



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Centre Universitaire Belhadj Bouchaib d'Ain-Temouchent

Institut des sciences
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire

Pour l'obtention du Diplôme de Master en biologie

Option : Microbiologie appliquée

Présenté par :

Mlle.Khoualef Aicha

Mlle.Khoualef Zohra

Evaluation de la formation de biofilm des souches bactériennes isolées des tubulures d'eau de l'unité dentaire de Ain-Temouchent

Encadrant :

Mme. Lachachi Meriem

Maitre de conférences « B » au C.U.B.B.A.T.

Soutenu en 2020

Devant le jury composé de :

Présidente : **Mme.** Derrag Zineb Maitre de conférences « B » au C.U.B.B.A.T

Examinatrice : **Mme.** Madani Khadidja Maitre assistante « A » au C.U.B.B.A.T

Encadrant : **Mme.** Lachachi Meriem Maitre de conférences « B » au C.U.B.B.T

REMERCIEMENTS

Nous remercions tout d'abord notre grand seigneur ALLAH le tout puissant à la santé et la volonté qu'il nous a donné pour réaliser ce travail.

Nous aimerions, tout d'abord exprimer à Madame LACHACHI Meriem nos profondes gratitude de nous avoir dirigé dans nos recherches, pour tout son support et les orientations durant toute la réalisation de ce mémoire par ses conseils qui nous ont appris la patience.

Nous adressons nos vifs remerciements à Madame DERRAG Zineb pour l'honneur qu'elle nous fait de présider notre jury de soutenance.

Nos remerciements vont également à Madame MADANI Khadidja pour l'intérêt qu'elle a bien voulu porter à ce modeste travail.

Nos remerciements les plus sincères aussi pour tous les enseignants de notre département pour leur patience et leurs efforts au cours de notre formation.

Nos remerciements à toute l'équipe de l'unité dentaire de la clinique Al Sabbah EPSP Ain Témouchent.

Nos remerciements à toute les personnes de prés comme de loin qui ont contribué à l'élaboration de ce travail.

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
--------------------	---

La partie I : Synthèse bibliographique

1 Les unités de soins dentaires (USD)	2
1.1 Introduction	2
1.2 L'eau de sortie des conduites d'eau des unités dentaires DUWL	3
2 La contamination microbiologique de l'unit	4
2.1 Contamination externe	4
2.2 Contamination interne	5
2.2.1 La contamination de l'eau de l'unit par l'eau de réseau hydrique	5
2.2.2 Contamination de l'eau de l'unité par rétro contamination au niveau de la porte d'instruments dynamique (PID)	5
2.2.3 Contamination du système d'aspiration de l'unit	6
3 La concentration des microflores dans la conduite d'eau de l'unité dentaire DUWL	7
4 Les biofilms bactériens	9
5 La composition de la microflore contaminant les tubulures d'eau	10
6 Les risques infectieux lors des soins dentaires	10
6.1 Risques pour l'équipe dentaire	11
6.2 Risques pour les patients	11

La partie II: Matériel et méthodes

1 Lieu d'étude	13
2 Prélèvements	13
2.1 Lieu de prélèvement d'échantillon	13
2.2 Echantillonnage	13
3 Préparation des échantillons des tubulures	13
4 Isolement et enrichissement d'espèces bactériennes	13
5 Isolement et identification des souches de <i>Staphylocoques</i> , entérobactéries de tubulure d'eau dentaire	13
6 Purification et identification des souches	14

6.1	Etude des caractères macroscopiques	14
6.2	Etude des caractères microscopiques	14
6.3	Test de coagulase pour l'identification des <i>Staphylocoques</i>	14
6.3.1	Préparation de suspension bactérienne	14
6.3.2	Test de coagulase	14
7	Evaluation de la formation du biofilm par la technique TCP chez les souches de	
	<i>Staphylocoques</i> à coagulase positif	15
La partie III: Résultats et discussion		
1	Prélèvements	17
2	Identification bactérienne	17
2.1	Test de coagulase	18
3	Evaluation de la formation du biofilm par la technique TCP chez les <i>Staphylocoques</i> à coagulase positif	21
	Conclusion.....	25
	Référence bibliographique	Erreur ! Signet non défini.

Résumé :

Depuis quelques années, la formation de biofilm dans les instruments et les conduites d'eau des unités dentaires suscite de plus en plus d'intérêt et d'inquiétude.

Les conduites d'eau des unités dentaires constituent un milieu de croissance idéal pour les bactéries provenant de l'aqueduc municipal.

Le développement des germes dans les réseaux d'alimentation en eau des unités dentaires est accéléré par la contamination de reflux de la salive ou du sang des patients, une température idéal pour la croissance des bactéries, et le rapport surface / volume élevé des conduites d'eau.

L'objectif de ce travail est la détection de la présence des souches bactérien au niveau des parois internes des tubulures d'eau de l'unité dentaire Al-Sabbah Ain Temouchent, et la capacité de certain souches à former un biofilm par la techniques TCP. 5 échantillon ont été collectés, dont les résultats révèlent la présence d'un bon nombre de microorganismes avec dominance des enterobactéries d'origine hydrique suivi de 10 cocci Gram positifs d'origine buccale.

Les résultats obtenus confirment qu'ils existent des souches bactériennes telles les *Staphylocoques* provenant de la cavité buccale des patients et les entérobactéries d'origine hydriques qui sont la cause principale d'infections liées au personnel dentaire et le patient.

Mots clés : Tubulure, Biofilm, eau, soins dentaire, contamination, infection, bactéries.

Summary:

In recent years, there has been growing interest and concern about the formation of biofilm in dental units' instruments and water pipes.

Dental unit water lines are an ideal growth medium for bacteria from the municipal water system.

The development of germs in the water supply networks of dental units is accelerated by the contamination of reflux saliva or blood from patients, an ideal temperature for the growth of bacteria, and the high surface/volume ratio of water pipes.

The objective of this work is the detection of the presence of bacterial strains at the internal walls of the water pipes of the dental unit Al-Sabbah Ain Temouchent, and the ability of certain strains to from a biofilm by TCP. 5 samples were collected; in the results reveal the presence of a good number of microorganisms with domina of enterobacteria of water origin followed by 10 cocci Gram positive of oral origin.

Results confirm that bacterial strains such as *Staphylococcus* from the oral cavity of patients and water-borne enterobacteriaceae are the main cause of staff and patient-related infections.

Key words: Tubing, biofilm, Water, Dental care, Contamination, Infection, Bacteria.

ملخص :

في السنوات الأخيرة، كان هناك اهتمام متزايد و القلق بشأن تشكيل بيوفيلم في ادوات وحدات طب الاسنان وخطوط المياه. تعتبر خطوط المياه لوحات طب الاسنان وسيلة نمو مثالية للبكتيريا من القناة المائية البلدية. يتم تسريع نمو الجراثيم في شبكات امدادات المياه لوحات طب الاسنان عن طريق تلوث ارتجاع اللعاب او دم المرضى، ودرجة حرارة مثالية لنمو البكتيريا و ارتفاع نسبة سطح / حجم انابيب المياه. الهدف من هذا العمل هو الكشف عن وجود سلالات بكتيرية على مستوى الجدران الداخلية للأنبوب المائي لوحدة طب الأسنان في عيادة الصباح عين تموشنت، وقدرة سلالات معينة على تشكيل فيلم حيوي بواسطة تقنيات TCP. تؤكد النتائج التي تم الحصول عليها أن هناك سلالات بكتيرية مثل المكورات العنقودية من تجويف الفم للمرضى و المكورات المعوية ذات مصدر المائي هي السبب الرئيسي للعدوى المتصلة بموظفي الاسنان و المريض.

الكلمات المفتاحية: الانابيب، بيوفيلم، المياه، رعاية الاسنان، التلوث، العدوى، بكتيريا

Liste des abréviations

USD : Unit de Soin Dentaire.....	2
DUWL: Dental Unit Waterline.....	3
DCU: Dental Chair Unit.	3
ADA: American Dental Association.....	5
PID : Porte D'Instruments Dynamique	5
UFC: Unité Formant Colonie	5
VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine	6
HBV: Hépatite B Virus.....	6
HCV: Hépatite C Virus.	6
PCA: Plaque Count Agar.....	8
KA: King A.....	8
DUW: Dental Unit Water	10
BHIB: Brain Heart Infusion Broth	13
EPSP: Etablissement Public De Santé De Proximité	13
TCP: Plaque de Culture Tissulaire	15

Liste des figures

Figure 1: Représentation d'une unité de soins dentaire USD. (Original)	2
Figure 2: Points d'entrée et de sortie d'eau de l'unité de soin dentaire USD (Damien, 2015)...	4
Figure 3: Vaporisation du spray d'eau d'un contre-angle dans différentes	4
directions autour de la source (Offner <i>et al.</i> , 2018). (Original).....	4
Figure 4 : Vue au microscope d'une coupe de tubulure d'eau d'unité dentaire,.....	5
Figure 5 : Coupe d'un tuyau d'aspiration avec mise en évidence de salissures	6
Figure 6 : Les étapes de la formation de biofilm au niveau de la tubulure (Damien, 2015)....	9
Figure 7 : Méthode des microplaques TCP	16
Figure 8: <i>Staphylocoques</i> dorées isolées sur milieu de Chapman.....	17
Figure 9 : <i>Staphylocoques</i> blanc isolées sur milieu de Chapman.	17
Figure 10 : Aspect microscopique des cocci à Gram positif par coloration de Gram.....	18
Figure 11 : Résultat de test de détection de production de coagulase.	18
Figure 12 : aspects des colonies sur milieu Mac Conkey	19
Figure 13 : Aspect microscopique des bacilles à gram négatif par coloration de gram.....	20
Figure 14 : Résultat de la formation de biofilm chez les souches de <i>Staphylocoques</i>	21
Figure 15 : les différentes souches isolées des tubulures d'eau de l'unité dentaire	
Al-Sabbah Ain Temouchent	22

Liste des tableaux

Tableau 1 : La concentration de flore bactériale dans les conduites d'eau des unités dentaires	8
Tableau 02 : les types des souches bactériennes isolés de l'eau de l'unité dentaire	10
Tableau 3 : Interprétation du résultat de la méthode TCP	15
Tableau 4 : Classification de l'adhérence bactérienne par la technique TCP.	22

I. *Introduction*

Introduction :

L'unit dentaire est un élément essentiel à la pratique de la chirurgie dentaire.

Le fauteuil de l'unit dentaire contient des systèmes intégrés qui fournissent les instruments et les services pour une vaste gamme de soins dentaires, il utilise de l'eau pour refroidir et irriguer les instruments pendant le traitement dentaire (**Coleman *et al.*, 2009**).

Les lignes de flottaison des unités dentaires font partie intégrante de l'équipement de chirurgie dentaire, fournissant de l'eau comme liquide de refroidissement, principalement pour les turbines à air et les écailleurs à ultrasons.

Les relevés des lignes de flottaison des unités dentaires indiquent que la formation de biofilm est un problème universel et que la grande majorité des bactéries qui ont été identifiées à partir des conduites d'eau des unités dentaire sont omniprésentes (**Liaqat *et al.*, 2011**).

La qualité de l'eau dans les unités dentaires revêt une importance considérable parce que les patients et le personnel dentaire sont régulièrement exposés à l'eau et aux aérosols produits par l'unité dentaire.

La cause de la contamination microbienne dans les conduites de l'unité dentaire peut être : l'eau livrée à une unité, les pièces à main et le biofilm présent à l'intérieur des parois internes des tubulures d'eau des unités dentaires (**Szymariska *et al.*, 2008**).

La contamination se produit lors de l'aspiration des liquides de la cavité buccale du patient, soit en raison d'un dysfonctionnement de la valve de protection, soit lorsque les pièces à main sont retirées et remplacées incorrectement (**Szymariska *et al.*, 2008**).

Le problème principal des unités dentaires semble être la formation de biofilm à la surface interne des tubulures d'eau, lors de détachement de ce biofilm les bactéries quittent la conduite d'eau et peuvent être une source d'infection liée au soin dentaire. C'est dans ce cadre que nous proposons dans cette étude :

- Une recherche et un isolement des bactéries à partir des tubulures d'eau liées aux pièces à main des fauteuils dentaires de la clinique Al-Sabbah Ain Temouchen.
- Une identification bactérienne de différentes souches isolées des tubulures d'eau dentaire.
- Une évaluation de la capacité de certaines souches bactériennes à produire de biofilms par la technique phénotypique.

II. Synthèse bibliographique

1 Les unités de soins dentaires (USD) :

1.1 Introduction :

Les unités de soins dentaires se définissent comme la réunion de matériel dentaire et d'instruments dentaires interconnectés (Figure1), constituant un ensemble fonctionnel utilisable dans le traitement dentaire (ISO, 2011).

L'unité permet notamment la mise en fonction des instruments dynamiques, du système d'aspiration, ainsi que l'apport d'air et d'eau dans la zone du soin via des cordons souples multicanalaires. Afin de permettre l'utilisation de matériel rotatif provoquant des échauffements locaux, ainsi que dans un but de rinçage (Offner *et al* 2013).

L'eau est fournie à ces instruments par un réseau de tubes en plastique à alésage étroit (2-3mm) interconnectés appelés ligne de flottaison des unités dentaires DUWLs (Coleman *et al.*,2009).

Les différentes fonctions de l'unité ainsi que les divers éléments qui peuvent s'y connecter constituent autant de voies de contamination de l'unité que le chirurgien-dentiste devra connaître et savoir gérer afin de préserver la sécurité des soins pour le patient (Offner *et al.*, 2013).



Figure 1: Représentation d'une unité de soins dentaire USD. (Original)

1.2 L'eau de sortie des conduites d'eau des unités dentaires DUWL :

La contamination des conduites d'eau des unités dentaires par des microorganismes provient principalement de l'approvisionnement en eau du fauteuil de l'unité dentaire, qui contient habituellement de faibles niveaux de micro-organismes [(Pankhurst *et al.*, 1998) ;(Tuttlebee *et al.*, 2002)].

Dans un fauteuil de l'unité dentaire moderne typique, le réseau de canalisation se compose de plusieurs mètres de tubes en plastique de conduite d'eau de l'unité dentaire d'un diamètre intérieur de 1 à 2mm. Le flux d'eau à l'intérieur de ces tubes d'alésage étroits est laminaire et par conséquent, le flux à la surface de la lumière est presque négligeable par rapport à celui au centre de la lumière [(Shearer, 1996) ; (Wirthlin *et al.*, 2003)].

Une pellicule de conditionnement de produits chimiques provenant principalement de l'eau d'approvisionnement s'appuie sur cette face interne au fil du temps, ce qui facilite la fixation des micro-organismes [(Shearer, 1996) ; (Wirthlin *et al.*, 2003)].

Ainsi, les micro-organismes de l'eau d'alimentation du fauteuil de l'unité dentaire (DCU) se fixent aux surfaces internes du tube de conduite d'eau de l'unité dentaire et forment des micros colonies qui finissent par donner lieu à des biofilms.

Les fauteuils de l'unité dentaire raccordés aux réseaux municipaux d'approvisionnement en eau contiennent généralement un faible nombre de plusieurs espèces bactériennes qui donnent lieu à des biofilms de plusieurs espèces à conduite d'eau de l'unité dentaire [(Pankhurst *et al.*, 1998) ; (Miills, 2000); (Tuttlebee *et al.*, 2002)].

De nombreuses études ont démontré que l'eau de sortie de conduite d'eau de l'unité dentaire est souvent contaminée par de fortes densités de micro-organismes, principalement par des bactéries aérobies hétérotrophes à gram négatif, y compris des espèces de *Legionella* et de *Pseudomonas* (Coleman *et al.*, 2013).

La majorité des espèces microbiennes présentes dans l'eau de sortie de conduite d'eau de l'unité dentaire sont des espèces bactériennes hétérotrophes aérobies à gram négatif de l'environnement à très faible pathogénicité (Pankhurst *et al.*, 2007).

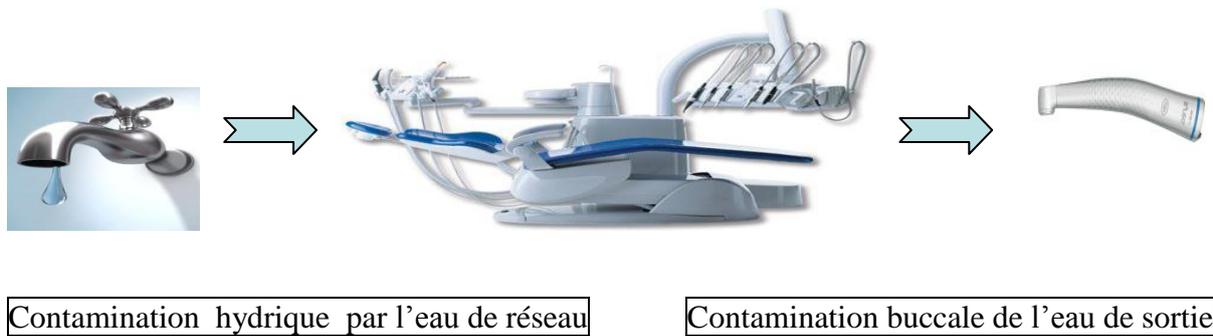


Figure 2: Points de prélèvement des USD investigués (Damien, 2015).

2 La contamination microbiologique de l'unit :

L'unit dentaire est un élément essentiel à la pratique de la chirurgie dentaire. Son utilisation présente toutefois un risque infectieux lié à de possibles contaminations externes, mais aussi internes par l'eau qui y circule, le système d'aspiration, ou encore via des dispositifs médicaux qui y sont connectés (Offner *et al.*, 2018).

2.1 Contamination externe :

La contamination externe s'effectue par projection, vaporisation ou nébulisation autour de la zone de soin. Le spray de refroidissement des fraises ne se dirige pas que dans un seul sens (Figure 3), mais des gouttelettes se répandent jusqu'à 1.5m autour de la source, potentiellement chargées de micro-organismes (Offner *et al.*, 2018).

L'aérocontamination et les gouttelettes chargées atteignent Les différents éléments de l'unit et du fauteuil qui sont à proximité du soin et qui seront ensuite des sources de contaminations croisées manportées (Offner *et al.*, 2018).



Figure 3: Vaporisation du spray d'eau d'un contre-angle dans différentes directions autour de la source (Offner *et al.*, 2018). (Original)

2.2 Contamination interne :

2.2.1 La contamination de l'eau de l'unit par l'eau de réseau hydrique :

Une grande proportion des unités dentaires est reliée à l'eau de réseau. L'eau de sortie des unités est considérée comme devant au moins répondre aux critères de qualité de l'eau d'entrée, ce qui correspond aux normes données par l'Américain Dental Association (ADA) en 2004 (Offner *et al.*, 2018).

Le contrôle de la qualité microbiologique de l'eau peut être réalisé par des prélèvements au niveau de l'unit. Ceux-ci peuvent mettre en évidence la présence d'une flore bactérienne planctonique ou sessile.

Une contamination pouvant atteindre 10^5 Ufc/ml a déjà été rapportée dans la littérature (Barbeau *et al.*, 1998), et le rapport surface/volume élevé des circuits d'eau de l'unit (longue tuyaux fins) ainsi que la présence d'un flux d'eau laminaire peuvent favoriser la formation d'un biofilm [(Shearer, 1996) ;(Wirthlin *et al.*, 2003); (Nikaen *et al.*, 2009)]. (Figure 4).

Ce biofilm agit comme un réservoir secondaire pour une contamination continue du circuit d'eau de l'unit. Si les unités reliées à un réservoir d'eau indépendant permettent une meilleure contrôle de la qualité microbiologique de l'eau d'entrée (Offner *et al.*, 2018).

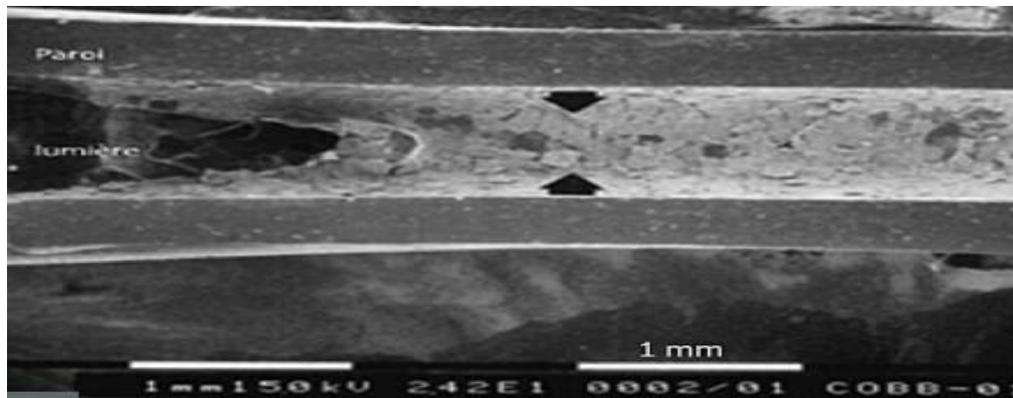


Figure 4 : Vue au microscope d'une coupe de tubulure d'eau d'unit dentaire, avec mise en évidence d'un biofilm (Offner *et al.*, 2018). (Original)

2.2.2 Contamination de l'eau de l'unité par rétro contamination au niveau de la porte d'instruments dynamique (PID) :

Lors des soins dentaires, la tête de la porte d'instruments dynamique est amenée à travailler en bouche, au plus près de l'organe dentaire et des tissus mous, au contact direct de la salive ou d'autres fluides biologiques, dans un milieu profondément septique (Offner *et al.*, 2018).

Il se produit donc, la contamination et la salissure externe de porte d'instruments dynamique, une rétro contamination et une salissure interne du porte d'instruments dynamique tant au niveau de sa tête et de son corps [(Smith *et al.*, 2014) ;(Herd *et al.*,2007)] qu'au niveau des fines tubulures [(Dreyer *et al.*, 2001) ;(Smith, 2014)].

La contamination des portes d'instruments dynamique peut être de nature diverse : de nombreux pathogènes à l'intérieur de ceux-ci telle que le virus de l'hépatite B (Deng *et al.*, 2005), des *pseudomonas Spp* ou encore *Staphylococcus aureus* (Smith, 2014), le virus de l'hépatite C, et le virus de VIH (INVS, 2009).

La contamination interne du porte d'instrument dynamique peut se répandre jusqu'au moteur qui met le porte d'instruments dynamique en action et rejoindre les tubulures air-eau, pouvant ainsi être à l'origine d'une contamination de l'intégralité des circuits d'eau de l'unit [(Chin *et al.*, 2006) ;(Sacchetti *et al.*, 2006)].

2.2.3 Contamination du système d'aspiration de l'unit :

Les fluides biologiques vecteurs de microorganismes traversent le système d'aspiration qui offre des conditions idéales à leur développement (ADF, 2016). En effet, la formation d'un biofilm est favorisée par l'humidité et la chaleur, et un rapport surface/volume élevé une utilisation intermittente du fauteuil et un entretien négligent sont des facteurs additionnels en faveur de potentiel développement d'un biofilm (Payement *et al.*, 1998). La coupe d'un tuyau d'aspiration peut montrer l'existence d'un dépôt sur les surfaces internes de celui-ci (Figure 5) (Offner *et al.*, 2018).

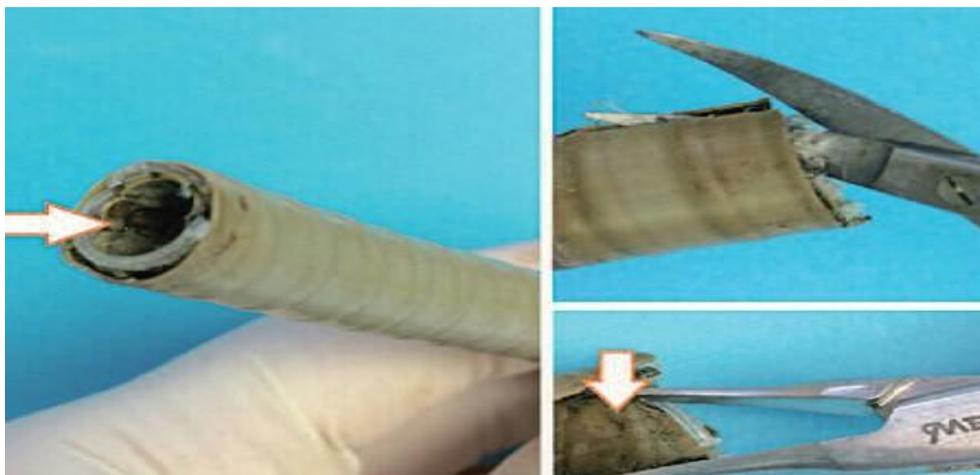


Figure 5 : Coupe d'un tuyau d'aspiration avec mise en évidence de salissures internes (Offner *et al.*, 2018). (Original)

Ce système constitue la première barrière contre l'aérosolisation d'agents potentiellement pathogènes (**Offner et al., 2018**).

L'aspiration des particules dès leur libération en bouche prévient en grande partie la diffusion dans l'atmosphère des aérosols et débris chargés d'agents contaminants (**Reybrouk et al., 1999**).

3 La concentration des microflores dans la conduite d'eau de l'unité dentaire DUWL :

La contamination des lignes de flottaison des unités dentaires peut avoir des valeurs très variables. Les chercheurs qui étudient ce problème ont signalé une contamination de l'eau de ligne de flottaison à une concentration de $1,5 \cdot 10^2$ à $1 \cdot 10^6$ UFC/ml (**Dutkiewicz et al., 2008**). Les bactéries colonisent abondamment l'eau dans les unités dentaires. Dans la plupart des cas, les valeurs de contamination bactérienne dépassent les normes acceptées pour l'eau potable aux Etats-Unis et dans l'Union européenne (**Dutkiewicz et al., 2008**).

Des études détaillées de la concentration et de la composition des flores fongiques dans les conduites d'eau montrent que la contamination mycologique est moins répandue que la contamination bactérienne (**Dutkiewicz et al., 2008**).

Les concentrations de bactéries dans les échantillons d'eau de conduites d'eau rapportées par divers auteurs sont présentées au tableau 1 :

Tableau 1 : La concentration de flore bactériale dans les conduites d'eau des unités dentaires
(Dutkiewicz *et al.*, 2008).

La concentration moyenne de bactéries déterminées (UFC /mL)	Lieu d'échantillonnage de l'eau	Les conditions de cultures	Les recherches
4.95 log 4.91 log	Seringue air/eau Rotor d'air	22°C et 37°C, 72h, R2A 22°C et 37°C, 72h, R2A	Uzel <i>et al.</i>, 2008
3.64 log ; 3.53 log 3.61 log ; 3.41 log	Pièce à main à Grande vitesse Pièce à main à Grande vitesse	36°C, PCA 22°C, PCA	Sacchetti <i>et al.</i>, 2006
$6.7 - 7.8 \times 10^4$ $3.3 - 7.7 \times 10^4$	Pièce à main à ultrasons	32°C, 48h, PCA 21°C, 72h, KA	Fiehn <i>et Larsen.</i>, 2002
6 - 2.575 0 - 73 $5 \times 10^2 - 1 \times 10^5$ $0-1 \times 10^5$.	Seringue air/eau Seringue air/eau Pièce à main à Grande vitesse Pièce à main à Grande vitesse	22°C, 72h, agar medium 37°C, 24h, agar medium 22°C, 72h, agar medium 37°C, 24h, agar medium	Smith <i>et al.</i>, 2002
3.52×10^2 1.0×10^5		37°C, 22°C	Smith <i>et al.</i>, 2001

4 Les biofilms bactériens :

Un biofilm est une communauté multicellulaire complexe de microorganismes adhérant entre eux et sur une surface, marquée par la sécrétion d'une matrice extracellulaire (*Damien, 2015*).

Généralement, 4 étapes sont décrites pour la formation d'un biofilm (Figure 6) :

- Tout d'abord, les microorganismes adhèrent de façon réversible à un substrat.
- Ensuite vient l'étape d'adhérence irréversible à ce substrat.
- Puis, la maturation du biofilm : les microorganismes se multiplient et sécrètent de la matrice exopolysaccharidique.
- En fin, l'étape de dispersion : des microorganismes se détachent du biofilm et peuvent alors se disperser vers d'autres sites (*Damien, 2015*).

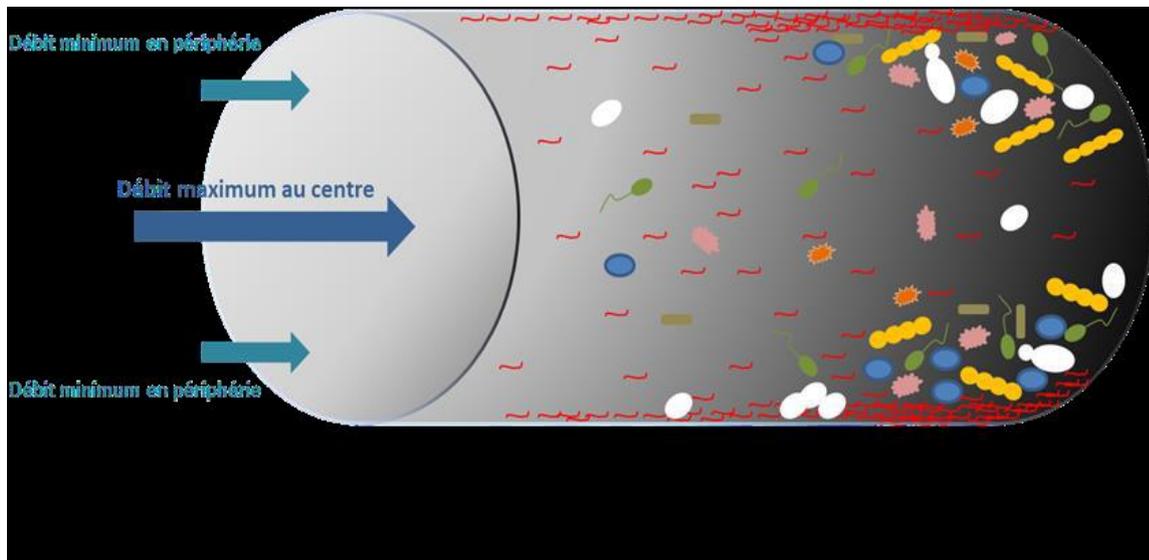


Figure 6 : Les étapes de la formation de biofilm au niveau de la tubulure (*Damien, 2015*).

5 La composition de la microflore contaminant les tubulures d'eau :

Les bactéries forment la partie dominante de la microflore, tandis que les champignons et les protozoaires sont moins fréquents (**Dutkiewicz et al., 2008**).

Pankhurst et al fournissent une liste des microorganismes isolés dans les unités dentaires, y compris les bactéries Présentées dans le tableau suivants :

Tableau 2 : Les types des souches bactériennes isolées de l'eau de l'unité dentaire (DUW) (**Dutkiewicz et al., 2008**).

Les bactéries isolées des tubulures d'eau
<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Escherichia coli</i>
<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Legionella spp</i>

6 Les risques infectieux lors des soins dentaires :

En cabinet, les instruments de dentisterie tels le pistolet air/eau et le détartreur ultrasonique sont responsables de la génération d'aérosols. Ces aérosols peuvent contenir des bactéries provenant de la bouche des patients mais aussi de l'eau des unités dentaires (DUW) (**Duchaine et al., 2005**).

Une caractérisation adéquate des bioaérosols générés lors de traitements dentaires permettra d'estimer les risques réels d'infection ou de sensibilisation (**Duchaine et al., 2005**).

Dans certaines conditions, le personnel dentaire et les patients sont exposés à des bactéries provenant de la bouche des patients et possiblement de l'eau des unités dentaires (DUW).

Le diamètre respirable ($< 1\mu\text{m}$) des aérosols mesurés lors des traitements dentaires ainsi que l'exposition répétée du personnel, suggère que le risque de contact entre les bactéries aérosolisées et le système respiratoire des personnes exposées est probable (**Duchaine et al., 2005**). Trois voies d'exposition sont décrites :

- Voie aérienne : souffle du patient, toux et éternuements, aérosols septiques des sprays.
- Voie sanguine : blessure avec un instrument contaminé, contamination d'une blessure non cicatrisée.
- Voie cutanée : érosion de l'épiderme, blessures (**Gaultier, 2016**).

6.1 Risques pour l'équipe dentaire :

Le chirurgien-dentiste et son équipe sont exposés plusieurs milliers d'heures par an aux microorganismes de leurs 300 à 4000 patients : la complexité de l'exercice, la difficulté de stérilisation et de désinfection du matériel et des surfaces de travail (**Barbeau, 2007**).

Les bactéries pathogènes (*Pseudomonas*, *Legionella*, *Mycobacterium* et autres) sont soupçonnées d'être la principale source de risque (**Barbeau, 2007**).

Il est vraisemblable qu'une partie de ces microorganismes en exil, expulsée violemment à travers la turbine, la seringue air-eau ou le détartreur sera aérosolisée en même temps que les bactéries buccales du patient (**Dutil et al., 2007**).

6.2 Risques pour les patients :

Les scientifiques s'intéressent au problème de bioaérosol en cabinet dentaire dans une optique de contrôle de l'infection (**Duchaine et al., 2005**).

Des études ont démontré une contamination significativement plus élevée lors des traitements avec des instruments à haute vitesse (**Duchaine et al., 2005**).

L'exposition à bioaérosols et aux toxines qu'ils véhiculent, pourrait sensibiliser les poumons et représenter des risques pour la santé d'individus susceptibles (**De paola et al., 2002**).

L'utilisation d'instruments à haute vitesse (seringue à air-eau, détartreur ultrasonique) au cours des traitements en cabinet génère des aérosols. Ces particules en suspension contiennent des bactéries provenant de la bouche des patients traités et possiblement des systèmes d'eau (**Duchaine et al., 2005**).

Il existe quatre façons par lesquelles les microorganismes d'origine hydrique peuvent provoquer une infection chez le patient subissant une intervention dentaire :

La diffusion hémotogène pendant l'intervention chirurgicale, le contact (buccal ou conjonctivale) avec la muqueuse locale, l'ingestion et l'inhalation (**Renaud *et al.*, 2009**).

Le détachement de microorganismes du biofilm de l'unité dentaire pourrait théoriquement infecter le patient en se jetant dans la cavité buccale (**Barbeau *et al.*, 1996**).

III. Matériel et méthode

1 Lieu d'étude :

Ce travail a été réalisé au niveau de laboratoire de microbiologie appliquée de l'université de Belhadj BOUCHAIB-Ain Temouchent.

2 Prélèvements :

2.1 Lieu de prélèvement d'échantillon :

L'échantillon prélevé a été réalisé à la clinique dentaire Al-Sebbah, EPSP de Ain Temouchent .

2.2 Echantillonnage :

De 26 février à 24 mars 2020 nous avons réalisé notre travail dans laboratoire de l'université Belhadj BOUCHAIB Ain Temouchent, après un consentement du médecin chef de la clinique dentaire et la collaboration du technicien responsable, nous avons retiré 5 tubulures d'eau accordées aux fauteuils de l'unité dentaire, que nous avons placé tout de suite dans des sachets stériles et transporté immédiatement au laboratoire pour être tout de suite analysées.

3 Préparation des échantillons des tubulures :

Dans la zone stérile et après une désinfection de la surface externe de 5 tubulures issue de différents parties des unités dentaires avec l'eau de javel et un rinçage avec l'eau distillé stérile afin d'éliminer toute trace résiduelle du désinfectant. Chaque tubulure était coupée à une longueur environ 10 centimètre.

4 Isolement et enrichissement d'espèces bactériennes :

Les 5 échantillons sont pistés à l'aide d'un ciseau stérile et mis séparément dans des tubes stériles contenant 9mL de bouillon BHIB (Brain Heart Infusion Broth) puis ont subi une agitation par le vortex pendant 30 secondes. Tous les tubes sont incubés ensuite à 37°C pendant 24 heures.

5 Isolement et identification des souches de *Staphylocoques*, entérobactéries de tubulure d'eau dentaire :

Identification bactériennes a concerné uniquement les *Staphylocoques* et les entérobactéries. A partir de bouillon BHIB et à l'aide d'une anse stérile, 20µL est ensemencé sur un milieu Chapman et sur un milieu Mac Conkey. Les boîtes ensemencées sont incubées à 37°C pendant 24 heures pour les *Staphylocoques* et 48 heures pour les entérobactéries.

6 Purification et identification des souches :

La purification des bactéries est réalisée par l'ensemencement d'une seule colonie sur une autre boîte de milieu gélosé jusqu'à l'obtention de souches pures qui seront identifiées par :

- L'étude des caractères macroscopiques (l'aspect des colonies sur milieux gélosés).
- L'étude des caractères microscopiques (la forme des colonies, coloration de gram).
- Test de la coagulase pour l'identification des *Staphylocoques*.
- L'étude des caractères biochimiques (la méthode API 20E).

6.1 Etude des caractères macroscopiques :

La gélose Mac Conkey est un milieu d'isolement ordinaire, lactosé et sélectif des bacilles à Gram négatif, la présence de lactose et de rouge neutre permet de connaître le caractère lactose des bactéries :

Les micro-organismes apparaissent sous forme des colonies rouges sont lactose positif.

Les micro-organismes apparaissent sous forme des colonies jaunes ou incolores sont lactose négatif.

La gélose Chapman est le milieu sélectif des bactéries halophiles et plus particulièrement fermentant le mannitol, il est utilisé pour l'isolement des *Staphylococcus* :

Le virage au jaune de milieu signifie les colonies sont mannitol positif.

Pas de virage de milieu signifie les colonies mannitol négatif.

6.2 Etude des caractères microscopiques :

La coloration de gram est réalisée à partir des colonies isolées sur milieu de Chapman et Mac Conkey, afin d'observer le mode de regroupement des coques et des bacilles.

6.3 Test de coagulase pour l'identification des Staphylocoques :

6.3.1 Préparation de suspension bactérienne :

A l'aide d'une anse stérile prélever une colonie bactérienne jeune, puis faire dissocier dans un tube contenant 5mL de bouillon BHIB, incuber les tubes préparés à 37°C pendant 24 heures.

6.3.2 Test de coagulase :

A l'aide d'une micropipette stérile prendre un volume de 500µL de suspension bactérienne et verser dans des tubes à hémolyse contenant 500µL de plasma et incuber à 37°C pendant 24h.

7 Evaluation de la formation du biofilm par la technique TCP chez les souches de

Staphylocoques à coagulase positif :

Cette partie l'expérimentation à portée sur la détection de la formation de biofilm chez les souches isolées de *Staphylocoques*. La méthode employée est celle de la technique de microplaque 96 puits par coloration au cristal violet (**Christensen *et al.*, 1985**).

Les bactéries ont été cultivés en milieu BHIB et incubées 24 heure à 37°C et diluées au 1/100 ème dans le même milieu (BHIB) afin d'obtenir une suspension bactérienne équivalente à 10⁸ UFC/mL par l'ajustement de l'absorbance à 0.08-0.1 à une longueur d'onde de 570 nm.

Les puits stériles d'une microplaque de 96 puits (polystyrène) sont remplis avec 150µL de milieu BHIB ensuite remplis avec 20 µL de la dilution. Les microplaques sont recouvertes puis incubées pendant 24 heures à 37°C.

Après l'incubation, les puits des microplaques sont vidés, rincés trois fois consécutives avec l'eau stérile pour éliminer les bactéries libres planctoniques, séchés en position inversés sur un papier absorbant puis colorés avec 200µL de cristal violet à 0.5%, et incubés pendant 30min.

Après l'incubation de la microplaque, l'excès du cristal violet est éliminé par cinq lavages successifs avec l'eau stérile, puis séchée sur un papier absorbant.

En fin, les puits sont remplis de nouveau avec une solution d'éthanol. La quantité de cristal violet solubilisée est mesurée par la lecture de la densité optique à 570 nm dans une lecture ELISA Auto Reader. Les souches ont été classées selon les valeurs de la DO (tableau 3).

Tableau 3 : Interprétation du résultat de la méthode TCP (**Abdel Halim *et al.*, 2018**).

Valeurs de la DO	Formation de biofilm
< 0.120	Pas production de biofilm
0.120 - 0.240	Biofilm modéré
> 0.240	Fort production de biofilm

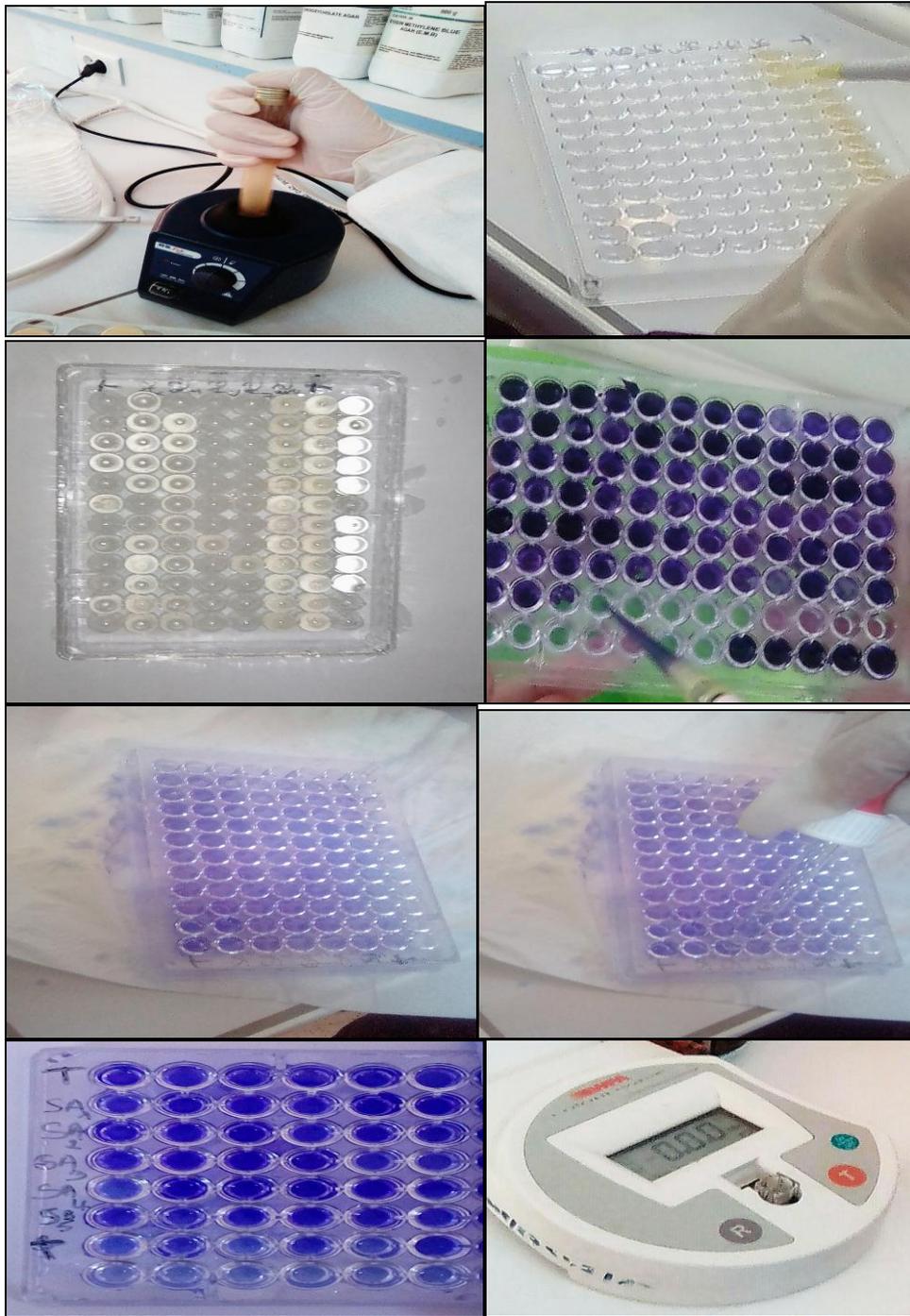


Figure 7 : Méthode des microplaques TCP

IV. Résultats et discussion

1 Prélèvements :

5 tubulures d'eau étaient retirées des fauteuils de l'unité dentaire, et placées tout de suite dans des sachets stériles et transportées immédiatement au laboratoire pour être tout de suite analysées.

2 Identification bactérienne :

5 échantillons de différents tubulures d'eau ont été placés dans des tubes contenant 9ml de bouillon BHIB après le détachement des bactéries par vibration, 20µL de chaque suspension a été ensemencé sur les deux milieux sélectifs (Mac Conkey et Chapman).

Après 24 heures d'incubation sur milieu Chapman à 37°C, les colonies de *Staphylocoques* apparaissent assez grandes d'environ 1mm de diamètre, rondes, régulières, lisses et brillantes, le plus souvent pigmentées jaunes dans le cas où le mannitol est fermenté (Figure 8), d'autres colonies de couleur blanche étaient également retrouvées (Figure 9).



Figure 8: *Staphylocoques* dorées isolées sur milieu de Chapman.



Figure 9 : *Staphylocoques* blanc isolées sur milieu de Chapman.

- L'aspect des colonies sur milieu Chapman et la coloration de Gram ainsi le test de coagulase nous ont permis d'identifier 10 souches isolées des 5 tubulures d'eau de l'unité dentaire, qui appartiennent au genre *Staphylococcus* dont 6 étaient des *Staphylococcus* à coagulase positif et 4 *Staphylococcus* à coagulase négatif.

L'aspect des colonies sur milieu Mac Conkey, la coloration de Gram ainsi la galerie biochimique API 20E nous ont permis d'identifier 14 bacilles à Gram négatif se répartissant comme suit :

- 4/14 *Pseudomonas putida* (29%).
- 3/14 *Acinetobacter baumannii* (22%).
- 2/14 *Escherichia coli* (14%).
- 3/14 *Enterobacter cloacae* (21%).
- 2/14 *Klebsiella pneumoniae* (14%).

Les principaux aspects macroscopiques des isolats obtenus sur milieu Mac Conkey utilisé sont présentés dans la (Figure 12).



Figure 12 : Aspect des colonies sur milieu Mac Conkey.

- 1) : *Acinetobacter baumannii*, 2) : *Klebsiella pneumoniae*,
 3) : *Enterobacter cloacae*, 4) : *Pseudomonas putida*, 5) : *Escherichia coli*.



Figure 13 : Aspect microscopique des bacilles à gram négatif par coloration de gram.

3 Evaluation de la formation du biofilm par la technique TCP chez les *Staphylocoques* à coagulase positif :

La technique de microplaque 96 puits (TCP) a révélé que sur les 5 souches de *Staphylococcus* à coagulase positif isolées de différents fauteuils dentaires 3 étaient de bonnes formatrices de biofilm, 2 étaient moyennement formatrices.

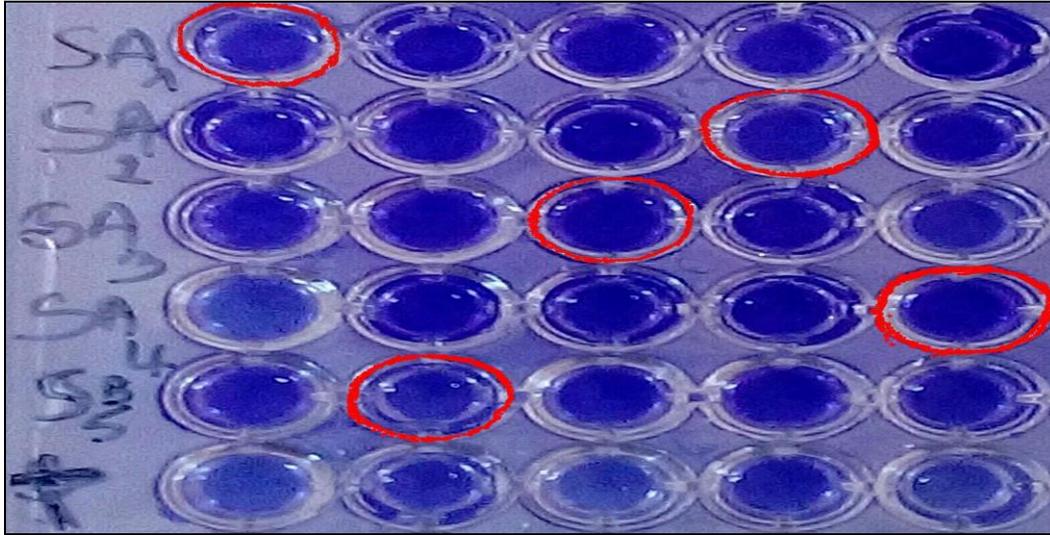


Figure 14 : Résultat de la formation de biofilm chez les souches de *Staphylocoques* isolées des tubulures d'eau dentaire.

Les valeurs de densité optique (DO) de chaque isolat ont été interprétées selon le tableau suivant pour évaluer le degré du biofilm (Tableau 4) :

Tableau 4 : Classification de l'adhérence bactérienne par la technique TCP.

Tubulures	Valeurs DO	Adhérence	Formation de biofilm
T1	0.2	Modéré	Modéré
T2	0.3	Fortement adhérence	Fortement formatrice
T3	0.5	Fortement adhérence	Fortement formatrice
T4	0.3	Fortement adhérence	Fortement formatrice
T5	0.2	Modéré	Modéré

Les études de (Pankhurst *et al.*, 1998) et (Walker *et al.*, 2000) ont montré que la concentration bactérienne dans l'eau des unités dentaires variait de 10^4 à 10^8 UFC /mL et l'American Dental Association (ADA) a proposé que la concentration bactérienne de l'eau en provenance des unités dentaires ne doit pas dépasser les 200 UFC/mL vu que nos résultats ne respectent pas ces normes, cela démontre que l'eau d'approvisionnement qui circule dans les tubulures à pièce à main de l'unité dentaire Al-Sabbah Ain Temouchent est de mauvaise qualité bactériologique.

Après l'identification de l'ensemble des souches isolées des tubulures d'eau de l'unité dentaire, nous constatons que les *enterobactéries* occupent une place importante, telle les *Acinitobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas putida*, *E.coli* et *Klebsiella pneumoniae*.

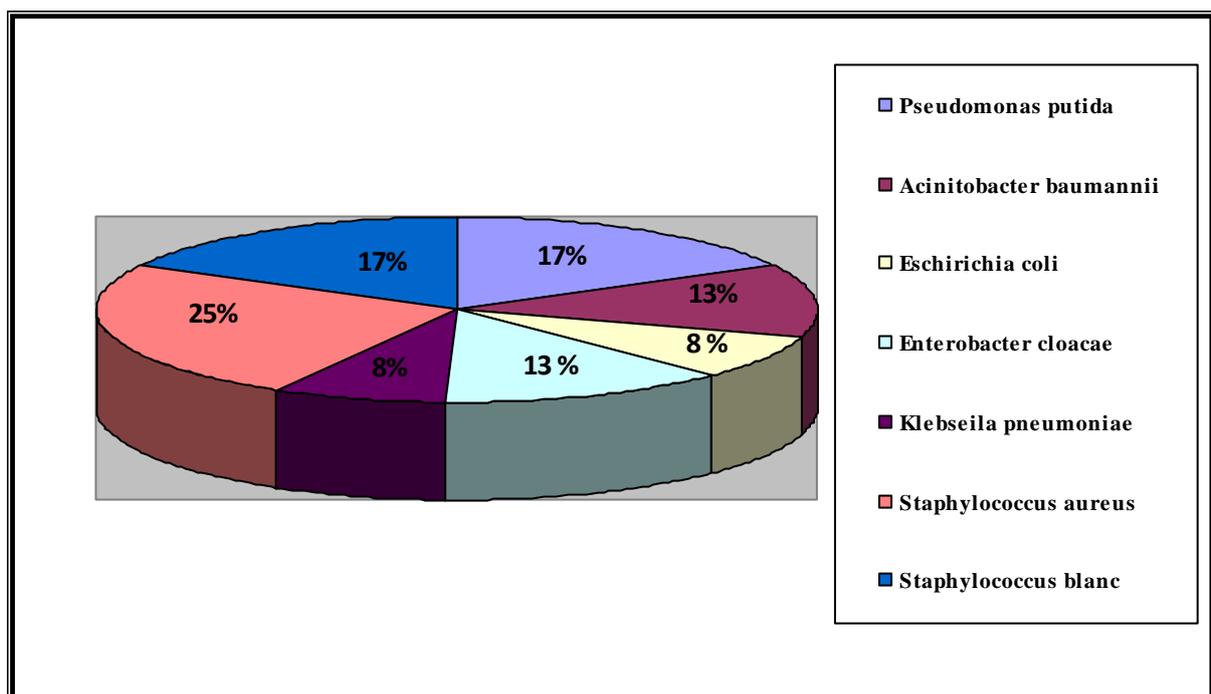


Figure 15 : les différentes souches isolées des tubulures d'eau de l'unité dentaire Al-Sabbah Ain Temouchent.

L'étude de (Pankhurst *et al.*, 1998) signale que ces mêmes microorganismes sont les plus fréquemment retrouvés dans l'eau des unités dentaires.

La recherche (**Dekic et al., 2014**) confirment que *Acinitobacter baumannii* est un pathogène opportuniste humain émergent, persiste dans l'environnement pendant quelques mois (**Espinal et al., 2012**).

Plusieurs isolats d'*Acinitobacter baumannii* récupérés dans le milieu aquatique naturel (**Girlich et al., 2010**) et de la rivière (**Music et al., 2017**) ainsi que les eaux d'affluence et les effluents de station d'épuration des eaux usées (**Hrenovic et al., 2016**).

Le genre *Staphylococcus* était classé dans la famille des micrococaceae, dans l'édition du (**Manual, 1986**), Il est composé de 39 espèces et sous espèces.

Les *staphylocoques* à coagulase négatif sont couramment impliqués au cours des infections nosocomiales associées aux soins, en particulier sur matériel médical, leur implantation dans le microbiote cutanio-muqueux et leur capacité à synthétiser un biofilm protecteur sont les principaux déterminants du pouvoir pathogène de ces bactéries opportunistes (**Ahoyo et al., 2013**).

Les *Staphylocoques* souvent considérés comme flore orale peuvent coloniser tout le long de la paroi interne de la tubulure (**Lgius et al., 2012**).

Nos résultats concordent avec l'étude d'**O'Donnel** en **2011** où il signale la présence de *Staphylocoques* au niveau des tubulures d'eau dentaire. Notre étude est aussi similaire avec celle de **Lachachi et al., 2014**.

D'autre part **Costa et al., 2016** démontrent que les circuits d'eau dentaire sont universellement contaminés par une flore microbienne très riche regroupant de nombreuses bactéries tels les *Staphylocoques* et les niveaux de cette contamination sont variables d'un unit de soin dentaire à un autre.

En ce qui concerne l'espèce d'*Acinitobacter baumannii*, cette bactérie est fréquemment retrouvée en milieu hospitalier dans des milieux aqueux et humides. Une autre particularité propre à cette bactérie est sa faculté à survivre de façon prolongée dans un environnement sec (sols, surfaces, matériel de literie). A la différence d'autres espèces d'*Acinitobacter* qui sont des colonisant habituels de la peau, (**Jans et al., 2004**).

Les circuits d'eau des unités dentaires ne sont pas totalement exempts de contamination, les biofilms microbiens sont une source importante de celle-ci et d'infection croisée dans l'environnement des cliniques dentaires (**Rodrigues et al., 2017**).

La technique TCP a révélé que les souches de *Staphylocoques* sont fortement et modérément formatrices du biofilm avec une DO respective de 0.2 à 0.5.

Effectivement si on se réfère à **Abdel Halim et al, 2018** les souches présentant des DO inférieure à 0.12 sont considérées non formatrices du biofilm, celles ayant une moyenne de DO entre 0.12 et 0.24 sont considérées modérément formatrices de biofilm. Les souches présentant des DO supérieure à 0.24 sont alors de bonnes formatrices de biofilm.

La méthode TCP est toujours considérée comme un test standard pour la détection de la formation de biofilm [(**Mathur et al., 2006**) ; (**Gad et al., 2009**)].

La nature de la surface des tuyaux et la température de l'eau dans les tubulures qui se situe entre 20 et 25°C sont des conditions qui favorisent la multiplication bactériennes [(**Mathur et al., 1998**) ; (**Donlan et al., 2002**)].

Abdel Halim et al., 2018 indiquent que La formation de biofilm est considérée comme une cause importante de toutes les espèces *Staphylococciques* associées à l'infection des dispositifs biomédicaux.

Christensen et al, 1985 ont décrit la méthode de la plaque de culture tissulaire pour la mesure quantitative de la production de biofilm chez *Staphylococcus Spp.*

Les études d'**Abdel Halim et al 2018** ont montrés que Cette méthode a donné la meilleure distinction entre forte, modérée et non-production de biofilm car elle utilisait des valeurs limites.

Mathur et al, 2006 indiquent que la méthode TCP est une méthode précise et reproductible pour le dépistage et que cette technique put servir d'outil quantitatif fiable pour déterminer la formation de biofilm par des isolats cliniques de *Staphylocoques*.

Mathur et al., 2006 ont conclu que cette méthode ne peut pas être recommandée pour la détection de la formation de biofilm par les isolats cliniques des *Staphylocoques*.

V. Conclusion

Conclusion :

Les résultats obtenus au cours de ce travail démontrent que les USD sont universellement contaminés par une flore bactérienne très riche regroupant de nombreuses bactéries tels les *Staphylocoques* d'origine buccale et les enterobactéries d'origine hydrique.

Les genres bactériens les plus fréquents appartiennent aux bacilles à Gram négatif sont : *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas putida*, *E.coli* et *Klebsiella pneumoniae*, dont la plupart sont capables de former un biofilm avec un pourcentage de 14/24. La colonisation bactérienne des tubulures d'eau dentaire est un phénomène qui reste inévitable.

Il est important de rappeler que la contamination microbiologique d'origine buccale et hydrique des parois internes des tubulures d'eau des unités dentaires peut être la cause principale de la formation du biofilm, le détachement de ce dernier est la source d'infections chez les patients et l'équipes dentaires.

Pour ce faire, le nettoyage et la stérilisation des unités de soins dentaires doit s'effectuer dans des conditions standardisées (ventilation, traitements, etc.).

L'application des mesures d'hygiène et d'asepsie au cabinet dentaire ou milieu hospitalier est une obligation pour les chirurgiens-dentistes.

Les membres de l'équipe de soins bucco-dentaires sont obligés de prendre les mesures adéquates pour se protéger ainsi que leurs patients.

La colonisation bactérienne au niveau des tubulures d'eau des unités dentaires est un phénomène qui reste inévitable. Compte tenu de l'ampleur des risques pour la santé humaine, Il est nécessaire de :

- Respecter strictement les instructions approuvées et recommandées par les autorités locales pour le nettoyage, la désinfection, la stérilisation des instruments et appareils utilisés.
- S'assurer que les instruments stériles sont protégés de la contamination en utilisant un emballage de protection.
- Utiliser des instruments à usage uniques si la stérilisation n'est pas possible.
- Nettoyer et désinfecter systématiquement toutes les surfaces exposées dans l'environnement professionnel.
- Porter des gants et un masque facial appropriés.
- Porter des lunettes avec protection latérale.
- Porter des vêtements cliniques de protection appropriée.

- Aérer le cabinet dentaire à la sortie de chaque patient pour diminuer la concentration des bioaérosols au niveau de cabinet dentaire.

En perspective de ce travail, nous proposons de faire un traitement des eaux des unités dentaires par un désinfectant à base de substances naturelles efficace qui permettra d'obtenir une eau de qualité satisfaisante pour l'usage dentaire et éviter la colonisation des bactéries.

VI. Référence bibliographique

- **Ahoyo TA., Pazo E., Moussa L., Gbohoun A., Boco M., Dramane K., Aminou T. (2013).** Staphylococcus sciuri outbreak at Tertiary Hospital in Benin, *J Med Microb Diagn*, 2:3.
- **Abdel Halim R.M., Nevine N. K., Mahmoud B.S. (2018).** Detection Of biofilm producing Staphylococci among Different clinical Isolates and relation to Methicillin Susceptibility, *Open access Macedonian Journal of medical Sciences*, 6(8):1335-1341.
- **Barbeau J. (2007).** Poursuite judiciaire contre un dentiste concernant une infection oculaire grave possiblement liée à l'eau de la turbine, *Journal de l'Association dentaire canadienne*, 7, 618-622.
- **Caroline L., Pankhurst., Johnson N.W. (1998).** Microbial Contamination of dental Unit waterlines, the scientific argument, *Intrnational dental journal*, 48, 359-368.
- **Christensen G.D., Simpson WA., Younger J.J., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M., Beachey E.H. (1985).** Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices, *Journal of clinical Microbiology*, 22,996-1006.
- **Coleman D., O'Donnell M. J., Shore A.C., Russell R.J. (2009).** Problems in dental unit water systems and its practical control, *Journal of applied microbiology*, 106, 1424-1437.
- **Duchaine C., Dutil S., Mériaux A., Marie-Chantale., Leduc A., Lazure L., Barbeau J. (2005).** Caractérisation des bioaérosols en Cabinet dentaires.
- **Dutil S., Veillette M., Mériaux A., Lazure L., Barbeau J., Duchaine C. (2007).** Aerosolization of mycobacteria and legionellae during dental treatment : low exposure despite dental unit contamination, *Environmental Microbiology*, 9: 2836-2843.
- **De paola LG., Mangan D., Mills S.E., Costerton W., Barbeau J., Shearer B., Bartlett J. (2002).** A review of the science regarding dental waterlines, *Journal of the American Dental Association.*, 133:1199-1206.
- **Damien C. (2015).** Analyse de l'écologie microbienne des conduites d'eau d'units de soins dentaires du grand Poitiers.
- **Dekic S., Hrenovic J., Goic-Barisic I., Kovacic A., Ganjto M., Ivankovic T. (2014).** Survival of Acinitobacter baumannii in natural water media, *Natural habitat of clinically important Acinitobacter baumannii*, 09-5656.
- **Donlan R.M., Costerton J.W. (2002).** Biofilms: survival mechanism of clinically relevant microorganism, *Clinical Microbiology Reviews*, 15: 167-193.

- **Espinal P., Marti S., Vila.J. (2012).** Effect of biofilm formation on The survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces, *J.Hosp Infect*, 80(1):56-60.
- **Girlich D., Poirel L., Nordman P. (2010).** First isolation of the blaOXA-23 carbapenemase gene from an environmental *Acinetobacter baumannii* isolate. *Antimicrob.Agents Chemother*, 54(1)578-579.
- **Gaultier L. (2016).** Etude de l'évolution de la santé des chirurgiens dentistes face aux risques professionnels depuis 1980 (thèse de doctorat) université de Rennes.
- **Gad G.M., El-Feky M.A., El-Rehewy M.S.,Hassan M.A., Abolella H., El-Baky R.A. (2009).** Detection of icaA, icaD genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients, *The Journal of Infection in developing Countries*, 3:342-351.
- **Hrenovic J., Goic-Barisic L., Kazazic A., Ganjto M., Tonkic M. (2016).** Carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in a municipal wastewater treatment plant, Croatia, 2014.
- **Jans B., Glupczynski Y., Suetens C., Van Cleemput E. (2004).** Enquête épidémiologique relative à *Acinetobacter baumannii* producteur de BLSE (Type VEB-1) en biologie.
- **Liaqat I. (2017).** Dental Unit water lines, Biofilm formation and disinfection Measures, *Acta scientific dental sciences*, 1(4):01.
- **Liaqat I., Sabri A.N. (2011).** Biofilm, dental unit water line and its control, *African Journal of clinical and experimental microbiology*, 12(1):15-21.
- **Legius B., Van Landuyt K., Verschueren P., Westhovens R. (2012).** Septic Arthritis Due to *Staphylococcus Warneri*: A Diagnostic Challenge, *The Open Rheumatology Journal*, 6:310-311.
- **Lachachi M., Hassaine H., Nayme K., Bellifaà S., M'hamedi I.,Terki KI., Timinouni M. (2014).** Detection of biofilm formation, icaADBC gene and investigation of toxin genes in *Staphylococcus* Spp. Strain from dental unit Waterlines, University hospital center (UHC) Tlemcen Algeria, *Journal of research of microbiology*, 6: 559-565.
- **Ma Mei S., Zalini Y., Ahmad Razi M.Y., Zukri A., Haryanti T. (2012).** The microbiological quality of water from dental unit Waterlines in Malaysian Armed Forces dental centres, *The Journal of the school of dental sciences universiti sains Malaysia, arch orofac sci*, 7(1):14-20.
- **Mathur T., Sinighal S., Khan S., Upadhyay DJ., Fatma T., Rattan A. (2006).**

Detection of Biofilm Formation Among the clinical isolates of staphylococci: Anevaluation of three Different Screening Methods, *Indian journal of medical Microbiology*, 24(1):25-9.

- **O'Donnell MJ., Boyle MA., Ressel RJ., Coleman RJ. (2011).** Future Microbiol, 10 :1209-1226.
- **O'Donnel MJ., Russel RJ., Coleman RJ. (2011).** Futur microbial, 10 : 1209-1226.
- **Offner D., A. -M. Musset. (2018).** L'hygiène des units dentaire : la sécurité des patients à Proprement parler, *Ros, Rev odont stomat*, 47 :158-171.
- **Renaud J., Gonzalez M., Mounier O., Mousset A., Mathis R., Haikel Y. (2009).** Contamination bactériennes des réseaux d'eau au cabinet de chirurgie dentaire, *Revue Belge de Médecine Dentaire*, 64 :1-4.
- **Seruga Music M., Hrenovic J., Goic-barisic I., Hunjak B., Korivc D., Ivankovic T. (2017).** Emission of extensively-drug resistant Acinitobacter baumannii from hospital settings to the natural environment. *J.Hosp. Infect.doit*: 10.1016 /j .jhin. 2017.04.005.
- **Szymńska J., Sitkowska J., Dutkiewicz J. (2008).** Microbial Contamination of dental unit water lines, *Ann Agric environ med*, 15, 173-179.
- **Towner KJ. (2009).** Acinitobacter: an old friend, but a new enemy, *J Hosp.Infect* 73(4):355-363.
- **Walker J.T., Bradshaw D.J., Bennett A.M., Fulford M.R., Martin M.V., March P.D. (2000).** Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general practice, *Applied and Environmental Microbiologie*, 66:3363-3367.

