

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة 8 ماي 1945 قالمة

Université 8 Mai 1945 Guelma

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'obtention du diplôme de MASTER

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Département : Écologie et Génie de l'Environnement

Thème

Les risques infectieux dans les laboratoires de microbiologie

Présenté par :

BOUSSAHA Samira

YESSAAD Malika

Devant le Jury composé de :

Président :	RAMDANI Kamel (MCB)	Université de Guelma
Encadreur :	HOUHAMDI Moussa (Prof.)	Université de Guelma
Co-encadreur :	KIRAT Hassina (Doctorante)	Université de Skikda
Examineur :	MERZOUG Abdelghani (MCB)	Université de Guelma

Année universitaire 2021-2022

DÉDICACES

Je dédie ce mémoire

À mes chers parents

*Pour leur confiance et leur sacrifice compréhension, leur patience, leur amour inestimable,
leur soutien et leurs encouragements.*

Je souhaite que dieu les garde en bonne et parfaite santé et leur donne une longue vie.

À ma chère sœur

Pour son soutien et sa gentillesse.

À mes chers frères

Pour leur soutien et leur confiance

À mon cher mari

Pour ses conseils et son soutien

À mon binôme«Malika»

Je la remercie pour le courage qu'elle m'a donné et tous les moments qu'on a passé ensemble

À tous ceux qui m'ont aidé de près ou de Loin lors de la réalisation de ce travail

Merci à tous

Samira

DÉDICACES

Je dédie ce mémoire

A mes chers parents

Pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse,

Leur soutien et leur prières tout au long des mes études

A mes chères frères et leurs enfants

source de joie et de bonheur

A toute ma famille, source d'espoir et de motivation

A Samira

Chère amie avant d'être binôme

Pour ton support et ton amour

Et au final à toutes personnes qui m'ont aidé de près ou de loin

Malika

Remerciements

*Notre premier remerciement va à **ALLAH**, le tout puissant qui nous a aidés pour réussir à nos choix dans cette vie et réaliser ce modeste travail.*

Nous tenons particulièrement à remercier notre promoteur et directeur de mémoire

*Professeur Mr: **HOUHAMDI Moussa***

Nous le remercions de tout cœur, mais ce n'est pas pour avoir fait l'honneur d'accepter de diriger ce travail seulement, nous le remercions pour le partage des savoirs de la vie et la connaissance avec nous, pour la patience et la confiance, pour la disponibilité et de son grand aide durant la réalisation de ce travail. Merci pour les encouragements qui nous ont indiscutablement permis d'évoluer.

Nous souhaitons aussi à remercier tous les membres de jury présent aujourd'hui.

*Au Dr : **RAMDANI Kamel (MCB)** Pour l'honneur qu'elle nous a fait en présidant ce jury.*

*et Dr: **MERZOUG Abdelghani (MCB)** Pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

J'adresse mes sincères remerciements à tous les professeurs, intervenants et toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé nos réflexions et ont accepté à nos rencontrer et répondre à nos questions durant notre Parcours et nos recherches.

A la fin nous remercions tous nos collègues et particulièrement ceux et celles de notre promotion.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Liste des abréviations

AMC : Amoxyclav

AMX : Amoxicilline

C : Chloramphénicol

E : Erythromycin

GEN : Gentamycine

MH : Mueller Hinton

P : Pénicilline

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
01	Consignes avant d'entrer dans la salle	8
02	Consignes avant le début de la manipulation	9
03	Consignes pendant la manipulation	9
04	Consignes Après la manipulation	10
05	Liste des antibiotiques utilisés	21
06	Résultats de lecture macroscopique des colonies après culture	25
07	Nombre des germes isolés	27
08	Résultats de l'observation microscopique après coloration	28
09	Résultat de l'observation microscopique après coloration	29
10	Résultats des tests « Catalase, Oxydase »	30
11	Résultats des tests coagulases	31
12	Fréquences des bactéries isolées	33
13	Résultats de l'antibiogramme de <i>Enterobacter cloacae</i>	34
14	Résultats de l'antibiogramme de <i>Staphylococcus xylosus</i>	35
15	Résultats de l'antibiogramme de <i>Myroide spp</i>	37

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Laboratoire de microbiologie	2
02	Exemple de tenue de protection individuelle	4
03	Pictogramme utilisés pour caractériser les propriétés des gants, la technique de retrait des gants	6
04	Illustration d'un masque médical et d'un appareil de protection respiratoire	7
05	Technique standardisée de friction des mains	7
06	Récipient contenant un liquide biologique cassé	11
07	Contamination par contact	11
08	Les prélèvements	13
09	L'isolement d'échantillons	14
10	Ensemencement par stries	15
11	Test de catalase	17
12	Test d'oxydase	17
13	Protocole d'utilisation de système (API 20E)	18
14	Lecture de l'antibiogramme	21
15	Aspect macroscopique sur gélose nutritive	26
16	Aspect macroscopique sur gélose Chapman	26
17	Aspect macroscopique sur gélose Mac Conkey	27
18	Nombre de germe isolé	27
19	Observation microscopique des cocci Gram positif en amas après coloration de Gram	28
20	Observation microscopique des bacilles Gram négatif après coloration de Gram	29
21	Résultats de l'observation microscopique après coloration	29
22	Résultat de catalase positive (+)	30
23	Résultat d'oxydase négative (-)	30
24	Résultat d'oxydase positive (+)	31
25	Résultats des tests coagulases pour les souches de <i>Staphylococcus</i>	31

26	Résultat API 20 E de la souche <i>Enterobacter cloacae</i>	32
27	Résultat API STAPH de la souche <i>Staphylococcus xylosus</i>	32
28	Résultat API 20 NE de la souche <i>Myroide spp</i>	32
29	Api STAPH de la souche <i>Staphylococcus xylosus</i>	32
30	Api 20 E de la souche <i>Enterobacter cloacae</i>	32
31	Api 20 NE de la souche <i>Myroide spp</i>	33
32	Pourcentage des espèces présentes	33
33	Antibiogramme du germe <i>Enterobacter cloacae</i>	34
34	Représentation graphique des résultats de l'antibiogramme appliquée à <i>Enterobacter cloacae</i>	34
35	Antibiogramme du germe <i>Staphylococcus xylosus</i>	35
36	Représentation graphique des résultats de l'antibiogramme appliquée à <i>Staphylococcus xylosus</i>	35
37	Antibiogramme du germe <i>Myroide spp</i>	36
38	Représentation graphique des résultats de l'antibiogramme appliquée à <i>Myroide spp</i>	36

Sommaire

Dédicaces

Remerciements

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

1. Définitions	2
1.1. Laboratoire de microbiologie	2
1.2. Risque infectieux	2
2. Infections acquise au laboratoire	2
2.1. Type d'infections	2
2.1.1. Infection Bactériennes	2
2.1.2. Infection virale	3
2.1.3. Infection fongique et parasitaires	3
3 Les voies de contamination	3
3.1. Voie aérienne	4
3.2. Voie digestive	4
3.3. Voie cutanée et oculaire	4
4. Stratégie de la maîtrise du risque infectieux	4
4.1. Protection individuelle	4
4.1.1. La tenue de travail	4
4.1.2. Ports des gants	5
4.1.3. Masque et lunette	6
4.2. D'infection des mains	7
4.3. D'infection des paillasse	8
4.4. Vaccination	8
5 Le bonne pratique du personnel	8
6 Mesure de contamination	10

Chapitre II : Matériel et Méthodes

1. Cadre d'étude	13
-------------------------	-----------

2. Objectif	13
3. prélèvements	13
4. Enrichissement	13
5. Isolement	13
5.1. Milieux gélosés utilisés	14
5.1.1. Gélose nutritive	14
5.1.2. Gélose Chapman	14
5.1.3. Gélose Mac Conkey	14
5.2. Ensemencement par stries parallèles	14
6. Etude microbiologique	15
6.1. Caractère morphologique	15
6.1.1. Observation macroscopique	15
6.1.2. Observation microscopique	16
6.2. Identification biochimique	16
a. Recherche de la catalase	16
b. Test d'oxydase	17
c. Test coagulase	18
d. Les galeries d'identification biochimique	18
6.3. Etude de la sensibilité et la résistance bactérienne	20
6.3.1. Préparation d'inoculum	20
6.3.2. Milieu d'ensemencement	20
6.3.3. Technique d'inondation	20
6.3.4. Application des disques	20
6.3.5. Incubation	20
6.3.6. La lecture	20

Chapitre III : Résultats et Discussion

1. Caractères macroscopiques	25
2. Observation microscopique	28
3. Identification	30
3.1. Test préliminaires (catalase, oxydase, coagulase)	30
3.2. Résultats des Tests biochimiques (API 20E, API 20NE, API STAPH)	32
4. L'antibiogramme	34

Conclusion

38

Références Bibliographiques

Annexes

Résumé

Introduction

Les agents infectieux sont les micro-organismes capables d'envahir et de se multiplier au sein des tissus des organismes vivants (animaux ou végétaux). Ces micro-organismes peuvent causer des maladies lorsque leur multiplication n'est pas contrôlée par l'immunité de l'organisme cible. Ces organismes sont transmissibles, autrement dit un individu sain peut s'infecter au contact d'un individu infecté (**Podglajen, 2020**).

Au cours de la manipulation dans un laboratoire de microbiologie on peut contracter un certain nombre de risques. Parmi lesquels, le risque infectieux est lié à la manipulation d'agents potentiellement pathogènes ou des produits biologiques contaminés par des agents pathogènes que ce soit bactérie, virus, parasite ou champignon et qui peut se faire par différentes voies : aérienne, digestive ou cutaneo-muqueuse (**Teyssou, 2001**).

Notre démarche désignée dans la recherche des microorganismes pathogènes dans les locaux du laboratoire de microbiologie de l'Université 8 Mai 1945 de Guelma est structurée en trois chapitres interdépendants :

- Le premier est dédié à la partie théorique où sont exposées des données sur les bactéries pathogènes et leurs risques sanitaires.
- Le deuxième décrit la méthodologie suivie pour la réalisation pratique de ce thème, soit les prélèvements, les études macro et microscopique des souches isolées et l'étude de leur sensibilité aux agents antimicrobiens standardisés.
- Le troisième expose les résultats obtenus et leur discussion. Il est suivi par une Conclusion générale qui clôture cette étude.

Synthèse
Bibliographique

1. Définitions

1.1. Laboratoire de microbiologie

Un laboratoire de microbiologie est un lieu où sont prélevés et analysés divers fluides biologiques d'origine humaine ou animale sous la responsabilité des biologistes médicaux, qui en interprètent les résultats dans le but de participer au diagnostic et au suivi de certaines maladies (**Bouhma, 2020**).



Figure 01. Laboratoire de microbiologie (**Bouhma, 2020**).

1.2. Risque infectieux

C'est un risque d'infection lié à l'exposition à des agents biologiques, Il peut en résulter des maladies professionnelles (**Bouhma, 2020**).

2. Infections acquise au laboratoire

2.1. Type d'infection

2.1.1. Infections bactériennes

➤ Entérobactéries

Les Entérobactéries appartiennent à une grande famille qui regroupe des bacilles à Gram Négatif (BGN). Cette famille comporte plusieurs genres, espèces et sérotypes.

La classification récente (hybridation ADN-ADN) recense 31 genres et plus de 140 espèces.

Parmi les genres et espèces décrits, une vingtaine est impliquée en pathologie humaine: *Escherichiacoli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Entérobacter*, *Proteus*.

➤ **Staphylococcus**

Les Staphylocoques sont des cocci à Gram positif très résistants dans le milieu extérieur. Le genre *Staphylococcus* comporte deux espèces :

- *Staphylococcus aureus* (le *Staphylocoque* à coagulase positive) qui possède un potentiel de pathogénicité important, impliqué dans les infections communautaires et nosocomiales.
- Staphylocoques à coagulase négative: pathogènes opportunistes impliqués dans les Infections nosocomiales (**Sompiev, 2017**).

2.1.2. Infections virales

Les risques viraux majeurs au laboratoire concernent les virus transmis par le sang et les liquides biologiques, en particulier les virus des hépatites B et C et le virus d'immunodéficience acquise (VIH). Le risque de transmission régresse grâce à l'automatisation des techniques qui réduit dans certains secteurs de biologie les expositions directes, et grâce à l'application des précautions standards de sécurité, ainsi qu'à la vaccination hépatite B. Actuellement en 2020 durant la pandémie causé par le virus SARS COV-2 (nouvelle dénomination nCov-2019) de la famille des coronavirus, qui était ajouté aux risques viraux majeurs au laboratoire vu la variabilité de ces voies de transmission (**Bouhna, 2020**).

2.1.3. Infections fongiques et parasitaires

Les rares infections fongiques décrites sont dues aux champignons *Dismorphiques*: *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioïdes immitis* et *Histoplasma capsulatum*, très rarement isolés en France. La voie de contamination prédominante est la voie respiratoire à l'origine d'infections pulmonaires (**Bouhna, 2020**).

3. Les voies de contamination

3.1. Voie aérienne

C'est la Principale voie d'entrée, mais également la plus insidieuse, elle se fait par inhalation d'aérosols créés au cours des manipulations :

- par gouttelettes de grandes tailles ($> 5\mu\text{m}$), se projetant sur des distances courtes ($< 1\text{ m}$) et pouvant se déposer sur les conjonctives, muqueuse buccale ou nasale (virus de la grippe, VRS, pneumocoque, B. pertussis...) (**Bataillon et al., 2017**).

- par aérosols

(particules $< 5\mu\text{m}$) sous forme de gouttelettes asséchées ou de poussières contenant des micro-organismes assez résistants dans l'environnement, véhiculables sur des distances assez

longues (plusieurs dizaines de mètres) et pouvant être inhalés (agents infectieux de la tuberculose, de la variole, de la rougeole, du charbon...) (**Bataillon *et al.*, 2017**).

3.2. Voie digestive

Les interdictions de pipeter à la bouche, de boire, de manger et de fumer dans les laboratoires ont considérablement diminué le risque de contamination par ingestion. Cependant, le non-respect des règles élémentaires d'hygiène (porter ses mains à la bouche sans les avoir lavées, sucer un stylo...) constitue encore un risque non négligeable (**Bataillon *et al.*, 2017**).

3.3. Voies cutanée et oculaire

La contamination peut se faire par projection dans l'œil, ou sur peau saine et surtout lésée mais également à la suite d'une piqûre, coupure, morsure, griffure. Certains pathogènes peuvent traverser la peau saine, soit naturellement (*Schistosoma mansoni*), soit si un produit facilite le passage par la peau (DMSO qui perméabilise la peau) (**Bataillon *et al.*, 2017**).

4. Stratégies de la maîtrise du risque infectieux

4.1. Protection individuelle

4.1.1. La tenue de travail

La tenue de travail est l'ensemble des pièces vestimentaires nécessaires à l'exercice professionnel. Elle est associée à l'aspect physique général : cheveux propres, attachés si besoin (cheveux longs), absence de bijoux aux mains et aux poignets. La tenue est revêtue au début du travail, quittée pour les pauses, la prise des repas et à la fin de la journée de travail. Elle comporte une tenue de protection et des chaussures de travail (spécifiques à l'activité), confortables, faciles à entretenir, à bouts fermés, antidérapantes, de sécurité si besoin (**Société française d'hygiène hospitalière, 2007**).



Figure 02. Exemple de la tenue de protection individuelle [1].

4.1.2. Port des gants

C'est une mesure de prévention contre la contamination par contact. Ceux-ci sont effectivement probables au cours de n'importe quelle manipulation classique.

- Le port des gants ne doit pas dépasser au maximum 45 minutes. Il sera limité à la manipulation des prélèvements et matériels souillés (Echantillon, Automate, Plan de travail).
- En revanche, les gants doivent être ôtés pour tout acte « propre » (téléphone...), et pour tout contact cutané (visage, lèvres,.....) Le gant doit être adapté :
- A la morphologie de la main (taille adéquate).
- A l'acte réalisé (**Société française d'hygiène hospitalière, 2007**).

Changer de gants :

- Entre chaque séquence d'examen différent.
- En cas de gants visiblement troués.

Retirer les gants sans se souiller les mains :

- Oter le premier gant en tirant sur le bout des doigts.
- Une fois la première main dégantée, introduire le pouce dans la manchette du second gant et enlever celui-ci en le retournant

Après usage :

- Jeter immédiatement les gants à usage unique avec les déchets à risques spécifiques (**société française d'hygiène hospitalière, 2007**).

Exemples de pictogramme utilisés pour caractériser les propriétés des gants.



Protection contre le risque biologique



Protection contre le risque chimique



Protection contre le risque mécanique



Contact alimentaire possible

Illustration de la technique de retrait des gants



Figure 03. (1) Pictogramme utilisés pour caractériser les propriétés des gants, (2) La technique de retrait des gants (Société française d'hygiène hospitalière, 2007).

4.1.3. Masque et lunette

Le masque est une protection efficace contre la transmission par voie respiratoire. Il est choisi en fonction du risque. Les lunettes de protection protègent contre les risques de projection sur la conjonctive. Le port de masque et lunettes ne sont pas toujours indispensables (Société française d'hygiène hospitalière, 2007).



Figure 04. Illustration d'un masque médical et d'un appareil de protection respiratoire (Société française d'hygiène hospitalière, 2007).

4.2. Des infections des mains

Lavage réguliers, correctement réalisé d'améliorer la tolérance cutanée du lavage des mains, il faut d'abord se mouiller les mains puis ajouter le savon, se laver les mains, rincer avec une action mécanique : paume contre paume.

- 1- Paume de la main droite sur le dos de la main gauche et inversement.
- 2- Paume contre paume et doigt entrelacés.
- 3-Dos des doigts contre paume opposée avec les doigts emboités.
- 3-Friction en rotation du pouce gauche enchâssé dans paume droite.
- 4-Friction en rotation et mouvement de va-et-vient avec les doigts joints (société française d'hygiène hospitalière, 2007).



Figure 05. Technique standardisée de friction des mains (société française d'hygiène hospitalière, 2007).

4.3. Des infections du paillassé

Nettoyer avec un agent tensioactif à l'aide d'un papier absorbant, à éliminer ensuite avec les déchets à risque infectieux en portant des gants de ménage.

- Rincer à l'eau.
- Désinfecter en laissant agir le produits désinfectant (exemple : l'eau de javel degrés chlorométrique, fraîchement préparée, durant 5 minutes) mis à l'aide d'un papier absorbant à éliminer avec les déchets à risque infectieux.
- Rincer ou non selon le produit.

Ces opérations doivent être pratiquées intégralement au moins une fois par jour.

4.4. Vaccination

Ces vaccinations peuvent être soit obligatoires soit recommandé (**Société française d'hygiène hospitalière, 2007**).

Vaccination recommandées :

- Vaccination contre l'hépatite A (virologie, corpologie).
- Vaccination contre la rubéole pour les femmes non immunisées.
- Vaccination contre la rage (laboratoire manipulant du matériel contaminé par cet agent ou susceptible de l'être) (**Société française d'hygiène hospitalière, 2007**).

➤ Vaccinations obligatoires

- Tuberculose.
- Typhoïde : une injection, puis revaccination tous les trois ans.
- Diphtérie : rappel tous les 10 ans avec un vaccin contenant une dose réduite d'anatoxine.
- Tétanos-poliomyélite : rappel tous les 10 ans.
- Hépatite : la vaccination doit être faite ou reprise, jusqu'à détection d'anticorps anti-HBs dans le sérum.

5. Le bonne pratique de personnel

Tableau 01. Consignes avant d'entrée dans la salle (**Lacroix, 2009**)

Consignes	Justifications
Jeter chewing -gom ou autre aliment en cours de consommation.	Eviter contamination digestive
Déposer les vêtements de ville dans le vestiaire, ou à l'écart des zones à risque (téléphone portable).	Eviter contamination de l'environnement
Attacher les cheveux longs vers l'arrière.	Eviter risque inflammation et contamination

	du produit manipulé
Oter les bijoux des doigts et poignets.	Eviter le risque de contamination du produit

Tableau 02. Consignes Avant le début de la manipulation (**Lacroix, 2009**)

Consignes	Justifications
Fermer les portes et les fenêtres.	Eviter les courants d'air et l'extinction de la flamme du bec.
Mettre une blouse en Cotton couvrants avants bras et genoux, fermée (blouse réservée au laboratoire).	Eviter les risque inflammable, elle peut être javellisée et laver à 90°C.
Protéger les blessures non cicatrisées par un pansement ou un gant si blessure importants	Eviter contamination manipulateur.
Nettoyer et désinfecter la paillasse	Elimination des microorganismes
Se laver les mains à l'aide d'un désinfectant.	Elimination des microorganismes sur la peau.
Lire le protocole et réfléchir à l'organisation du tp.	Eviter les déplacements inutiles.

Tableau 03. Consignes Pendant la manipulation (**Lacroix, 2009**)

Consignes	Justifications
Avoir des agents mesurés et contrôlés se déplacer le moins possible.	Eviter les courants d'air et la formation des aérosoles.
Avoir un poste de travail bien organisé marquer les produits, tube.	Eviter les confusions et les accidents.
Ne jamais pipter à la bouche Ne jamais rien porter à la bouche (doigts, stylo, aliments, boisson).	Eviter la contamination digestive.
Limiter l'usage d'objets coupant, piquant	Eviter la contamination cutanée –muqueuse

Ne pas toucher les objets personnels, ne pas serrer la main des visiteurs.	Eviter la contamination à l'extérieur du laboratoire.
Toujours travailler dans la zone stérile du bec bunsen Ne pas parler en manipulant.	Eviter la contamination des produits manipulés.

Tableau 04. Consignes Après la manipulation (**Lacroix, 2009**)

Consignes	Justifications
Stérilisé convenablement le matériel non jetable contaminé	Eviter les contaminations
Eliminer convenablement les matériels contaminés jetable	Eviter contamination des autres usagers de la salle
Nettoyer et désinfecté la paillasse	Eviter contamination des autres usagers de la salle
Ranger la blouse à l'écart des vêtements de ville	Eviter la dissémination des microorganismes à l'extérieur du laboratoire
Se laver les mains	Eliminer les microorganismes

6. Mesure en cas de contamination

- Contamination par liquide :

(Tube de bouillon de culture ou récipient contenant un liquide biologique cassé,) (**Ben Hadj, 2017**)



Figure 06. Recipient contenant un liquide biologique cassé (Ben Hadj, 2017).

➤ Contamination par contact :

(Plaques de milieux de culture qui tombent par terre, échantillon clinique qui tombe sur surface de travail.

- Porter des gants.
- Recouvrir de papier absorbant imbibé de désinfectant. éviter de verser le désinfectants de haut (surtout pour les sparays) ce qui peut engendrer des aérosols.
- laisser agir
- Eponger et jeter le matériel souillé dans un conteneur adéquat (Ne jamais manipuler du verre cassé directement avec les mains, même gantées, mais utiliser une brosse et une remassoire...etc.)



Figure 07. Contamination par contact (Ben Hadj, 2017).

Matériel

et

Méthodes

1. Cadre d'étude

Cette étude a été réalisée dans laboratoire de microbiologie à l'Université 8 Mai 1945, Guelma durant la période allant du 13 février au 22 mars 2022.

2. Objectifs

Le but de notre travail est :

- L'isolement et l'identification des bactéries responsables d'une infection dans laboratoire microbiologie.
- L'évaluation des risques infectieux au niveau du laboratoire de microbiologie.

3. Prélèvements

Durant la période d'étude, 16 prélèvements ont été effectués à partir des 4 endroits au niveau du laboratoire de microbiologie (poignet de la porte, microscope optique, paillasse, robinet).

Selon la méthode suivante :

- Introduit un écouvillon coton stérile dans le bouillon nutritif et éliminer l'excès de liquide par essuyant l'écouvillon sur la paroi du tube.
- Passer l'écouvillon imbibé sur les surfaces des endroits mentionné précédemment sans les avoir nettoyé auparavant.

4. Enrichissement

- Déposer l'écouvillon des chaque prélèvement dans 5 ml de bouillon nutritif.

On utilisé le bouillon nutritif qui de par sa composition, crée des conditions particulièrement favorables au micro-organisme [2].

- Étiqueter les tubes (date, heure et l'endroit de prélèvement).
- Incubés les tubes dans l'étuve à 37°C pendant 24h.

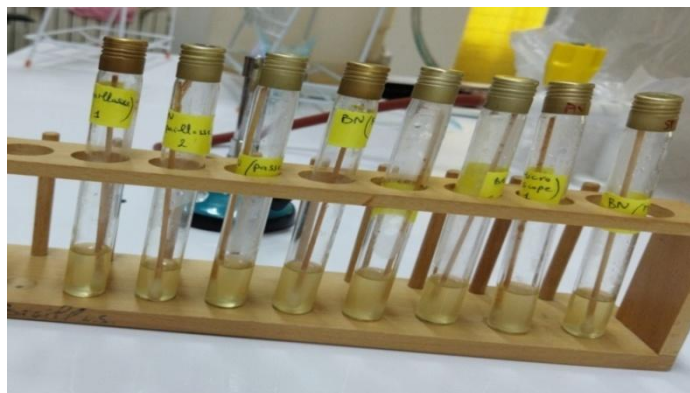


Figure 08. Les prélèvements (photo personnelle).

5. Isolement

L'isolement a été fait dans différents milieux de culture (Gélose Nutritive, Chapman, Mac Conkey).

5.1. Milieux gélosés utilisés

5.1.1. Gélose nutritive

Est un milieu d'isolement non-sélectif, la gélose nutritive apporte les éléments nutritifs nécessaires à la croissance d'une large gamme de micro-organismes, elle est utilisée pour la culture de bactéries et pour les matériaux [3].

5.1.2. Gélose Chapman

La gélose Chapman ou gélose au sel de mannitol est un milieu sélectif utilisé pour l'isolement, le dénombrement et la différenciation des *Staphylococcus* à partir d'échantillons cliniques, alimentaires, antiseptiques et cosmétiques [3].

5.1.3. Gélose Mac Conkey

Est un milieu sélectif et différentiel utilisé pour l'isolement et la différenciation de bacilles à Gram négatif non exigeants, en particulier les membres de la famille des Entérobactéries [3].

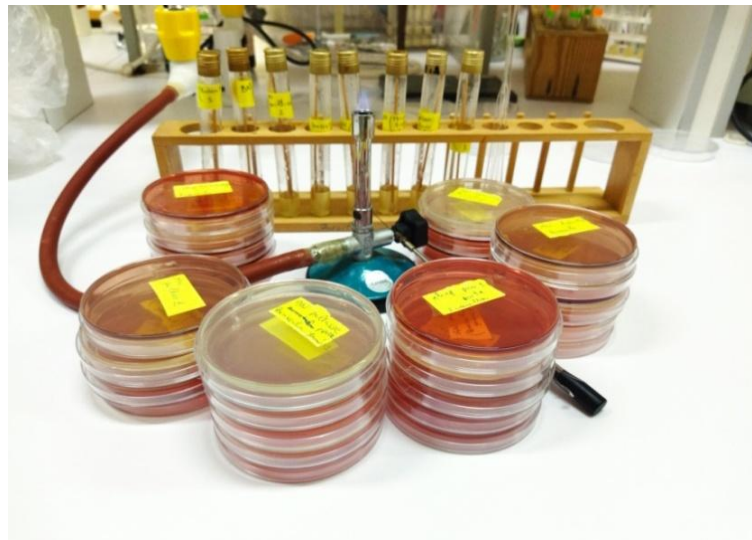


Figure 09. Isolement d'échantillons (photo personnelle).

5.2. Ensemencement par stries parallèles

L'inoculum, prélevé à partir d'un bouillon de culture, est déposé sur un point périphérique de la plaque gélosée. La gouttelette de culture est disséminée sur toute la gélose en décrivant des stries parallèles. La boîte est ensuite incubée 24 - 48h à 37°C [4].

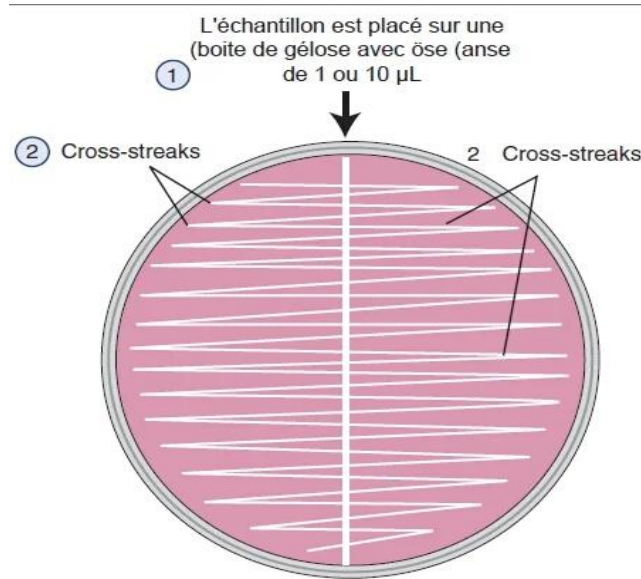


Figure 10. Ensemencement par stries [3].

6. Etude microbiologique

6.1. Caractère morphologique

6.1.1. Observation macroscopique

Après incubation, observer à l'œil nu les colonies bactériennes développées sur ces milieux gélosés en boîtes de Pétri et noter leurs caractères culturaux (la couleur, la forme des colonies, la taille, la transparence, le contour...etc.)

A. Taille

- petites colonies:< 1mm.
- colonies moyennes: 1,5 à 3 mm.
- grosses colonie: > 2mm.

B. Forme de colonie

- à bords circulaire.
- irrégulières et parfois envahissantes.
- déchiquetées et parfois envahissantes (Haouam et Boucheligha, 2019).

D. Transparence (en lumière naturelle et artificielle)

- colonies transparentes.
- colonies translucides.
- colonies opaques (Haouam et Boucheligha, 2019).

E. surface

-colonies lisses.

-colonies muqueuses (aspect en coulée de miel).

-colonies rugueuses (aspect comme le cuir) (**Haouam et Boucheligha, 2019**).

6.1.2. Observation microscopique

Cette observation est réalisée à l'aide de frottis pratiqués à partir des colonies obtenues et ayant subi une coloration de gram.

- Les frottis sont observés au microscope optique à l'objectif d'immersion ($\times 100$).

Coloration de Gram (coloration différentielle)

La coloration de Gram est la coloration différentielle microbiologique la plus importante et la plus largement utilisée, elle permet de différencier les bactéries selon 2 critères principaux :

Forme : Paires, Tétrades, Groupes, Chaînes, Lancettes...etc.

Affinité pour les colorants : Gram positif ou Gram négatif [3].

Technique

- Préparer et fixer une suspension de la souche bactérienne.
- Recouvrir le frottis d'une solution de violet de gentiane ; laisser agir une minute.
- Entrainer le violet par la solution de lugol. Recouvrir la lame de lugol et laisser agir 1 minute sans laver à l'eau.
- Décolorer aussitôt par l'alcool acétone ; pour cela, verser l'alcool à la surface de la préparation placée obliquement et observer sa couleur en s'écoulant, il est d'abord violet puis bleuté et enfin incolore ; arrêter à ce stade.
- laver rapidement à l'eau courante (eau distillée).
- Recouvrir la lame de solution de fuchsine et laisser agir 20 à 30 secondes.
- Laver et sécher entre deux feuilles de papier filtre.
- Observer à l'objectif à immersion [4].

Les Gram+ (Gram positifs) apparaissent en violet, les Gram- (Gram négatif) apparaissent en rose [4].

6.2. Identification biochimique

a. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme contenant du fer, qui catalyse la décomposition du peroxyde D'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène. Synthétisée par la plupart des bactéries aérobies, Elle élimine le peroxyde d'hydrogène produit au cours du métabolisme aérobie. Le test de la Catalase sert à détecter la présence de cette enzyme dans une souche bactérienne donnée. Il Consiste essentiellement à exposer les cellules bactériennes au peroxyde d'hydrogène : la

Présence de catalase se marque par la formation de bulles de gaz (oxygène) (Singleton, 2004).

Selon la réaction :



Figure 11. Test de catalase [5].

b. Test d'oxydase

Appelé aussi phénylène diamine oxydase est une enzyme intervenant dans divers couples d'oxydo-réduction. Ce test est à la base de l'identification des bactéries à Gram (-).

- Placer un disque d'oxydase sur une lame propre et stérile.
- Déposer à l'aide d'une pipette pasteur (il est strictement interdit d'utiliser l'anse de platine pour ne pas fausser le résultat) une goutte de suspension bactérienne pure sur " un disque oxydase", celui-ci contient de l'oxalate de diméthyle paraphénylène diamine.
- Les bactéries oxydase-positives donnent rapidement une coloration violette foncée ; dans le cas contraire, il n'y a pas de coloration [5].



Figure 12. Test d'oxydase [5].

c. Test coagulase

Une version du test en tube consiste à ajouter dans un tube à essai, 0,5 ml d'une culture liquide (dans un bouillon cœur cerveau) de 18 à 24 heures de la souche à tester à 1 ml de plasma. Le tube est maintenu à 37 °C et est examiné après 1, 2, 3, 4 et 24 heures, pour voir si un caillot s'est formé (Singleton, 2005).

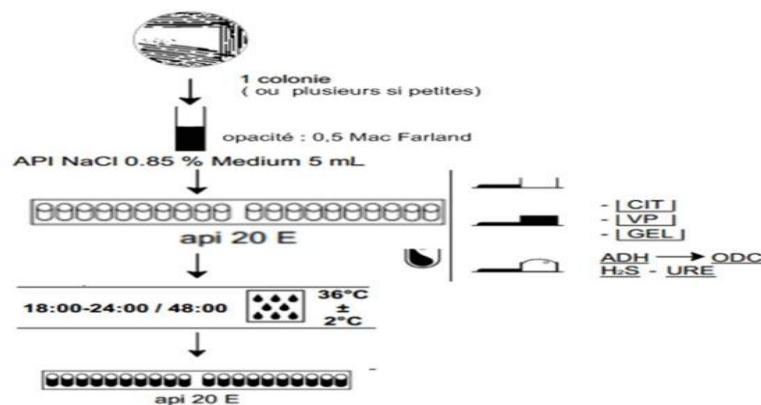
d. Les galeries d'identification biochimique

• La galerie (API 20 E)

La galerie API 20 E est un système d'identifications des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux (Leyral et al., 1998).

Technique

- Prélever à l'aide d'une pipette, une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé.
- Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans une ampoule de suspension Medium (5 ml) ou dans un tube d'eau distillée stérile.
- Remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne.
- Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests.
- Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H2S en remplissant leurs cupules de l'huile de paraffine.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation puis l'incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures (Leyral et al., 1998).



Remplir les tubules et les cupules des tests du type [CIT]		Remplissage des tubes :
Remplir les tubules des tests du type ADH et remplir la cupule avec de l'huile de paraffine, pour créer l'anaérobiose.		Remplir en posant la pipette contre la paroi de la cupule.
Remplir uniquement les tubules des tests restants		

Figure 13. Protocole d'utilisation de système (API 20E) [5].

Lecture de la galerie

- Après l'incubation, la lecture de la galerie est réalisée en se référant au tableau de lecture.
- Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées.
- Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs (TDA, IND et VP).

L'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification (**Leyral et al., 1998**).

• La galerie (API STAPH)

La galerie API STAPH est un système d'identification des genres *Staphylococcus* et *Micrococcus* (**Leyral et al., 1998**).

Technique

- Préparer une suspension bactérienne homogène dans une ampoule d'API STAPH Medium avec une seule colonie bien isolé sur milieu gélosé (**Leyral et al., 1998**).
- Remplir les tubes de la galerie avec API STAPH Mediumensemencé.
- Créer une anaérobiose dans les tests : ADH et URE en remplissant leurs cupules d'huile de paraffine.
 - Placer la galerie dans la boîte d'incubation puis l'incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures (**Leyral et al., 1998**).

Lecture de la galerie

- Après l'incubation, la lecture de la galerie est réalisée en se référant au tableau de lecture.
- Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées.
- Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs (VP, NIT et PAL).

L'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification (**Leyral et al., 1998**).

• La galerie (API 20 NE)

API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non Entérobactéries est non fastidieux (ex: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Flavobacterium*. etc.) (**Leyral et al., 1998**).

Technique

- La même technique d'API 20 E.
- Après l'incubation juste 2 tests (NO, TRP) doivent être ajoutés des réactions (NIT1-NIT2, KOVACS).

Lecture de la galerie

- la lecture de la galerie est réalisée en se référant au tableau de lecture.
- Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées.
- Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs.

L'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification (**Leyral et al., 1998**).

6.3. Etude de la sensibilité et la résistance bactérienne

La détermination de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées est fondée sur l'antibiogramme (Eyquem *et al.*, 2000), ces méthodes reviennent fondamentalement à classer un germe en fonction d'une CMI estimée et des concentrations critiques (Flandrois, 1998), la méthode de diffusion en milieu gélosé (méthode des disques) représente la méthode la plus utilisée en laboratoire (Eyquem *et al.*, 2000 in Kirat et Agabi, 2019).

6.3.1. Préparation d'inoculum

A partir d'une culture visible du prélèvement, réaliser une suspension bactérienne en solution salée pour atteindre une turbidité équivalente à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de MacFarland (Société Française de Microbiologie, 2018).

6.3.2. Milieu d'ensemencement

Le milieu standardisé utilisé la gélose de Mueller-Hinton est un milieu solide standardisé recommandé pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens [3].

L'épaisseur de la gélose doit être de 4 mm car elle influe sur la concentration en antibiotique dans le milieu après addition des disques (Joffin *et al.*, 2009).

6.3.3. Technique d'inondation

- Inonder la boîte avec 3 à 5 cm de suspension prélevée à la pipette .Veiller à bien répartir la suspension en inclinant la boîte dans toutes les directions.
- Réaspirer soigneusement à la pipette l'excès de suspension (Joffin *et al.*, 2009)

6.3.4. Application des disques

Déposer à la surface les disques d'antibiotiques choisis en les appuyant légèrement à l'aide de la pince stérilisée .On veillera à ne pas chauffer les disques par la pince flambée.

Un disque appliqué ne peut et doit être distants d'environ 30 mm (Joffin *et al.*, 2009)

6.3.5. Incubation

L'incubation de l'antibiogramme se fait à l'étuve à 37°C pendant 18h-24 heures.

6.3.6. La lecture

- Mesurer les diamètres des zones d'inhibition au millimètre le plus proche avec une règle .
- Interpréter les diamètres des zones d'inhibition par référence aux tableaux où figurent les concentrations critiques.
- Classer la bactérie dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire ou Résistante (Société Française de Microbiologie, 2018).

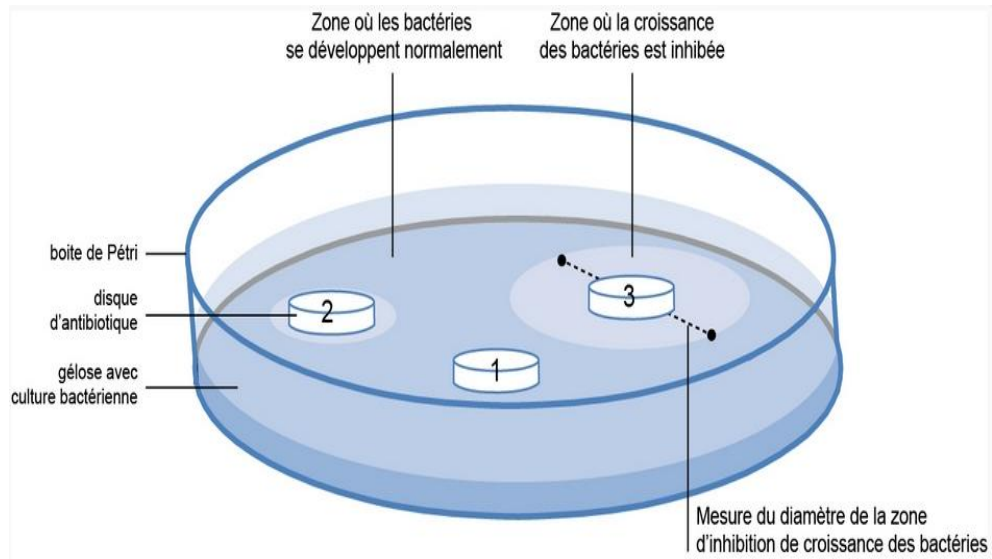


Figure 14. Lecture de l'antibiogramme [3].

Tableau 05. Liste des antibiotiques utilisés.

Antibiotique	Famille	Charge (μg)	Abréviation
Pénicilline	β -lactamine	10	P
Gentamicine	Aminosides	10	GEN
Erythromycine	Macrolides	15	E
Amoxicilline	β -lactamine	25	AMX
Chloramphénicol	Phénicolés	30	C
Amoxyclav	β -lactamine	30	AMC

Résultats

et

Discussion

1. Caractères macroscopiques

Pour chaque prélèvement, on réalise l'isolement des souches bactériennes sur les différents milieux de culture utilisées, Les principaux caractères culturaux sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 06. Résultats de lecture macroscopique des colonies après culture.

	Gélose nutritive	Gélose Chapman	Gélose Mac Conkey
01 Poignet de la porte	-Colonie petites, moyen, grandes, arrondies, blanchâtres, lisses, à Contours réguliers, Légèrement bombées.	-Colonies petites, arrondies, blanchâtres et jaune doré lisses, à contours réguliers.	- Aucune pousse.
02 Robinet	-Colonies petites, arrondies, blanchâtres, lisses, à Contours réguliers.	- Colonies petites, arrondies, blanchâtres et jaune doré lisses, à contours réguliers.	- Colonies petites, grandes, arrondies, Rose, lisses, à Contours réguliers, Légèrement bombées, crémeuses.
03 Microscope optique	-Colonies petites, moyen, grandes, arrondies, blanchâtres, lisses, à Contours réguliers, Légèrement bombées.	-Colonies petites, moyen. arrondies, blanchâtres, à contours réguliers.	- Aucune pousse.
04 Paillasse	-Colonie petites, moyen, grandes, arrondies, blanchâtres, lisses, à Contours réguliers, Légèrement bombées.	-Colonies petites, moyen, arrondies, blanchâtres et jaune doré lisses, à contours réguliers.	-Colonies petites, arrondies, Rose, lisses, à Contours réguliers, Légèrement bombées, crémeuses.

L'étude des prélèvements a été réalisée suivant un protocole bien déterminé. L'isolement a été effectué dans des boîtes de Pétri gélosées (gélose nutritive, gélose Mac Conkey, gélose Chapman) et incubés à 37°C pendant 24h. Après incubation, nous avons procédé en premier lieu à un examen macroscopique où nous avons trouvés des colonies avec les caractéristiques suivantes :

- Colonies arrondies, blanchâtres, lisses, à contours réguliers, légèrement bombées sur gélose nutritive.
- Colonies arrondies, blanchâtres et jaune doré lisses, à contours réguliers sur gélose Chapman.
- Colonies volumineuses, arrondies, bombées, lisses, crémeuses avec un contour régulier, de couleur rose sur gélose Mac Conkey.

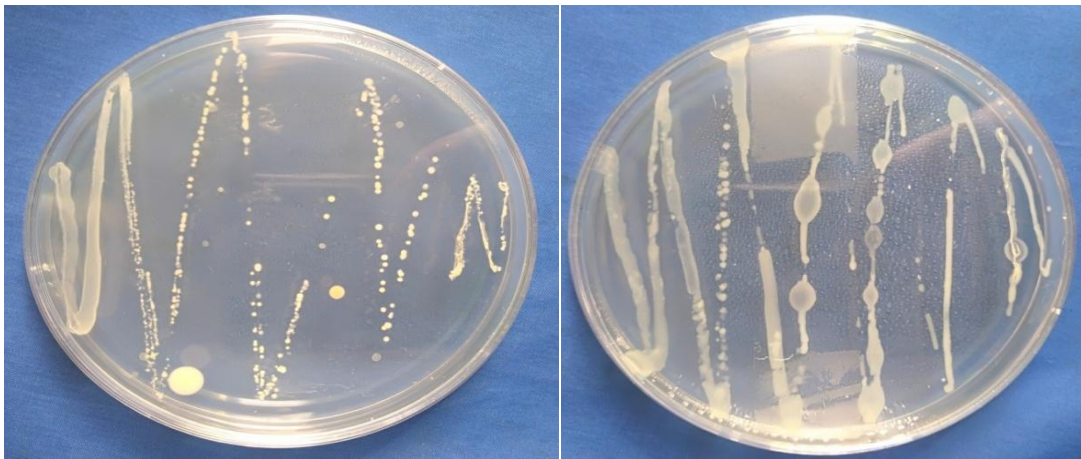


Figure 15. Aspect macroscopique sur gélose nutritive (photos personnelles).



Figure 16. Aspect macroscopique sur gélose Chapman (photos personnelles).

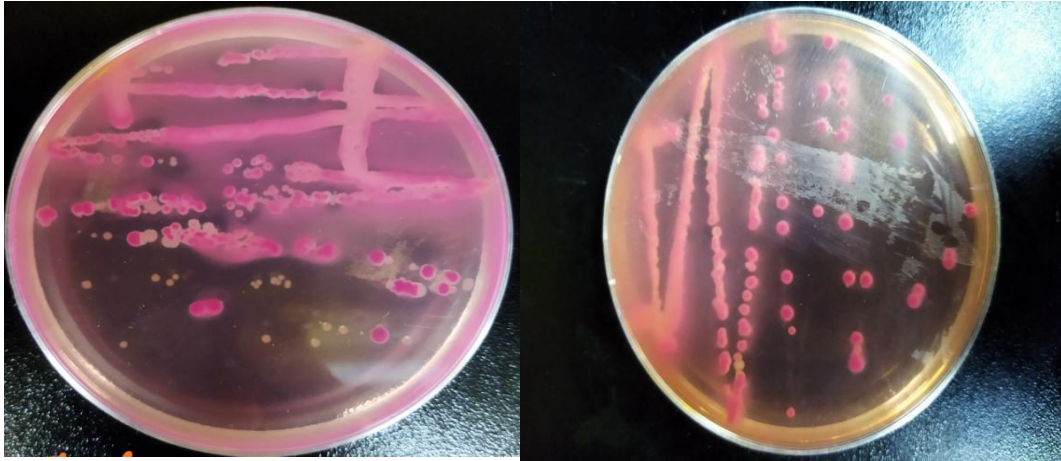


Figure 17. Aspect macroscopique sur gélose Mac Conkey (photos personnelles).

• Résultats des prélèvements selon le nombre des germes isolés

Le tableau 08 et la figure 16 montrent les nombres des germes isolés de chaque endroit de prélèvement.

Tableau 07. Nombre des germes isolés.

L'endroit de prélèvements	nombres des germes
Poignet de la porte	7
Robinet	8
Microscope optique	4
Paillasse	9

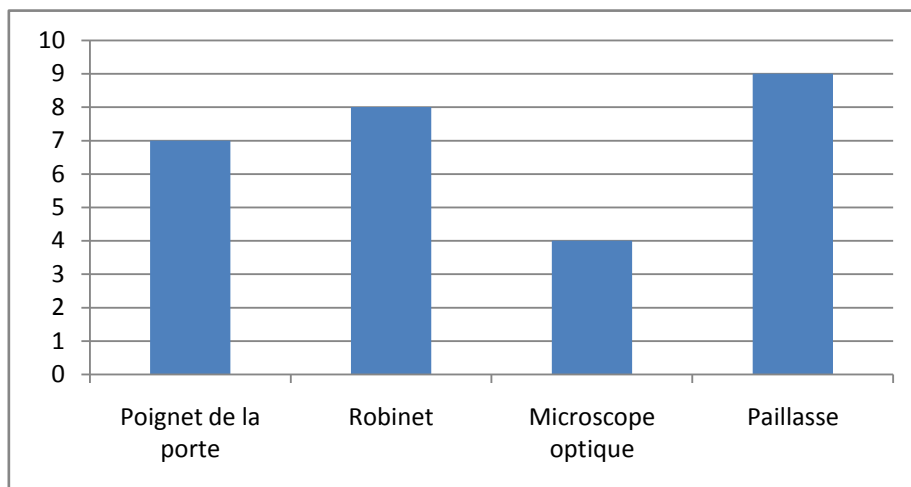


Figure 18. Nombre de germe isolé.

2. Observation microscopique

Au total 28 frottis ont été réalisés à partir des colonies précédentes, leur observation après coloration de Gram a mis en évidence la présence des cocci à Gram positif (CG+) regroupés dans 19 frottis pratiqués à partir de gélose Chapman.

Alors que les bacilles à Gram négatif (BG-) ont été trouvés dans 9 frottis réalisés à partir de la gélose Mac Conkey.

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 08. Résultats de l'observation microscopique après coloration.

	Gélose Chapman	Gélose Mac Conkey
01 Poignet de la porte	Cocci Gram+	\
02 Robinet	Cocci Gram+	Bacille Gram-
03 Microscope optique	Cocci Gram+	\
04 Paillasse	Cocci Gram+	Bacille Gram-

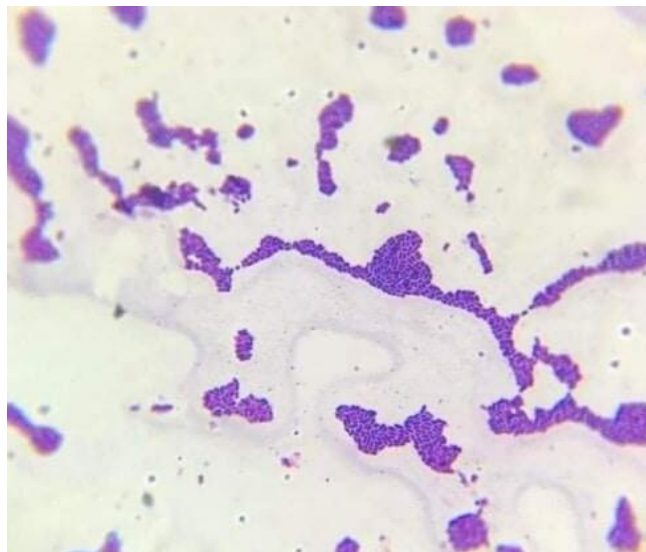


Figure 19. Observation microscopique des cocci Gram positif en amas après coloration de Gram (Gx100) (photo personnelle).

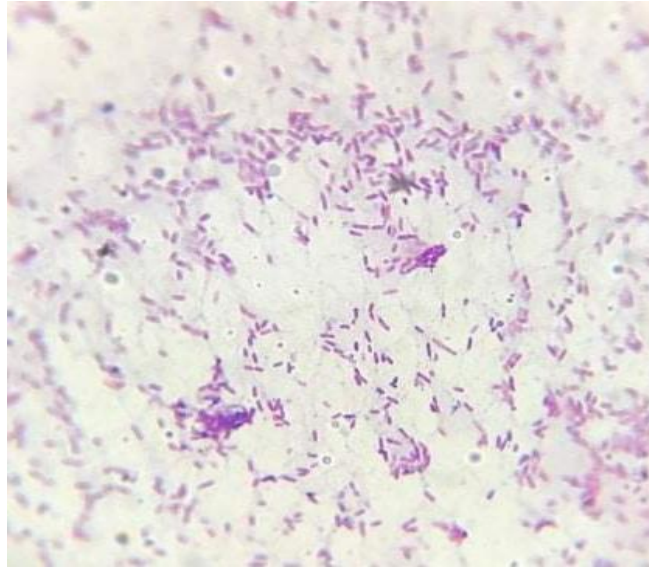


Figure 20. Observation microscopique des bacilles Gram négatif après coloration de Gram (Gx100) (photo personnelle).

Tableau 09. Résultat de l'observation microscopique après coloration.

observation	Effectifs	Fréquences
CG+	19	68%
BG-	9	32%
Totale	28	100%

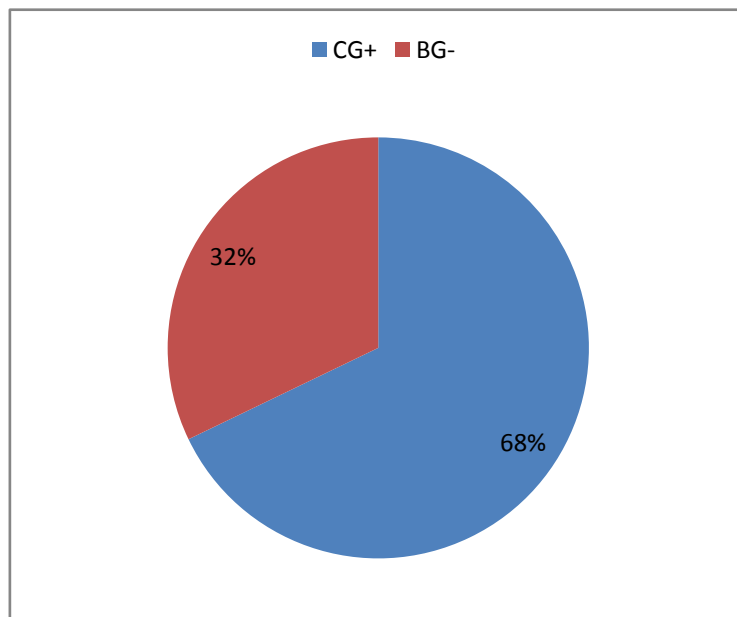


Figure 21 : Résultats de l'observation microscopique après coloration.

3. Identification

3.1. Résultats des Tests préliminaires

Les résultats des différents tests (catalase, oxydase) réalisés sur les différents prélèvements obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 10. Résultats des tests « Catalase, Oxydase».

Milieu	Gélose Chapman		Gélose Mac Conkey	
	CAT	OX	CAT	OX
01 Poignet de la porte	(+)	/	/	/
02 Robinet	(+)	/	/	(-)
03 Microscope optique	(+)	/	/	/
04 Paillasse	(+)	/	/	(+)

- **Test catalase:** Réaction positif pour la totalité des colonies isolées de cocci Gram positif, ce qui conduit à estimer que ce sont des Staphylocoques.

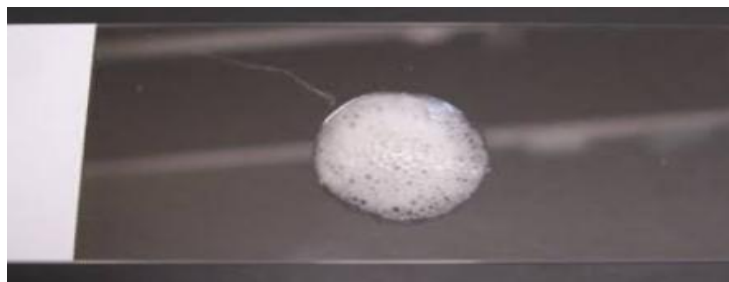


Figure 22. Résultat de catalase positive (+) (photo personnelle).

- **Test oxydase:** négatif pour la totalité des colonies isolées sur gélose Mac Conkey, ce qui mène à présumer leur appartenance à la famille des Enterobacteriaceae, à l'exception de deux colonies pour laquelle le test était positif (non Enterobacter) .



Figure 23. Résultat d'oxydase négative (-) (photo personnelle).

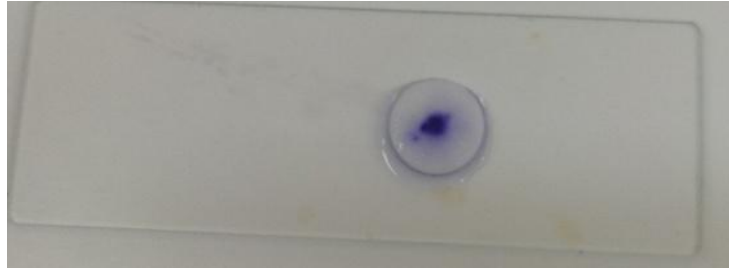


Figure 24. Résultat d'oxydase positive (+) (photo personnelle).

- **Test coagulase**

Le test de coagulase était négative pour les colonies de Staphylocoques testées, cela indique l'absence de l'espèce *Staphylococcus aureus*.

Tableau 11. Résultats des tests coagulases.

Prélèvement	Coagulase
01 Poignet de la porte	(-)
02 Robinet	(-)
03 Microscope optique	(-)
04 Paillasse	(-)

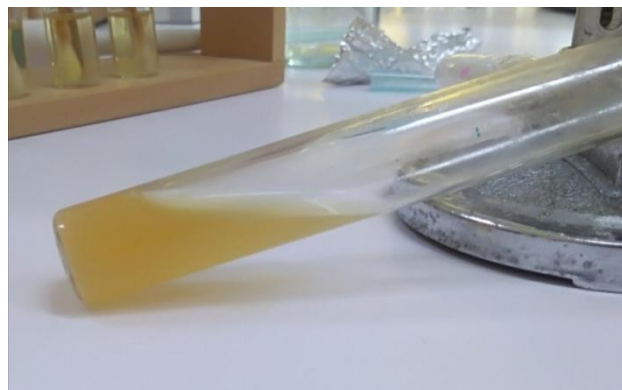


Figure 25. Résultats des tests coagulases pour les souches de *Staphylococcus* (photo personnelle).

3.2. Résultats des Tests biochimiques

Nous avons utilisé 3 types de galeries API (20 E, 20 NE et API STAPH), Après la préparation et l'incubation des galeries on a observé plusieurs espèces de cellules bactériennes.



Figure 26. Résultat API 20 E de la souche *Enterobacter cloacae* (photo personnelle).



Figure 27. Résultat API STAPH de la souche *Staphylococcus xylosus* (photo personnelle).



Figure 28. Résultat API 20 NE de la souche *Myroide* spp (photo personnelle).

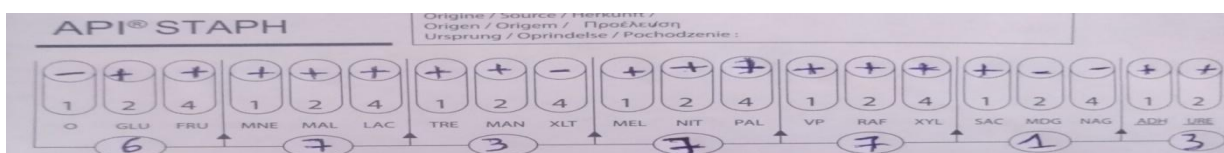


Figure 29. Api STAPH de la souche *Staphylococcus xylosus* (code 6737713) (photo personnelle).

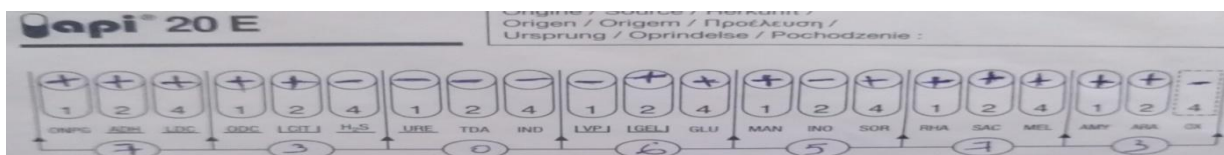


Figure 30. Api 20 E de la souche *Enterobacter cloacae* (code 7306573) (photo personnelle).

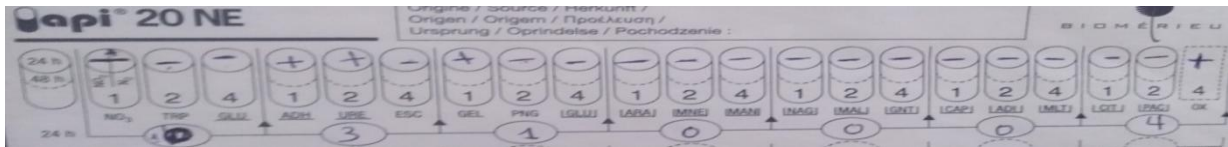


Figure 31. Api 20 NE de la souche *Myroide* spp (code 0310004) (photo personnelle).

Tableau 12. Fréquences des bactéries isolées.

Espèce	Nombre	Fréquence
Staphylocoques	15	68%
Enterobacteries	5	23%
Non Enterobacteries	2	9%

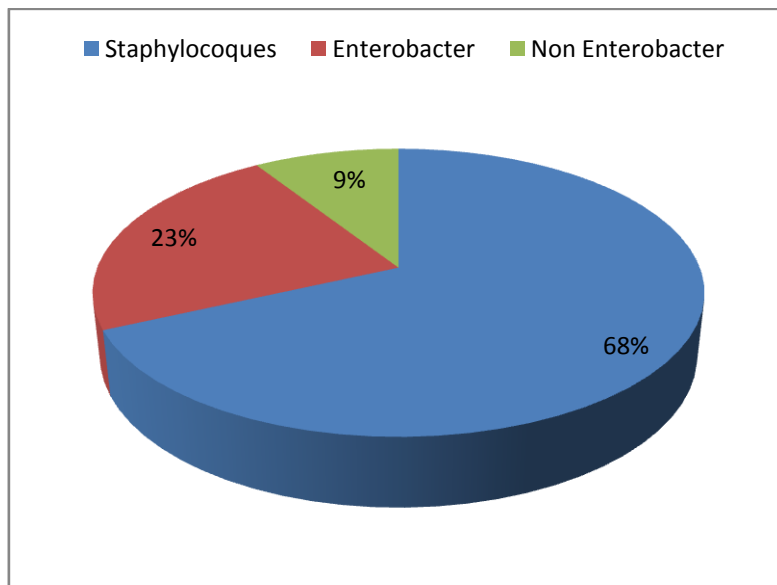


Figure 32. Pourcentage des espèces présentes.

Nous avons poursuivi notre étude par une identification biochimique de toutes les souches isolées et ceci par l'utilisation des galeries d'identification API (API 20 NE et API 20 E). Nous avons ainsi retrouvé : Une abondance (68,18%) des staphylocoques (ex: *Staphylococcus xylosus*), Enterobacter (22,73%) (ex: *Enterobacter cloacae*), et (9,09%) Non (ex: *Myroide* spp).

4. Antibiogramme :

Après l'incubation sur milieu Mueller Hinton (MH) à 37° C pendant 24h, nous avons obtenus les résultats suivants.

Tableau 13. Résultats de l'antibiogramme de *Enterobacter cloacae* :

	P	GEN	AMX	AMC	C	E
<i>Enterobacter cloacae</i>	6 mm	25 mm	16 mm	20 mm	26 mm	12 mm
	R	S	I	S	S	I

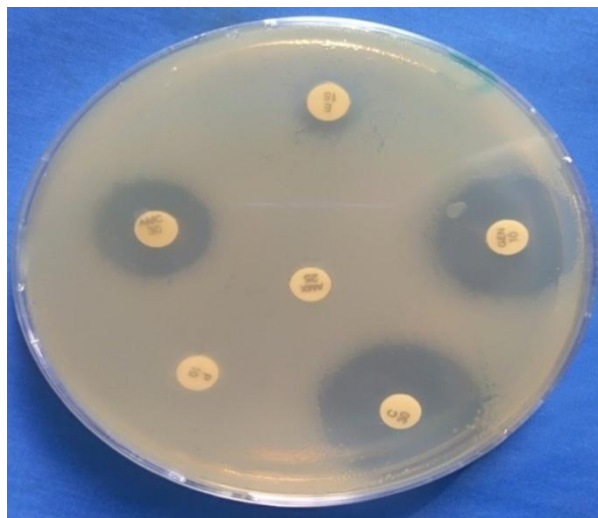


Figure 33. Antibiogramme du germe *Enterobacter cloacae* (photo personnelle).

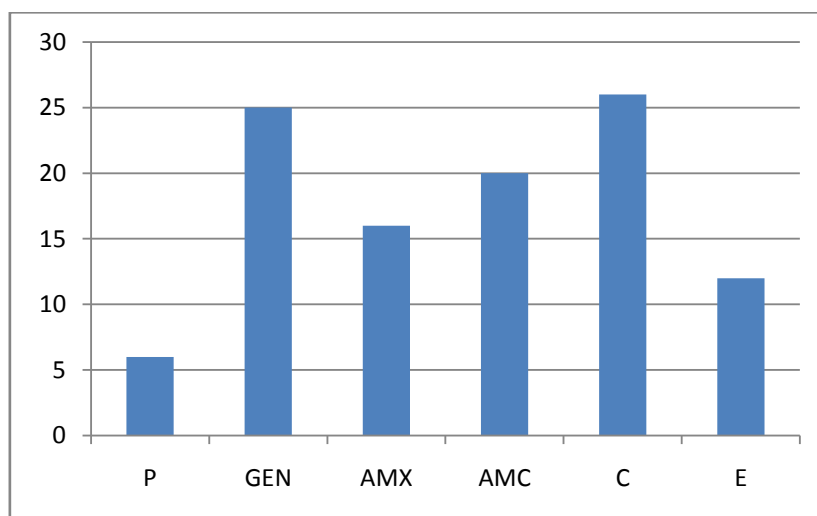


Figure 34. Représentation graphique des résultats de l'antibiogramme appliquée à *Enterobacter cloacae*.

Nous avons mesuré des grandes sensibilités sur le milieu MH pour la plus part des antibiotiques. *Enterobacter cloacae* présente une sensibilité (S) marquée par rapport à la Gentamicine et le Chloramphénicol et l'Amoxycylav et intermédiaire (I) par rapport à l'Erythromycine et l'Amoxicilline et une résistance (R) par rapport à la Pénicilline.

Tableau 14. Résultats de l'antibiogramme de *Staphylococcus xylosus* :

	P	GEN	AMX	C	E
<i>Staphylococcus xylosus.</i>	6 mm	30 mm	11 mm	31 mm	10 mm
	R	S	I	S	I

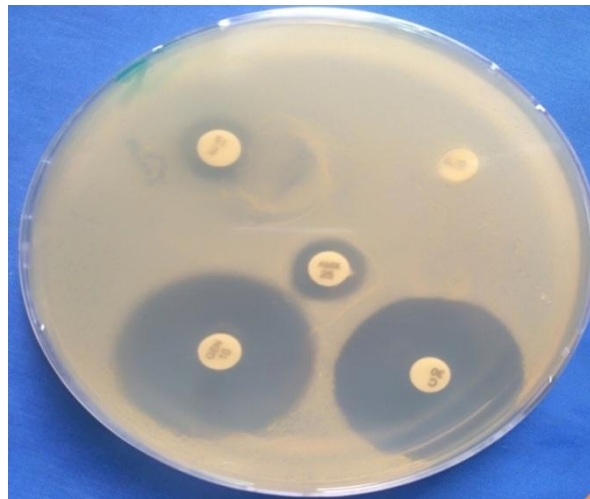


Figure 35. Antibiogramme du germe *Staphylococcus xylosus*.

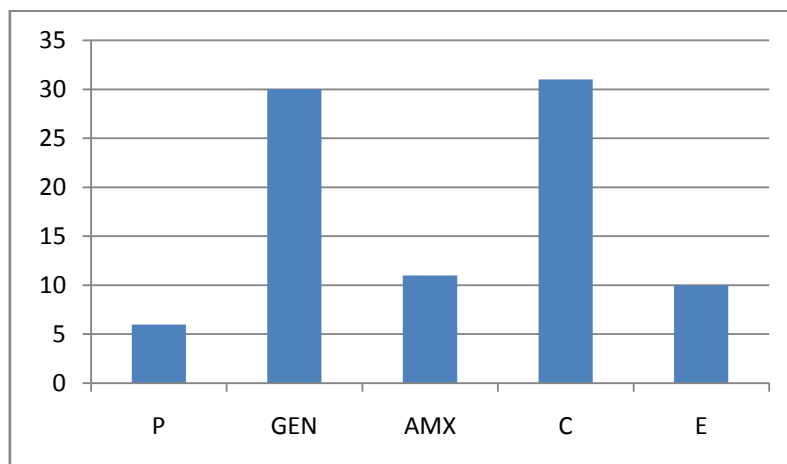


Figure 36. Représentation graphique des résultats de l'antibiogramme appliquée à *Staphylococcus xylosus*.

Pour *Staphylococcus xylosus* nous avons mentionné une sensibilité (S) par rapport à la Gentamicine et le Chloramphénicol, et intermédiaire (I) par rapport à l'Erythromycine et l'Amoxicilline, et une résistance par rapport à la Pénicilline.

Tableau 15. Résultats de l'antibiogramme de *Myroide* spp :

	P	GEN	AMX	AMC	C	E
<i>Myroide</i> <i>spp</i>	6 mm R	32 mm S	6 mm R	28 mm S	12 mm I	10 mm I

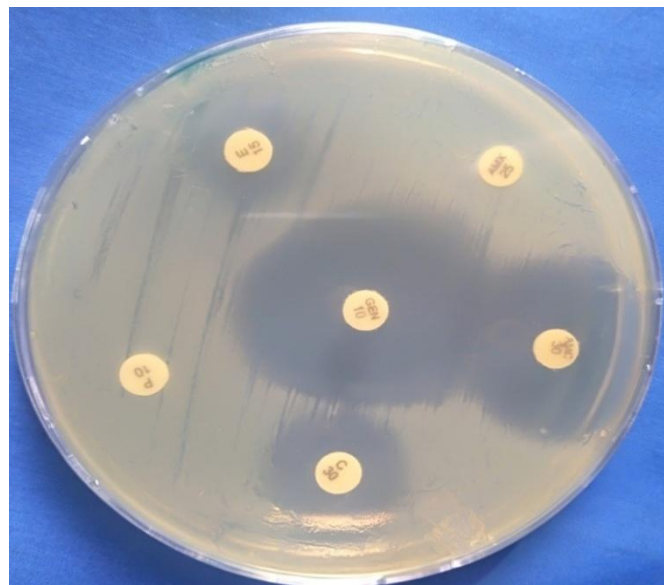


Figure 37. Antibiogramme du germe *Myroide* spp (photo personnelle).

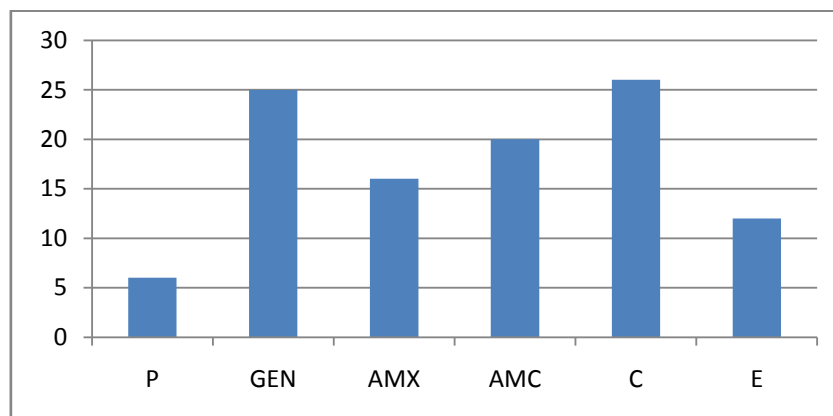


Figure 38. Représentation graphique des résultats de l'antibiogramme appliquée à *Myroide* spp.

Pour *Myroide spp* nous avons mentionné une sensibilité (S) par rapport à la Gentamicine et l'Amoxyclav, et intermédiaire (I) par rapport à l'Erythromycine et Chloramphénicol, et résistance par rapport à la Pénicilline et l'Amoxicilline.

Conclusion :

Dans cette étude qui vise à isoler et à identifier les bactéries pathogènes des ustensiles et du matériel du laboratoire de microbiologie montrant ainsi leurs risques potentiels de provoquer des infections et des maladies pouvant provoquer des hospitalisations du personnel hospitalier (maladies professionnelles) et des malades fréquentants ces lieux.

Ainsi, nos échantillons prélevés de plusieurs endroits du laboratoire de microbiologie de notre faculté nous ont montrés que tous les prélèvements sont souvent polymicrobiens et renferment plusieurs espèces bactériennes. A noter que certains lieux du laboratoire (paillasse et robinet) sont plus contaminés que d'autres (poignet de la porte et microscope optique). Ceci est lié à leurs utilisations et à leurs usages fréquents. La majorité des espèces isolées appartiennent à la famille des Enterobactériaceae (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Myroides* spp...etc.) et des Micrococacceae (*Staphylococcus xylosus*). Ces bactéries bien que classées banales peuvent être à l'origine de nombreuses maladies.

Outre ces résultats, ces bactéries isolées et testées à plusieurs antibiotiques, réalisée par la méthode des diffusions sur surfaces gélosées de Mueller-Hinton, exhibent des résistances très variables aux antibiotiques. Dans la majorité des cas, ces espèces sont plyrésistantes. De ce fait, nos résultats ont montré qu'en plus de leur résistance naturelle toutes les souches étudiées présentent une résistance acquise à au moins un antibiotique testé.

Ainsi, pour gérer ces risques infectieux et éviter ou minimiser les contaminations dans ces lieux considérés comme des sources de contamination et de contagion, il faut maintenir des règles d'hygiène et de sécurité appropriées. la sensibilisation ainsi que la conscience du personnel (les étudiants, les enseignants et les techniciens des laboratoires) et toutes personnes utilisant ces locaux est obligatoire. Le suivi du protocole d'hygiène, la stérilisation du matériel et des postes de travail est de ce fait primordial. Ainsi, pour permettre à l'ensemble du personnel un travail dans des conditions optimales, il est à suggérer des solutions adéquates et non impossibles tout en assurant le suivi des bonnes pratiques au laboratoire :

- Obligation de l'utilisation des gants, des masques et des lunettes de protection au cours de toutes les manipulations à risque.
- Nettoyage et désinfection régulière des paillasses et du matériel utilisé.
- Vaccinations à jour de tous le personnel et des étudiants utilisant ces laboratoires.
- Formation : prévoir des séances de formations sur les risques infectieux dans les laboratoires de microbiologie et des autres laboratoires qui doit inclure un enseignement relatif aux mesures de sécurité.

Références bibliographiques

- Ben Hadja Ali S. (2017).** *Evaluation et prévention des Risque infectieux dans les laboratoires de microbiologie.* Laboratoire de bactériologie : Institut Pasteur de Tunis, Tunisie.
- Bouhma F. (2020).** *Maitrise du risque infectieux au laboratoire de microbiologie.* Thèse de doctorat. Faculté de médecine et pharmacie Université de Rabat, Maroc.
- Bataillons C. Bleux C. Brion P. Cadet A. Jacquier M. Monfort P. Munch S. Nicolas S. Olivier P. René A. Volto N. et Wybier J. (2017).** *Risque biologique, les cahiers de prévention santé, sécurité, environnement,* CNRS, 4 édition.
- Bouskraou M. Zohair S. Benaouda A. Soraa N, Zerouali K et Mahmoud M. (2017).** *Guide pratique des bactéries pathogènes,* Société Marocaine d'infectiologie pédiatrique et vaccinologie.
- Eyquem A. Alouf J. et Montagnier L. (2000).** *Traité de microbiologie clinique : deuxièmes mises à jour et compléments.* 2ème édition. Padoue, Italie.
- Flandrois J-P. (1998).** *Bactériologie médicale.* Presses universitaires de Lyon.
- Haouam C. et Boucheliga O. (2019).** *Evaluation de la résistance aux antibiotiques des bactéries isolées du milieu hospitalier : cas de l'hôpital Khaledi Abdelaziz. Tébessa.* Mémoire de master en microbiologie appliquée, Université 8 Mai 1945 Guelma.
- Joffin J-N. et Leyral G. (2009).** *Microbiologie technique : Dictionnaire des techniques microbiologiques.* Scérén 4ème édition.
- Lacroix D. (2009).** *Hygiène et sécurité, organisation, au laboratoire de microbiologie.* <http://slideplayer.fr/slide/518856/>. (consulté 02 Avril 2022).
- Leyral G. Joffin J-N. et Boineau F. (1998).** *Microbiologie technique : Documentation technique.* 2ème édition. Bordeaux (France) : Centre Régional de Documentation Pédagogique.
- Podglajen L. Mainardi J. et Joly-Guillon M. (2020).** *Apport du laboratoire de microbiologie : Technique conventionnelle aux testes rapides.*
- Remy Teyssou A. (2001).** *La prévention des risques infectieux au laboratoire de bactériologie,* Revue française des laboratoires.
- Société Française d'hygiène hospitalière (2007).** *Prévention des risques infectieux dans les laboratoires d'analyse de biologie médicale,* volume XV N°6.

Société Française de Microbiologie. (2018). *Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM)*. Paris.

Singleton P. (2005). *Bactériologie : pour la médecine, la biologie et les biotechnologies : Cours*. 6^{ème} édition. Dunod.

Sites d'internet

[1]:http://dn.futurscience.com/buildsv6/image/medioriginal/7/a/4/7a4de2bd5f_50160058_coronavirus-origine-epidemie-pangolin-6.jpg (consulté 05 Avril 2022).

[2]:https://www.humeau.com/media/blfa_files/TC_300-Nutritif-bouillon_FR_230215.pdf (consulté 06 Avril 2022).

[3]: <https://microbiologieclinique.com> (consulté 06 Avril 2022).

[4]:https://fsnv.univ-setif.dz/techarger/EDT2017/TP_Microbiologie_2eAnnee_SNV.pdf.

Travaux pratiques de microbiologie générale- Université Sétif- (consulté 01 Mai 2022).

[5] : https://fac.umc.dz/cours/TP_Bactériologie.pdf.

Manuel des Travaux Pratiques de Bactériologie- Université Des Frères Mentouri- (consulté 05 Mai 2022).

Annexes :

Annexe 1 : Matériel et réactifs utilisés dans notre étude.

Appareillages	Milieux de culture	Réactifs et colorant	Autres matériel
<ul style="list-style-type: none"> - Autoclave. - Étuve. - Réfrigérateur. - Four Pasteur. - Bain marié 	<ul style="list-style-type: none"> - Bouillon Nutritif - Gélose Nutritive - Gélose Chapman - Gélose Mac Conkey - Bouillon coeur cervelle -Gélose Mueller Hinton 	<ul style="list-style-type: none"> - Violet de Gentiane - Fuchsine - Huile de cèdre - Lugol - Réactifs de Kovacs - Réactif de TDA - Voges-Proskauer (VPI, VP II) - Réactif de (NITI, NITII) - Disques d'antibiotique 	<ul style="list-style-type: none"> - Étiquettes - Anse de platine - Bec bunsen - Boites de pétri stériles - Scotch - Marqueur - Écouvillons - Micropipette - Tubes à hémolyse - Système API 20E - Système API 20NE -Système API STAPH - Lames - Lamelles - Pipettes Pasteur - Tubes à essai stérile

Annexe 2 : les réactifs des colorants

Tableau de la composition des réactifs des colorants.

Colorants	Produit	Composition
Violet de Gentiane	-Violet de gentiane	1g
	- Ethanol à 90%	1ml
	- Phénol	2g
	- Eau distillée	100ml
Lugol	- Iode	1g
	- Iodure de potassium	2g
	- Eau distillée	100ml

Fuschine	Fuchsine basique - Alcool éthylique - Phénol - Eau distillée	1g 100ml 15g 100ml
Réactif TDA (pour la recherche de tryptophane désaminase)	- Perchlorure de fer - Eau distillé	3,4g 100ml
Réactif Kovacs (pour la recherche de l'indole)	- Paradiméthylaminobenzaldéhyde - Alcool isoamylique - HCL 37%	5g 75ml 25ml
Réactif VPI (pour la recherche de l'acétoïne)	- Hydroxyde de potassium -Eau distillée	40g 100ml
Réactif VPII (pour la recherche de l'acétoïne)	- Alpha naphto - Ethanol	6g 100ml
Réactif NIT I (pour la recherche du nitrate réductase)	- Acide sulfamilique - Acide acétique 5N	0.8g 100ml
Réactif NIT II (pour la recherche du nitrate réductase)	- Naphtylamine - Acide acétique 5N	0.5g 100ml

Annexe 3 : les milieux de culture

Composition : Formule en grammes par litre d'eau distillée.

Tableau de la composition des milieux de cultures.

Milieu	Produits	Composition (g/l)
Bouillon Nutritif	-Tryptone -Extrait de viande -Chlorure de sodium -Eau distillée	10,0 5,0 5,0 1000ml
Gélose nutritive	- Tryptone	5,0

	<ul style="list-style-type: none"> - Extrait de viande - Extrait de levure - Chlorure de sodium - Agar agar bactériologique - PH : 7,4 	<p style="text-align: right;">1,0</p> <p style="text-align: right;">2,0</p> <p style="text-align: right;">5,0</p> <p style="text-align: right;">12,0</p>
Gélose Chapman	<ul style="list-style-type: none"> - Peptone - Extrait de viande de boeuf - Chlorure de sodium - Mannitol - Rouge de phénol - Agar-agar - Eau distillé - PH : 7,4 	<p style="text-align: right;">10</p> <p style="text-align: right;">1</p> <p style="text-align: right;">75</p> <p style="text-align: right;">10</p> <p style="text-align: right;">0,025</p> <p style="text-align: right;">15</p>
Gélose Mac Conkey	<ul style="list-style-type: none"> - Peptone - Lactose - Sels Biliaires - Cristal violet - Rouge Neutre - Chlorure de sodium - Agar - PH : 7,1 	<p style="text-align: right;">20</p> <p style="text-align: right;">10</p> <p style="text-align: right;">1,5</p> <p style="text-align: right;">0,001</p> <p style="text-align: right;">0,05</p> <p style="text-align: right;">5</p> <p style="text-align: right;">15</p>
Bouillon cœur cervelle (B.H.I.B).	<ul style="list-style-type: none"> - Protéose-peptone - infusion de cervelle de veau - infusion de cœur de bœuf - glucose - chlorure de sodium - hydrogénophosphate de sodium - PH 7,4 	<p style="text-align: right;">10</p> <p style="text-align: right;">12,5</p> <p style="text-align: right;">5</p> <p style="text-align: right;">2 5</p> <p style="text-align: right;">2,5</p>
Gélose Mueller-Hinton	<ul style="list-style-type: none"> - Infusion de viande de bœuf - Hydrolysate de caséine - Amidon - Agar - pH : 7,4 	<p style="text-align: right;">300</p> <p style="text-align: right;">17,5</p> <p style="text-align: right;">1,5</p> <p style="text-align: right;">17</p>

Annexe 4 : Tableaux de lecture des Galeries biochimiques.

Tableau de lecture de Galerie biochimique API 20E

Tests	Groupements active	Réactions/ Enzymes	Résultats	
			Positive	Négative
ONPG	Ortho-nitro-phényle-B-D-Galactopyranosi	Beta-galactosidase	Positive	Négative
			Incolore	Jaune
ADH	Arginine	Arginine désahydrolase	Jaune	Rouge/orange
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orangé
ODC	Orthine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orange
 CIT 	Sodium citrate	Utilisation de citrate	Vert	Bleu-vert/orange
H2S	Thiosulfate de sodium	Production de H2S	Incolore	Noir
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orange
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Jaune	Marron
IND	Tryptophane	Production d'indole	Incolore	Rose
 VP 	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP1+ VP2	
			Incolore	Rose/rouge
 GEL 	Gélatine emprisonnant de charbon	Gélatinase	Pas de diffusion de pigment noir	Diffusion de pigment noir
GLU	Glucose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune/vert jaune
MAN	Mannitol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
SOR	Sorbitol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
RHA	Rhamnose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
SAC	Sucrose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
MEL	Melibiose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
ARA	Arabinose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune

No₃- NO₂	GLU tube	Production de NO ₂ réduction N ₂ gaz	NIT 1+NIT 2, 2-3 min	
			Jaune	Rouge

Tableau de Lecture de galerie biochimique API 20NE

Tests	Substrat	Enzymes/Réactions	Résultats	
NO₃	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites	Négatif	Positif
			NIT 1 + NIT 2 / 5 min	
		Réduction des nitrates en azote	Incolore	Rouge-rose
			ZN / 5 min	
			Rose	Incolore
TRP	Tryptophane	Formation d'indole	TRP / 3-5 mn	
			Incolore	Goutte rouge
GLU	Glucose Fermentation	Fermentation	Bleu à vert	Jaune
ADH	Arginine	Arginine DiHydrolase	Jaune	Orange/rose/ Rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Orange/rose/ Rouge
ESC	Esculine	Hydrolyse	Jaune	Gris/marron/Noir
GEL	Gélatine	Hydrolyse	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment noir
PNPG	p-nitro-phényl-β- Dgalactopyranoside	β-galactosidase	Incolore	Jaune
GLU	Glucose	Assimilation	Transparence	Trouble
ARA	Arabinose			
MNE	Mannose			
MAN	Mannitol			
NAG	N-acétylglucosamine			
MAL	Maltose			
GTN	Gluconate			
CAP	Caprate			
ADI	Adipate			

MLT	Malate			
CIT	Citrate			
PAC	Phényl-acétate			
OX	Tetraméthyl-p-phenylène Diamine	Cytochrome oxydase	Incolore	Violet

Tableau de Lecture de galerie biochimique API STAPH

Tests	COMPOSANTS ACTIFS	Enzymes/Réact ions	Résultats			
			Négatif	Positif		
0	Aucun	Témoin négatif	Rouge	-		
GLU	D-glucose	Témoin Positif	Rouge	Jaune		
FRU	D-fructose	acidification				
MNE	D-mannose	acidification				
MAL	D-maltose	acidification				
LAC	D-lactose	acidification				
TRE	D-tréhalose	acidification				
MAN	D-manitol	acidification				
XLT	xylitol	acidification				
MEL	D-mélibiose	acidification			Rouge	Jaune
NIT	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites			NIT 1 + NIT 2 / 10 min	
			Incolore-rose pâle	Rouge		
PAL	β-naphtyl phosphate	Phosphatase Alcaline	ZYM A + ZYM B / 10 min			
			Jaune	Violet		
VP	Sodium pyruvate	Production d'acétyl méthyl- carbinol	VP 1 + VP 2 / 10 min			
			Incolore-rose pâle	violet-rose		
RAF	D-raffinose	acidification	Rouge	Jaune		
XYL	D-xylose	acidification				
SAC	D-saccharose	acidification				
MDG	Méthyl-αD- glucopyranoside	acidification				

NAG	N-acétyl-glucosamine	Acidification		
<u>ADH</u>	L-arginine	Arginine DiHydrolase	Jaune	Rouge/orange
<u>URE</u>	urée	UREase	Jaune	Rouge/violet

Résumé :

Le laboratoire de microbiologie a cause des manipulations des échantillons riche en microorganismes très diversifiés (bactéries, virus ou parasites est présente un lieu à risque surtout infectieux. Ces microorganismes sont des agents pathogènes, responsables des infections acquises au laboratoire.

Ainsi, en cas des non respects des stratégies de maitrise des risques, ces microorganismes peuvent être une source majeure et importante d'infection respiratoire et cutanée. L'objectif principal de notre étude réalisée durant la période allant du 13 février au 22 mars 2022 est l'étude (isolement et identification) des bactéries susceptibles de jouer une responsabilité des contaminations dans le laboratoire de microbiologie de l'Université 8 Mai 1945 de Guelma et évaluer leur Resistance et/ou leur sensibilité vis-à-vis aux des antibiotiques standardisés.

Les résultats obtenus nous montrent la présence d'un grand nombre des bactéries sur les quatre lieux de prélèvement (poignet de la porte, robinet, microscope optique, paillasse). Les principales bactéries isolées sont (*staphylococcus xylosus*, *Enterobacter cloacae*, *Myroide Spp*) La majorité de ces microorganismes sont résistants aux agents antimicrobiens utilisés ce que peut être considéré comme un risque de contamination assez important et un fléau de santé publique. De ce fait et pour éviter ces problèmes de contamination, des pratiques rigoureuses et régulières doivent impérativement appliquées.

Mots clés : Risque infectieux, laboratoire de microbiologie, bactéries, contamination, microorganismes.

Summary :

Due to its permanent exposition to contaminants, microbiology laboratory presents a high risk of microbial infections. These microorganisms may be pathogenic agents, responsible for infections acquired in the laboratory. Thus, in the event of non-compliance with risk management strategies, these microorganisms can be a major and important source of respiratory and skin infections. The main objective of our study carried out during the period from February 13 to March 22, 2022 is the study (isolation and identification) of bacteria likely to be responsible for contamination in the microbiology laboratory of the University May 8, 1945 of Guelma and assess their resistance and/or sensitivity to standardized antibiotics. The results obtained show the presence of a large number of bacteria at the four sampling locations (door handle, faucet, optical microscope, bench). The main bacteria isolated are (*Staphylococcus xylosus*, *Enterobacter cloacae*, *Myroide Spp*). The majority of these microorganisms are resistant to the antimicrobial agents used, which can be considered as a fairly significant risk of contamination and a public health scourge. As a result, and to avoid these contamination problems, rigorous and regular practices must imperatively be applied.

Keywords: Infectious risk, microbiology laboratory, bacteria, contamination, microorganisms.

ملخص:

يمثل مختبر علم الأحياء الدقيقة مكانا معرضا لخطر العدوى بسبب التلاعب بالعينات (البكتيرية أو الفيروسية أو الطفيلية) حيث تعتبر غالبية هذه الكائنات الدقيقة كائنات مقاومة للعوامل المستخدمة كمضادات حيوية. وفي حالة عدم الامتثال لاستراتيجيات إدارة المخاطر يمكن أن تكون هذه الكائنات الحية الدقيقة مصدرا رئيسيا للالتهابات ومهددة للبيئة والصحة العامة.

تم خلال الفترة من 13 إلى 22 مارس 2022 دراسة البكتيريا التي يحتمل أن تكون مسؤولة عن التلوث في مختبر الأحياء الدقيقة بجامعة 8 ماي 1945 في قالمة، حيث قمنا بعزل وتحديد البكتيريا بالإضافة إلى معرفة مدى مقاومتها وحساسيتها للمضادات الحيوية المعيارية.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها وجود عدد كبير من بكتيري (*staphylococcus xylosus*) (*Enterobacter cloacae*, Myroide spp) في أربعة مواقع لأخذ العينات (مقبض الباب، الصنبور، المجهر الضوئي و سطح طاولة العمل). ولتجنب مشكل التلوث في المختبر لابد من تطبيق قواعد منظمة وصارمة.

الكلمات المفتاحية: مخاطر معدية، مختبر علم الأحياء الدقيقة، بكتيريا، تلوث، الكائنات الحية الدقيقة.