillée stérile (témoin négatif=TN) et un disque de colistine (CT) que nous avons choisis comme témoin positif: Les boîtes sont

laissées 30 min à température ambiante puis incubées à 37°C pendant 24 heures. Après incubation, le diamètre d'inhibition est mesuré en millimètres, disque inclus. Ce test est réalisé en triple.

2.2 Effet du désinfectant sur *Acinetobacter baumannii* à l'état de biofilm

2.2.1 Technique de formation du Biofilm au laboratoire

Nous nous sommes inspirés des tests développés par Pitts et al en 2003[11] et Leroy en 2006[12], leur méthode repose sur la formation de biofilm bactérien en microplaque. Les bactéries adhérentes à la surface des puits sont révélées par une coloration au cristal violet (CV). La biomasse totale des biofilms est quantifiée par mesure de la densité optique (DO) à 630 nm après solubilisation du CV dans l'éthanol à 95%. Pour mettre au point cette technique nous avons choisi d'étudier, d'une part, l'influence de la surface d'adhésion sur la formation du biofilm, d'autre part, la nature et la composition chimique de la surface des microplaques (polystyrène et silicone), et le temps de contact du désinfectant

2.2.2 Traitement du biofilm préformé

Le protocole de traitement consiste à ajouter le désinfectant prêt à l'emploi dans chaque puits de la microplaque sur un biofilm préformé ; de telle sorte que le biofilm soit immergé entièrement, par le volume du désinfectant. Après incubation, la microplaque est lavée à l'eau stérile. Le produit est alors ajouté par puits et incubé température ambiante pendant : 10min, 30min, 1H, 1H30, 2H, et 2H30. La plaque est lavée et séchée à l'air ambiant puis le CV est ajouté, La biomasse est alors estimée par mesure de la densité optique par un lecteur Elisa:

Le pourcentage de réduction du biofilm est alors calculé de la manière suivante :

$$\frac{[(DO_C - DO_B) - (DO_T - DO_B)]}{(DO_C - DO_B)} \times 100 \%$$

DO_C : absorbance moyenne du contrôle (biofilm sans aucun traitement)

DO_B : absorbance moyenne pour le blanc

DO_T : absorbance moyenne (biofilm traité).

3. Résultats et Discussion

Les résultats, de l'activité antibactérienne sur la bactérie testée à l'état planctonique, montrent que le désinfectant a un effet inhibiteur sur AB et que le diamètre de la zone d'inhibition est de 12 mm, figure. 2.

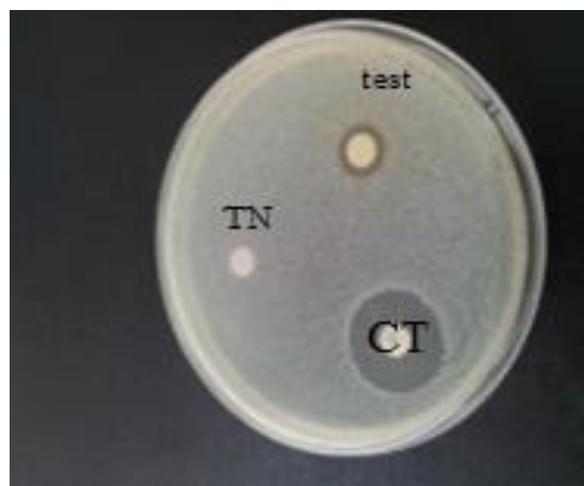


Figure 2 : Effet inhibiteur du désinfectant à base de Glutaraldéhyde sur la souche d'AB (TN : témoin négatif, CT : disque de colistine, test : désinfectant)

Dans le présent travail, nous avons étudié un paramètre important influençant la formation du biofilm c'est celui de la nature de la surface d'adhésion, nous avons trouvé une grande adhérence d'AB à la silicone par rapport au polystyrène (figure 3).

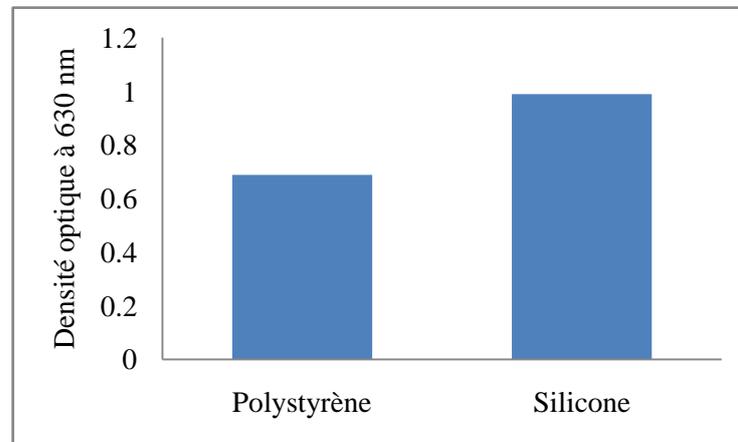


Figure 3 : Biofilm d'AB en fonction de la surface d'adhésion

Nous avons remarqué que le pourcentage d'élimination du biofilm augmente en fonction du temps de traitement. En effet le maximum d'éradication du biofilm d'AB est atteint à 150 min de contact avec le désinfectant. L'effet anti-biofilm du désinfectant a montré un taux d'élimination variant entre 41,79% à 10 min et 82,01% à 150 min sur un support en polystyrène; par contre sur un support de silicone le maximum d'éradication du biofilm n'atteint que 65% à 150 min. (Figure N°4). L'observation de la différence d'éradication entre les deux supports est due à la nature des surfaces.

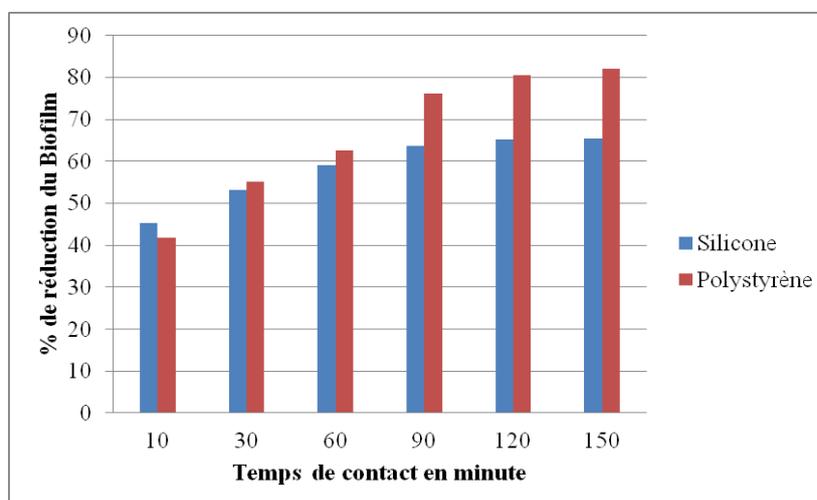


Figure 4 : Pourcentage de réduction du Biofilm d'AB sur le support en polystyrène et en silicone

Nous avons remarqué aussi que quelque soit le support d'adhérence une fraction du biofilm n'est pas éradiqué par le désinfectant même avec un temps de contact allongé. Par conséquent quelques colonies ont survécu, et ceci est dû au non accessibilité du désinfectant aux bactéries à l'intérieur du biofilm.

Nous avons montré qu'*Acinetobacter baumannii* est capable de former un biofilm sur une surface abiotique en présence d'un bouillon nutritif de type BHI. Les tests d'adhésion à la silicone et au polystyrène ont montré que cette souche a moins d'adhérence au Polystyrène par rapport à la silicone. Ces résultats sont en accord avec d'autres études effectuées par de nombreux laboratoires où il a été rapporté que l'adhérence microbienne varie selon les caractéristiques des surfaces [13,14] certains auteurs [15,16] ont constaté qu'*Enterococcus faecalis*

adhère fortement à la silicone et mal au PVC. Ces caractéristiques comprennent la charge superficielle de la matière, l'hydrophobicité et la rugosité de surface ou configuration-physique [17]. En effet Différentes études portent sur l'influence du conditionnement de surface par des macromolécules organiques sur l'adhésion de microorganismes. Il a été observé que la formation de biofilm est précédée par une étape d'adsorption de molécules organiques [18,19] permettant la formation du film primaire. Les molécules organiques peuvent influencer l'adhésion des microorganismes en se liant à la surface, à la bactérie ou simplement en étant présentes dans le milieu liquide pendant la phase d'adhésion. Il a également été montré que l'adsorption de protéines sur une surface permet de modifier les propriétés physico-chimiques de la surface [20] et par la même d'influencer l'adhésion du biofilm [21,22]. Les microorganismes présentent souvent un caractère hydrophile ce qui explique qu'ils s'adsorbent plus facilement sur des surfaces hydrophobes (ex téflon) que sur des surfaces hydrophiles (verre).

Au cours de notre travail, nous avons aussi évalué l'effet du désinfectant à base du Glutaraldéhyde à 2% sur AB à l'état libre et sessile sur deux supports inertes (polystyrène et silicone), on a remarqué qu'un meilleur produit contre les bactéries en suspension n'est pas forcément le meilleur contre les bactéries structurées en biofilm, en effet une réduction de l'efficacité est remarquée elle peut s'expliquer par la moindre accessibilité des bactéries du fait de leur adhésion, quelque soit le support d'adhérence une fraction du biofilm n'est pas éradiqué par le désinfectant même avec un temps de contact allongé, l'observation de la différence entre les deux supports pourrait être due à la surface de bactéries liée à l'adhésion à un support hydrophobe.

La résistance des bactéries incluses dans les biofilm vis-à-vis des désinfectants est bien connue, cette résistance est attribuée selon certains auteurs à certains facteurs (physiologie des bactéries, pouvoir des matrices ...). Les travaux scientifiques sur le sujet montrent un lien étroit, qu'il soit direct ou indirect, entre l'architecture de l'édifice biologique et sa résistance à l'action des antimicrobiens [23]. En effet, la multiplication des cellules adhérentes et la production d'une matrice extracellulaire conduisent au développement d'une structure complexe dans laquelle les biocides peuvent rencontrer des problèmes de diffusion ce qui limite leur efficacité. Cette structure gouverne la mise en place de gradients en nutriments, en oxygène et en produits métabolites qui entraînent l'apparition d'une hétérogénéité chimique et nutritionnelle dans le biofilm [24]. En réponse à leur microenvironnement local, les cellules peuvent alors évoluer vers des phénotypes de tolérance par des modifications physiologiques et/ou l'expression de gènes spécifiques. La résistance globale de la communauté bactérienne apparaît donc être un processus multifactoriel structure-dépendant qui implique des phénomènes locaux [25]. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette plus grande résistance:

La matrice polymérique qui agit comme une barrière réduisant ou empêchant la diffusion aux agents antimicrobiens, et la faible concentration de certains éléments nutritifs et le gradient en oxygène, certaines cellules du biofilm seront peu actives métaboliquement et pourront même être sous forme dormante. Ces cellules bactériennes dormantes sont d'ailleurs probablement responsables d'une grande partie de la tolérance associée aux biofilms [25]. L'exposition répétée à des concentrations du désinfectant peut générer certaines adaptations physiologiques qui repoussent encore plus loin la tolérance ultérieure du biofilm. Quand une communauté de cellules bactériennes adhérentes est soumise au désinfectant, seules quelques unes sont capables de résister.

Conclusion

Les bactéries adhérentes constituent un facteur non négligeable dans la résistance aux désinfectants, elles sont très difficiles à éliminer et constituent une source majeure d'infection hospitalière. Ainsi Le choix du désinfectant et le temps d'action est très important lors de l'éradication des biofilms. Il est également important que les résistances des biofilm aux agents désinfectants soient prises en compte lors de la planification du processus de nettoyage.

Nous avons conclu que le biofilm d'AB se forme quelque soit le matériau utilisé, d'où la nécessité d'une stratégie de développement de surfaces antiadhésives au sein du service ou bien l'élaboration de matériaux antibactériens.

Références

1. Yannick D.N., Tremblay., Skander H., Mario J., *Can. J. Veter. Res.* 78 (2014) 110–116.
2. Barkai H., Sadiki.M., El Abed.S., Moustakhim.M., Iraqui Houssaini.M., Ibsouda Koraiichi.S., *J. Mater. Environ. Sci.* 6 (2015) 749-755
3. Mah T.F., O'Toole G.A., *Tren Microbio.* 9 (2001) 34-39.
4. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P., *Nat. Rev. Microbio.* 2 (2004) 95-108.
5. Fux C.A., Costerton J.W., Stewart P.S., Stoodley P., *Tren Microbio.*13 (2005) 34-40
6. Amiyare R., Afifi.I., Ouhssine.M., *Der Phar Lett* 7 (3) (2015) 134-140
7. Amiyare R., Trachli.M., Ouhssine.M., *Res. Rev Bio. Sci.* 10 (2015) 1-7
8. Chahboun N., Esmail A., Abed H., Barrahi M., Amiyare R., Berrabeh M., Oudda H., Ouhssine M. *J. Mater. Environ. Sci.* 6 (4) (2015) 1186-1191
9. CLSI. Clinical and laboratory standards Institute. (Document M100-S9). 8th ed. Wayne, PA.
10. Esmail A., Chahboun N, Mennane Z, Amiyare R, Abed H, Barrahi M, Qebibo A, Ouhssine M, E Berny E.H., *J. Mater. Environ. Sci.* 6 (2015) 869-876
11. Pitts B., Hamilton M.A., Zilver N., Stewart P.S., *J. Microbio. Meth.* 54 (2003) 269-276.
12. Leroy C, Thèse « Lutte contre les salissures marines : approche par procédés enzymatiques, doctoral diss., Biotechnology and Marine Molecules of Ifremer de Nantes in collaboration with the laboratory interfaces and sensors of Ifremer de Brest and Biotechnology - Bioprocess Laboratory of Toulouse INSA, (2006). Ifremer de Nantes
13. Espinal P., Marti S., Vila J., *J. Hosp. Infect.* 80 (2012) 56-60
14. Mączyńska B., Smutnicka D., Przondo-Mordarska A., Bartoszewicz M. *Clin. Exp. Med.* 19 (2010) 443-453
15. Abd El-Baky R.M., *Scan Electr Micro. InTech.* (2012). 591-616.
16. Dworniczek E., Kuzko K., Mróz E., Adamski R., Sobieszkańska B., Seniuk A., *Folia microbio.*48 (2003) 671- 678.
17. Katsikogianni M., Missirlis Y.F., *Eur. Cell Mater.* 8 (2004) 37-57.
18. Taylor G.T., Zheng D., Lee M., Troy P.J., Gyananath G., Sharma S.K., *J.Biofouling.* 11 (1997) 31-57.
19. Compère C., Bellon-Fontaine M.N., Bertrand P., Costa Dl., *J.Biofouling.* 17(2001) 129-145.
20. Schakenraad J.M., Noordmans J., Wildevuur Ch R H., Arends J., Busscher . H.J., *J.Biofouling.* 1 (1989). 193-201
21. Fletcher M., *J. Gen. Microbio.* 94 (1976) 400-404
22. Rubio C., Thèse « Compréhension des mécanismes d'adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyens de prévention »Université Paris 6. (2002) 213 p
23. Bridier A., Dubois.F; Brissonnet., Greub.G,Thomas.V, *Antimicro Age. Chem,* 55 (2011) 2648–2654 .
24. Oubekka S.D. Dynamique réactionnelle d'antibiotiques au sein des biofilms de *Staphylococcus aureus*: apport de la microscopie de fluorescence multimodale. Agricultural sciences.Universit_de Paris Sud - Paris XI, 2012. <https://tel.archives-ouvertes.fr/>
25. Bridier A., Briandet A., Thomas V., Dubois B., *J. Biofouling.* 27 (2011) 1017-1032.

(2015) ; <http://www.jmaterenvirosci.com>