

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE
ET DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT D'ECOLOGIE ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT



Mémoire du Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité/Option : Santé, Eau et Environnement/ Microbiologie de l'environnement.

Thème

Evaluation du risque infectieux des réseaux d'eau dans les établissements de santé cas de Ibn Zohr et El Hakim Okbi wilaya de Guelma

Présenté par :

BOUDJEHEM Wahida.

Devant le jury composé de :

- | | | |
|---|--------------|----------------------|
| -Présidente : Mme BOUSSADIA Meriem Imen | (M.A.A) | Université de Guelma |
| -Examinatrice : Mme Torche Asma | (M.C.B) | Université de Guelma |
| -Encadreur : Mr. HOUHAMDI Moussa | (Professeur) | Université de Guelma |

Juin 2015

Remerciement

*Mon remerciements s'adresse au monsieur **Houhamdi Moussa** Professeur en biologie au département de biologie de l'université de Guelma qui je fais l'honneur de me guider et me diriger tout le long de mon travail.*

Mes remerciements vont également à la commission d'examen :

*Présidente : Madame **Boussadia Meriem Imene** Maitre Assistant A.*

*Examinatrice : Madame **Torche Asma** Maitre Assistant A.*

Tout deux enseignants au département de biologie de l'université de Guelma, qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce modeste travail ; qu'ils soient assurés de ma profonde gratitude.

*Spéciale remerciement a **Mr Rouabhia** qui m'a aidé dans toute la période de mon travail, Merci, Je remercier également **Mr Jiradi Abd El Rahmen** qui m'aide à travail dans la DDS*

*Je remercier également les demoiselles : **Sana Abdellioui** (Co- encadreur), **Kafi Fadila**, , **Rouaygiya Meriem**, **Haddad Soumia**, **Razkallah Sara** ;doctorantes chez Mr Houhamdi dans le laboratoire de recherche.*

*Je me saurais finir sans remercier tous les enseignants du département de biologie de l'université de Guelma et les responsables de laboratoire du département, surtout Mme **Wafa**, Mme **Houria**, Mme **Asma** et Mme **Zahia**.*



Dédicace

En premier lieu et avant tout, Louange à Dieu le Miséricordieux qui m'a éclairé la voix de la science et de la connaissance.

Je dédie cette thèse, fruit de recherche et d'étude:

A la femme que son amour est creusé dans mes fons les plus profond depuis ma naissance, à ma mère «Zouhra ». Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi.

Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours.

Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes cotés pour me consoler quand il fallait.

En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime, seul ALLAH peut vous gratifier de tout ce que vous avez fait pour nous, qu'ALLAH le tout puissant te gardera pour moi ma très douce maman.

A mon amour, mon respect et mon exemple dans ma vie, mon très chère père « Abd Allah », qui ma très bien élevé et ma pousser devenir ce qui je suis. Vous avez fait d'énormes sacrifices pour vos enfants et vous n'avez jamais cessé de nous prodiguer des conseils pour le droit chemin. Que votre simplicité, votre disponibilité, et votre respect pour les autres me servent d'exemples, que dieu te garderas pour moi.

A mes chères sœurs, la grande et ma deuxième maman «Leila » et son mari Mouhamed tu m'as soutenue durant tous les périodes de ma vie, merci, que Dieu, le tout puissant, vous protège et vos petits enfants Ibrahim et Outhman.

A «Saliha », qui a toujours souhaité que je réussisse dans mes études et dans ma vie , je te souhaite une vie pleine de bonheur et de succès

A «Samia », et son mari Chamse dine..., la vie m'a fait un très beau cadeau en faisant de toi ma sœur. Merci de votre aide durant la période de mon étude.

A «Soria », ma sœur adorée, qui est très proche pour moi et qui m'aide durant tous ma période de vie, merci ma douce.

A mon seul frère «Mourad », en témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse, je te souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.

A mes grands parents J'aurais tant aimé que vous soyez présents. Qu'Allah ait vos âmes dans sa sainte miséricorde, a mes grandes mamans que Allah, le tout puissant, vous protège.

A mes cousines et mes cousins «Nour », «Nounou », «Selma », «Yousra » et surtout à ma chère cousine et mon vraie amie «Amina» qui m'aide sur tout cette période d'étude merci ma chérie.

A mon très chère ami «Walid », aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour toi, tu as une grande partie spéciale et très important dans mon cœur, mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère. Je prie dieu le tout puissant pour qu'il te donne tout bonheur et prospérité.♥

A mes amies et mes amis, mes collègues : «Ilhem », «Fadia », «Houda», Sara, Abdou, Karim, Ahmed, En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble.

Wahida

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste d'abréviations

Introduction

Chapitre I : l'eau dans les établissements de santé

1.	Installations de distribution de l'eau dans les établissements de santé.	3
2.	L'eau et leurs usages de l'eau dans les établissements de santé	4
2.1.	Eaux ne subissant aucun traitement dans l'établissement de santé	4
2.1.1.	Eau à usage alimentaire	4
2.1.1.1.	l'eau d'entrée	4
2.1.1.2.	l'eau aux points d'usage	4
2.1.2.	Eau pour soins standards	5
2.2.	Eaux spécifiques traitées au sein de l'établissement de sante, répondant à des critères définis en fonction des usages :	5
2.2.1.	Eau bactériologiquement maîtrisée	5
2.2.2.	Eau chaude	7
2.2.3.	Eaux pour hémodialyse HD	9
2.3.	Eaux techniques	11
2.3.1.	Installations centrales de climatisation d'air	11
2.3.2.	Tours de refroidissement	11

Chapitre II: Risques sanitaires et connaissance de modes de défaillances de la distribution de l'eau à l'hôpital

1.	Risques infectieux liés à l'utilisation de l'eau à l'hôpital	12
1.1.	Risques infectieux	12
1.1.1.	Définition et évaluation des maladies infectieuses	12
1.1.2.	Principales maladies infectieuses liées à l'usage des eaux et leur mode de transmission.	13
1-1-2-1	voie respiratoire	13

1.1.2.2. Voie Digestif	15
1.2. Le risque toxique	19
2. Principaux modes de défaillances de la distribution de l'eau	20
2.1. La prolifération excessive du biofilm	20
2.1.1. Définition	20
2.1.2. développement d'un biofilm bactérien	20
2.1.3. Agent bactérien formant un biofilm	22
2.1.4. Les effets d'un biofilm	23
Chapitre III : Matériel et méthodes	
1. Matériel	24
2. Stratégie d'échantillonnage	26
2.1. Choix de sites de prélèvement	26
2.2. Mode de prélèvement	27
2.3. Transport et conservation des échantillons	28
3. Analyses physico-chimique	28
3.1. Dosage du chlore libre	28
3.2. Mesure de la turbidité	29
3.3. Mesure de pH	30
3.4. Mesure de la température	30
4. Analyse bactériologique	31
4.1. Recherche et dénombrement sur milieu liquide	31
4.1.1. Recherche et dénombrement des micro-organismes revivifiables	31
4.1.2. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et coliformes fécaux	32
4.1.3. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux	34
4.1.4. Recherche et dénombrement des spores de <i>Clostridium</i> ssulfito-réducteurs	36
4.2. Recherche des germes pathogènes	38
4.2.1. Recherche de <i>Salmonella</i> et <i>Shigella</i>	39
4.2.2. Recherche de <i>Vibrio cholerae</i>	43
4.2.3. Recherche des <i>Staphylococcus</i>	45
4.2.4. Recherche de <i>Pseudomonas</i>	48
4.2.5. Recherche de <i>Yersinia enterocolitica</i>	49
4.3. Recherche et de dénombrement par filtration sur membrane filtrante	51

4.3.1. Définition	52
4.3.2. Matériel pour filtration sur membranes	52
4.3.3. Technique de la filtration sur membrane	52
4.4. Identification microbienne	54
4.4.1. Examen macroscopique des caractères cultureux	54
4.4.2. Examen microscopique	55
4.4.3. Examens liés aux caractères biochimiques	56
4.4.3.1. Galerie biochimique classique	56
4.4.3.2. Api Système	59
4.4.4. Antibiogramme (méthode de disques)	65
4.4.4.1. Principe	65
4.4.4.2. Technique	65

Chapitre IV : Résultats et discussion

1. Les paramètres physicochimiques	68
1.1. La température (T)	68
1.2. Le Potentiel Hydrogène (pH)	69
1.3. La turbidité (NTU)	70
1.4. Chlore libre (CL)	71
2. Les analyses microbiologiques	72
2.1. Recherche et dénombrement des germes totaux revivifiables	72
2.2. Recherche et dénombrement des germes indicateurs de contamination fécale	75
2.2.1. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et coliformes fécaux	75
2.2.2. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux	79
2.2.3. Recherche et dénombrement des spores des bactéries anaérobies sulfito-réducteurs (ASR)	81
2.3. Identification des colonies bactériennes	83
2.3.1. Caractères morphologiques et coloration de Gram	83
2.3.2. Résultats de l'identification biochimique	85
2.3.3. Identification par la galerie biochimique classique	90
2.3.4. Identification par les API systèmes	91
2.3.5. Résultats de l'antibiogramme	95
2.3.6. Interprétation de l'antibiogramme	100

Conclusion.

Résumé.

Références bibliographiques.

Annexes.

Liste des tableaux :

Nº de tableau	Titre du tableau	Nº de page
01	critères et limites de qualité bactériologique des eaux destinées à la consommation humaine.	04
02	Les paramètres microbiologiques retenus pour l'eau pour soins standards.	05
03	Les paramètres microbiologiques retenus pour l'eau bactériologiquement maîtrisée	06
04	Paramètres microbiologiques et niveaux exigés retenus pour l'eau chaude	08
05	les niveaux de qualité à respecter pour l'eau pour hémodialyse conventionnelle.	10
06	les niveaux de la qualité à respecter pour l'eau pour hémofiltration et hémodiafiltration en ligne.	11
07	caractéristiques cliniques respectives de la maladie de légionellose.	14
08	Les caractéristiques respectives de l'infection pulmonaire provoquée par MNT	15
09	résumé les caractéristiques respectives de la maladie de choléra	16
10	caractéristiques cliniques respectives de la maladie de l'amibiase.	17
11	caractéristiques cliniques respectives de la fièvre typhoïde.	18

12	résume les caractéristiques respectives la Giardiase.	19
13	Le matériel de laboratoire utilisé durant notre travail.	25
14	Les services qui ont fait l'objet des prélèvements d'eau au niveau des centres hospitaliers de la ville de Guelma.	26
15	Classes de turbidité usuelles (NTU, nephelometric turbidity unit)	30
16	La couleur des colonies isolées à partir des géloses SS et Hektoen.	40
17	Caractères d'identification biochimique de <i>Shigella</i>	42
18	Caractères biochimiques différentiels des différentes souches de <i>Shigella</i>	42
19	Principaux caractères d'orientation du diagnostic des <i>Vibrio</i> potentiellement pathogènes.	44
20	Les principaux caractères discriminants permettant le diagnostic d'espèce de <i>Staphylococcus</i>	47
21	Caractéristiques d'identification des principales espèces de <i>Pseudomonas</i>	49
22	Les différentes étapes de la technique de filtration sur membrane.	53
23	Lecture et interprétation des tests biochimiques du milieu TSI.	58
24	Variations de germes revivifiables dans l'eau à l'EPH Ibn Zohr et El Hakim Okbi.	73
25	Variations de coliformes totaux dans l'eau à l'EPH Ibn Zohr et à l'EPH Hakim Okbi(CT/ml).	75
26	Variations de coliformes fécaux dans l'eau à l'EPH Ibn Zohr et à l'EPH Hakim Okbi(CF/ml).	77
27	Variations de streptocoques fécaux dans l'eau à l'EPH Ibn Zohr et à l'EPH Hakim Okbi (SF/ml).	79
28	Dénombrement des spores des bactéries anaérobies sulfito-réducteurs(ASR/20 ml)dans l'eau à l'EPH Ibn Zohr et l'EPH El Hakim Okbi	82

29	Aspects macroscopiques et microscopiques des colonies bactériennes isolées dans l'eau des différents établissements de santé (EPH Ibn Zohr ; EPH Al Hakim Okbi)	83
30	Résultats du profil biochimique des <i>Staphylococcus</i> isolés	86
31	Résultats du profil biochimique des <i>Pseudomonas</i> isolé	88
32	Résultats du profil biochimique des <i>Aerococcus</i> isolés.	90
33	Les espèces identifiées par la galerie biochimique classique.	90
34	Les espèces identifiées par l'API 20 E et l'API 20 NE, Api20 Strep, Api 20Staph.	92
35	Résistances et sensibilités aux antibiotiques des Entérobactéries	95
36	Résistances et sensibilités aux antibiotiques des non Entérobactéries (NE)	96
37	résistances et sensibilités aux antibiotiques des <i>Staphylococcus</i> .	96
38	résistances et sensibilités aux antibiotiques des <i>Pseudomonas</i>	97
39	résistances et sensibilités aux antibiotiques des <i>Streptococcus. groupe viridans</i>	97
40	Taux de résistances et sensibilités des espèces étudiées et l'antibiogramme schématisé en boites	98

Liste des figures

N° de figure	Titre de figure	N° de page
01	configuration d'un branchement d'eau d'alimentation d'une distribution intérieure, raccordé à une conduite publique	03
02	Amibiase intestinal	17
03	représentations schématiques de la formation et de la structure d'un biofilm au sein d'un réseau de distribution	22
04	EPH IbnZohr.	26
05	EPH El-Hakim Okbi.	26
06	Mode de prélèvement d'eau à partir d'un robinet	27
07	Pastille de réactif chimique DPD N°1	29
08	Turbidimètre	29
09	Multiparamètres utilisé	30
10	Protocole de recherche et dénombrement des microorganismes revivifiables à 22 °C et à 37°C dans les eaux.	32
11	Protocole de recherche et dénombrement des coliformes totaux, fécaux et <i>E. coli</i> dans les eaux.	34
12	Protocole de recherche et dénombrement des streptocoques fécaux dans les eaux.	36

13	Protocole de recherche et dénombrement des spores des bactéries anaérobies sulfito-réducteurs dans les eaux.	38
14	Protocole opératoire de la recherche de <i>Salmonella</i> dans les eaux	41
15	Protocole opératoire de recherche et identification de <i>Vibriodans</i> les eaux	45
16	Protocole de recherche de <i>Staphylococcus</i> dans les eaux	47
17	Protocole de recherche de <i>Pseudomonas</i> dans les eaux	49
18	Protocole de recherche de <i>Yersinia enterocolitica</i> dans les eaux	51
19	Schéma simplifié d'un appareil de filtration	52
20	Membrane filtrante 0.45 micron	52
21	Les étapes de la filtration sur membrane	53
22	Procédure de la coloration de Gram	55
23	Présentation de la galerie API 20E	61
24	Api 20 E tous les tests positifs (en haut) et tous-tests négatifs (en le bas).	61
25	Api 20 NE tous les tests positifs (en haut) et tous-tests négatifs (en le bas).	62
26	Api 20 Strep tous les tests positifs (en haut) et tous-tests négatifs (en bas).	64
27	Api 20 Staph tous les tests positifs (en haut) et tous-tests négatifs (en bas)	65
28	protocole présente l'ensemencement par écouvillonnage.	66
29	La lecture d'antibiogramme.	67

30	Variations de la température de l'eau à l'EPH Ibn Zohr et l'EPH Hakim Okbi	69
31	Variations de pH de l'eau à l'EPH Ibn Zohr et l'EPH Hakim Okbi	69
32	Variations de la turbidité de l'eau à l'EPH Ibn Zohr et l'EPH Hakim Okbi.	70
33	Variations de chlore libre de l'eau à l'EPH Ibn Zohr et l'EPH Hakim Okbi.	72
34	Variations de germes revivifiables dans l'eau à l'EPH Ibn Zohr et l'EPH Hakim Okbi.	73
35	Germes totaux à 22°C Par incorporation sur milieu solide	74
36	Germes totaux à 37°C Par incorporation sur milieu solide	74
37	Germes totaux à 22°C Par filtration sur membrane	74
38	Germes totaux à 37°C Par filtration sur membrane	74
39	Variations de coliformes totaux dans l'eau à l'EPH Ibn Zohr et l'EPH Hakim Okbi	76
40	Dénombrement des coliformes totaux par la méthode de NPP	76
41	Dénombrement des coliformes totaux par la méthode de filtration sur membrane	77
42	Variations de coliformes fécaux dans l'eau à l'EPH Ibn Zohr et l'EPH Hakim Okbi.	78
43	coliformes fécaux résultats positifs de test confirmatif de la méthode de NPP	78
44	résultats positif à droite et résultat négatif à gauche	78

45	Dénombrement des coliformes fécaux par la méthode de filtration sur membrane	79
46	Variations de streptocoques fécaux dans l'eau à l'EPH Ibn Zohr et l'EPH Hakim Okbi	80
47	Dénombrement des streptocoques fécaux par la méthode de NPP	80
48	Recherche des Streptocoques fécaux par la méthode de filtration sur membrane	81
49	Cocci à Gram positif en courtes chaînettes (Grossissement $\times 100$).	81
50	Dénombrement des spores des bactéries anaérobies sulfito-réducteurs	82
51	Observation microscopique des formes sporulantes (entourées par un cercle rouge) et végétatives des bactéries anaérobies sulfito-réducteurs (Grossissement $\times 100$).	82
52	Aspect des colonies sur gélose Hektoen, gélose SS, gélose Mac Conkey, gélose GNAB et gélose Cetrimide (respectivement de gauche à droite).	85
53	Aspect des colonies sur gélose Chapman	85
54	Cocci à Gram positif en amas (Grossissement $\times 100$).	85
55	Aspect des colonies sur gélose Chapman	86
56	Cocci à Gram positif en grappe de raisin (Grossissement $\times 100$).	86
57	Test de staphylocoagulase négatif.	86
58	Test oxydase (positif à gauche, négatif à droite)	86

59	Test catalase (positif à gauche, négatif à droite)	87
60	Mannitol positif à droite et mannitol négatif à gauche.	87
61	Aspect des colonies sur gélose cétrimide	88
62	Bacilles à Gram négatif (Grossissement ×100).	88
63	Résultat de la Recherche de la pyocyanine et de la pyoverdine dans les milieux King A et King B.	88
64	Aspect des colonies sur gélose Chapman.	89
65	Bacilles à Gram positif (Grossissement ×100).	89
66	Aspect des colonies sur membrane filtrante	89
67	Cocci à Gram positif en amas (Grossissement ×100).	89
68	profil biochimique classique d' <i>Escherichia coli</i>	90
69	profil biochimique classique d' <i>Enterobacter aerogenes</i>	90
70	profil biochimique classique d' <i>Enterobacter chloacae</i>	91
71	profil biochimique classique de <i>Citrobacter freundii</i>	91
72	profil biochimique classique de <i>Citrobacter brakii</i>	91
73	profil biochimique d' <i>Escherichia coli 1</i>	92
74	profil biochimique de <i>Citrobacter brakii</i>	93
75	profil biochimique d' <i>Enterobacter chloasae</i>	93

76	profil biochimique de <i>Enterobacter sakazakii</i>	93
77	profil biochimique de <i>Aeromonas hydrophila.</i>	93
78	profil biochimique de <i>Aeromonas hydrophila.gr. 2</i>	93
79	profil biochimique de <i>Aeromonas hydrophila / caviae</i>	93
80	profil biochimique de <i>Pseudomonas luteola</i>	94
81	profil biochimique de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	94
82	profil biochimique de <i>Staphylococcus hominis</i>	94
83	profil biochimique de <i>Staphylococcus xylosus</i>	94
84	profil biochimique de <i>Kocuria varians/rosea</i>	94

Liste d'abréviations

- AK :** Amikacine
- AMX :** Amoxicilline
- ASR :** Anaérobies sulfite reducteurs
- AUX :** Auxaciclline
- BCPL :** Bouillon lactosé au pourpre de Bromocrésol
- C :** Colistine
- CF :** Coliformes fécaux.
- CL :** Chloromphénicol
- CL :** Chlore libre.
- CT :** Colistine.
- CX :** Céfoxitine.
- CZ :** Céfazoline.
- E :** Erythromycine.
- EPA :** Eau peptonée alcaline.
- EPH :** Etablissement public hospitalier.
- FO :** Fosfomycine.
- GEN :** Gentamicine.
- GNAB :** Gélose nutritive alcaline biliée (milieu d'isolement)
- GT :** Germes totaux.
- HD :** Hémodialyse.

- NIN :** Ninhydrine.
- MNT :** Mycobactéries non tuberculeuses.
- NE :** Non entérobacteriaceae.
- NPP :** Nombre le plus probable.
- NTU :** Nephelometric turbidity Unit.
- P:** Pénicilline.
- CF :** Coliformes fécaux.
- SPP:** Sous espèce.
- SS:** Salmonelles shigelles.
- TCBS :** Thiosulfate citrate de bleu de bromothymol saccharose.
- TDA :** Tryptophane Désaminase .
- TGEA :** Tryptophane glucose extract agar.
- TTC :** Chlorure de triphényltétrazolium.
- TSI :** Triple Sugar Iron.
- UFC :** Unité formant colonie.
- UV :** Ultraviolet.
- VA :** Vancomycine.
- VMA:** Valeur maximale admissible.

Introduction

Les réseaux de distribution d'eau dans les établissements de santé est soumis à une pression de contamination microbiologique qui constitue par fois de véritables niches écologiques, cette contamination peut être liée au retour d'eau polluées, au travers sur le réseau, à la formation d'un biofilm sur les canalisations et à l'existence de nids microbiens en des points de stagnation. Inversement l'eau joue fréquemment le rôle d'un vecteur émetteur de microorganismes par certains systèmes de l'humidification des souches ou encore par aérosolisation à partir des siphons et des robinets.

Pour qu'un microorganisme peut survivre et/ ou se multiplier dans un milieu qui peut être l'eau de réseau de distribution, ce dernier doit présenter des caractéristiques nutritives et physicochimiques satisfaisantes pour chaque type d'espèce. Chaque type d'espèce peut demander un apport minimal de nutriments pour sa survie et sa multiplication faisant de l'eau un environnement propice à son développement et à sa propagation, la capacité de ces bactéries de produire des biofilms à l'intérieur des canalisations lui procure un autre avantage, celui d'être protégé de la pénétration des désinfectants.

L'infection d'origine hydrique peut avoir des conséquences graves pour tout individu et en particulier les immunodéficients. Les différentes bactéries spécifiques de milieu hospitalier sont pathogènes opportunistes, peu virulentes chez les individus normaux et au contraire pathogène spécifique chez les sujets dont les moyens de défenses sont altérés.

La recherche et le dénombrement des bactéries par la méthode de la filtration sur membrane et sur milieu liquide dans les réseaux de distribution de l'eau en milieu hospitalier, comme indicateurs d'une contamination par des bactéries d'origine hydrique qui sont responsables d'infections nosocomiales.

La résistance des bactéries aux antibiotiques reste aujourd'hui un problème majeur de santé publique, la situation apparaît particulièrement en milieu hospitalier où la pression de sélection exercée par l'utilisation importante de l'antibiothérapie et la diffusion épidermique des souches résistantes sont les deux principaux facteurs conditionnant cette évolution.

L'objectif de ce travail est :

-D'identifier les principaux modes de défaillance des installations de distribution de l'eau de robinet et les origines des altérations de la qualité de l'eau.

- Déterminer les valeurs de quelques paramètres physico-chimiques de l'eau à partir de les établissements de sante.

-d'isoler et d'identifier ainsi d'étudier la résistance de ces souches aux antibiotiques de différentes souches collectées.

L'eau est un élément essentiel au fonctionnement des établissements de santé, mais elle peut constituer une source d'infections graves, en cas de contamination, particulièrement pour les patients les plus fragiles. Les principaux risques sanitaires liés à l'utilisation de l'eau dans les établissements de santé doivent donc être identifiés et évalués afin de déterminer les moyens à mettre en œuvre pour maîtriser ces risques (Castex et Dab, 2005).

1- Installations de distribution de l'eau dans les établissements de santé :

Une installation de distribution comprend les conduites d'adduction de l'eau potable, les réservoirs et les équipements raccordés, de manière permanente ou temporaire y compris les installations de production et de distribution d'eaux chaudes sanitaires (Hygis, 1998). Le nombre d'installations et leurs localisations seront définis en fonction de la taille et de l'organisation de l'établissement (Castex et Dab, 2005 ; Jean C, Milliam D, 2005).

L'eau alimentant les réseaux de distribution des établissements de santé provient de la distribution publique et est délivrée comme illustre la (Fig 01) :

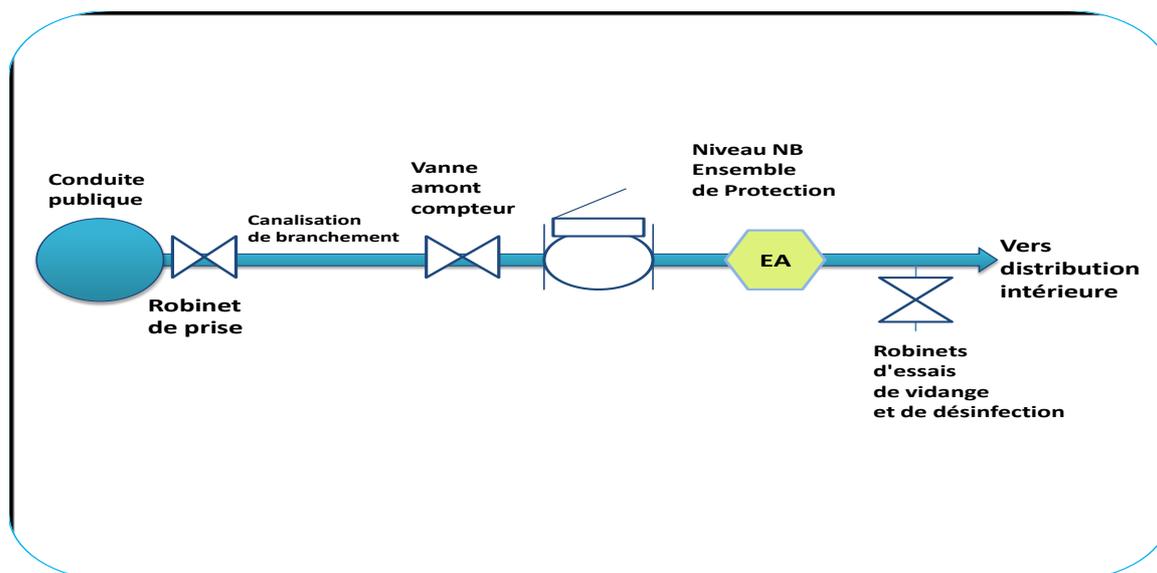


Figure 01 : configuration d'un branchement d'eau d'alimentation d'une distribution intérieure, raccordé à une conduite publique (Castex et Dab, 2005).

Le branchement de l'établissement doit être équipé au point de livraison (en général après le compteur) d'un ensemble de protection sanitaire minimal (vanne + robinet d'essais + clapet de non-retour contrôlable) constituant le niveau de protection pour limiter les retours d'eau du réseau de l'hôpital vers le réseau public (Gauthier et Rosin, 1996 ; Castex et Dab, 2005).

2- L'eau et leurs usages dans les établissements de santé :

Selon les usages auxquelles elles sont destinées, les eaux peuvent être classées en deux catégories :

2-1- Eaux ne subissant aucun traitement dans l'établissement de santé :

2-1-1-Eau à usage alimentaire :

Les réseaux internes aux établissements de santé peuvent être de longueurs variables, être alimentés par des mélanges d'eaux et parfois comporter des réservoirs, ce qui peut impliquer des variations de la qualité de l'eau distribuée. C'est pourquoi on distingue deux sous-catégories d'eau : l'eau d'entrée dans l'établissement de santé et l'eau distribuée aux points d'usage (Jean et Milliam, 2005).

2-1-1-1- l'eau d'entrée :

Elle est définie comme celle arrivant à l'entrée de l'établissement que ce soit à l'interface avec le réseau public ou à la sortie d'un forage propre à l'établissement (Castex et Dab, 2005).

♣ Paramètres bactériologiques :

Tableau 01 : critères et limites de qualité bactériologique des eaux destinées à la consommation humaine (Norme Marocaine, 2001)

Paramètres	Valeur maximale admissible (VMA)
<i>Escherichia coli</i>	0/100 ml
Entérocoques Intestinaux	0/100 ml

2-1-1-2- l'eau aux points d'usage:

Elle est définie comme celle étant consommée ou utilisée directement ou indirectement par toute personne au sein de l'établissement. (Jean et Milliam, 2005). Cette définition concerne l'eau froide de chaque robinet intérieur ou extérieur aux bâtiments au sein de l'établissement. Ces eaux sont destinées à des usages alimentaires et sanitaires. Elles comprennent également les eaux mises à disposition des patients (Castex et Dab, 2005).

2-1-2- Eau pour soins standards :

Outre son utilisation pour des usages alimentaires, l'eau distribuée par le réseau peut être utilisée pour les soins standards (soins de base pour des patients sans risque particulier) en mélange avec de l'eau chaude pour produire de l'eau mitigée. Cette dernière est celle la plus utilisée pour les soins. L'eau pour soins standards peut aussi être utilisée pour le nettoyage et le rinçage de certains dispositifs médicaux, comme par exemple le rinçage terminal des endoscopes en endoscopie ORL, digestive haute et basse, sauf en cas d'accès à une cavité stérile (Chiguer, 2013).

♣ Qualité de l'eau :

Tableau 02 : les paramètres microbiologiques retenues pour l'eau pour soins standards. (Chiguer, 2013)

Paramètres microbiologiques	Niveau cible
Flore aérobie revivifiable à 22°C	≤ 100 UFC / ml
Flore aérobie revivifiable à 36°C	≤ 10 UFC / ml
Coliformes totaux	<1 UFC / 100 ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<1 UFC / 100 ml

2-2- Eaux spécifiques traitées au sein de l'établissement de sante, répondant à des critères définis en fonction des usages :

Il s'agit des eaux destinées à des usages alimentaires, sanitaires et de soins, ayant subi un traitement au sein de l'établissement de santé.

2-2-1-Eau bactériologiquement maîtrisée :

L'eau bactériologiquement maîtrisée, obtenue après traitement, présente une qualité bactériologique supérieure à celle du réseau de distribution. Elle est destinée aux patients les plus vulnérables ainsi que pour des soins au contact des muqueuses ou exposant à un risque infectieux particulier (comme par exemple le rinçage terminal des fibroscopes bronchiques) (Castex et Dab, 2005).

♣ Qualité de l'eau :

Les paramètres microbiologiques retenus pour l'eau bactériologiquement maîtrisée sont les suivants :

Tableau 03: Les paramètres microbiologiques retenus pour l'eau bactériologiquement maîtrisée sont résumés dans le tableau ci-dessous. (Castex et Dab, 2005)

Paramètres	Niveau cible	Niveau d'action
Flore aérobie revivifiable à 22°C	≤ 1 UFC / 100 ml	≥ 10 UFC / 100 ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	< 1 UFC / 100 ml	≥ 1 UFC / 100 ml

A- Moyen d'obtention :

La microfiltration au point d'usage est le procédé de traitement le plus classique. La microfiltration consiste à retenir sélectivement les particules solides présentes dans un fluide (liquide ou gaz) par passage, sous vide ou sous pression, au travers d'un milieu microporeux appelé filtre. Sur le plan de la taille particulaire, la zone d'application se situe entre 0,1 et 10 µ. Au-delà, on parle de filtration et en-deçà d'ultrafiltration.

L'eau obtenue après la microfiltration peut être utilisée dans les services pharmaceutiques (Becker et Lebas, 1988).

B-1- Traitements de décontamination :

Selon la norme AFNOR NF C 72100 de Décembre 1977, il ne s'agit en effet que d'une décontamination : "la décontamination est une opération au résultat momentané, permettant d'éliminer, de tuer ou d'inhiber les microorganismes indésirables en fonction des objectifs fixés. Les résultats de cette opération sont limités aux microorganismes présents au moment de l'opération".

Pour la décontamination, on admet une inactivation bactérienne correspondant à une définition statistique de l'ordre de 10^{-3} (Becker et Lebas, 1988).

B-2- Les rayonnements UV :

L'eau en mince couche (8 à 45 mm) est exposée aux radiations d'un générateur d'ultraviolets à vapeur de mercure à froids (longueur d'onde de 253 nanomètre). La durée des

lampes est de 7000 heures de flux continu. C'est un procédé actif sur tous les germes qu'ils soient sous forme végétative ou sous forme sporulée. Cependant chaque germe possède sa propre sensibilité et les doses à utiliser pourront varier d'un germe à l'autre : ainsi il faudra 10500 microwatts seconde/cm² pour détruire un *Pseudomonas Aeruginosa* et 5720 microwatts seconde/cm² pour détruire un *Staphylococcus Albus*. Lorsque les UV sont mal entretenus, les radiations ne sont plus satisfaisantes et l'eau "stérile" peut devenir très contaminée (**Petithory, 1984**).

B-3- Les désinfectants :

Divers désinfectants sont utilisés entre autres dans les circuits d'hémodialyse, afin de décontaminer l'installation et les générateurs individuels. Les plus fréquemment utilisés sont :

- ♣ L'hypochlorite de sodium à 1% de chlore libre permet de dissoudre les viscosités bactériennes dans les tuyauteries. Il nécessite 2 à 3h de contact et le rinçage est assez long.
- ♣ Le méta bisulfite de sodium et le diphonie de sodium à 0,05% peuvent être utilisés en traitement complémentaire de désinfection des modules d'osmose inverse.
- ♣ Le peroxyde d'hydrogène à 1% permet de décontaminer les résines et les membranes de filtres, mais pas les modules d'osmose. Il est peu agressif et nécessite un temps de rinçage relativement court.
- ♣ L'acide per acétique permet d'éliminer les spores et les formes végétatives bactériennes. On peut l'utiliser à 0,2% sur les résines échangeuses d'ions ainsi que pour éliminer dans les tuyauteries les colloïdes pouvant constituer des gîtes bactériens (**Petithory, 1984**).

2-2-2- Eau chaude:

L'eau chaude subit un ou plusieurs traitements (chauffage et éventuellement adoucissement); elle est réservée à la toilette des patients, au nettoyage du matériel, à l'entretien des locaux... Bien qu'elle réponde aux critères de potabilité de l'eau, il est déconseillé de l'utiliser pour la préparation de boissons chaudes et de préparations alimentaires. Elle doit être conforme aux dispositions des textes relatifs à la température de l'eau et à ceux relatifs à la prévention de la légionellose (**Circulaire DGS/SD7A/SD5C-DHOS/E4. 2002**).

Les ballons d'eau chaude sanitaire peuvent constituer des habitats favorables au développement et à la multiplication des germes. Cela a d'ailleurs été démontré pour le *Legionella*. En effet, dans le fond des ballons, règne une température proche de la température de croissance optimale. Comme l'eau circule dans les canalisations à une température 29°C inférieure à 60°C, les bactéries atteignent la surface du ballon et les canalisations. De là, les robinets et les douches vont être contaminés à leur tour, ainsi que les mélangeurs et les aérateurs, au niveau de leurs joints et raccords en caoutchouc.

Finalement des aérosols infectants se développent à partir des douches et peuvent provoquer des épidémies chez les sujets fragilisés, c'est-à-dire essentiellement les malades (Colbourne et Smith, 1983.)

♣ Qualité bactériologique :

Tableau 04 : Paramètres microbiologiques et niveaux exigés retenus pour l'eau chaude. (Circulaire DGS/SD7A/SD5C-DHOS/E4. 2002)

Paramètres Microbiologiques	Niveaux exigés ou Recommandés
<p style="text-align: center;">Indicateur</p> <p style="text-align: center;"><i>Legionella pneumophila</i></p>	<p style="text-align: center;">Niveau cible: < 1000 UFC / l</p> <p style="text-align: center;">Niveau d'alerte : 1000 UFC / l</p> <p style="text-align: center;">Niveau d'action : 10 000 UFC / l</p>

♣ Mesures à mettre en œuvre pour les patients à haut risque (*Legionella pneumophila*) :

Les « patients à haut risque » sont les immunodéprimés sévères et particulièrement les immunodéprimés après transplantation ou greffe d'organe et les immunodéprimés par corticothérapie prolongée (0,5 mg/kg de prédisons pendant 30 jours ou plus, ou équivalent) ou récente et à haute dose (c'est à dire supérieure à 5 mg/kg de prédisons pendant plus de 5 jours). Pour ces patients, l'eau soutirée au niveau des points d'usage à risque, doit viser en permanence l'absence de *Legionella pneumophila* (conformément à la version de septembre 2003 de la norme NF T90-431, l'absence signifie que les résultats visés devront être « <250 UFC/l » et « *Legionella Pneumophila* non détectées ») (Norme NF T90-431, 2003). Les points d'usage à risque pour

les patients à haut risque correspondent aux points d'usage susceptibles d'exposer ces patients à un aérosol ; il s'agit en particulier des douches.

Dans l'impossibilité de réaliser les mesures citées précédemment ou dans l'attente de leur mise en œuvre, les mesures suivantes doivent être mises en place simultanément :

- ♣ les patients à haut risque seront informés du danger de l'utilisation de points d'usage à risque (notamment des douches) non équipés de micro filtres.
- ♣ des alternatives aux douches seront proposées par le CLIN de l'établissement pour éviter que les patients soient en contact avec un aérosol.
- ♣ un protocole de purge des points d'eau, comme douche et robinetterie, dans les chambres accueillant des patients à haut risque sera défini (**Castex et Dab, 2005**).

2-2-3- Eaux pour hémodialyse HD (eau pour dilution des solutions concentrées pour hémodialyse) :

L'eau pour dilution des solutions concentrées pour hémodialyse est obtenue à partir d'eau potable par distillation, par osmose inverse, par échange d'ions ou par tout autre procédé approprié. Les conditions de préparation, de transfert et de conservation permettent de limiter le risque de contamination chimique et microbienne (**Solutions Concentrées Pour Hémodialyse, 2008**).

Lorsque de l'eau obtenue par l'une des méthodes décrites ci-dessus n'est pas disponible, de l'eau potable peut être utilisée pour les dialyses à domicile. Dans ce cas, il convient de tenir compte de sa composition chimique, qui varie considérablement d'une localité à l'autre, et de procéder aux ajustements nécessaires de la teneur en ions pour que la composition finale de la solution diluée corresponde à l'usage prévu (**Solutions Concentrées Pour Hémodialyse, 2008**).

Caractères :

Liquide limpide, incolore et insipide. Et doit satisfaire aux essais suivants:

- ♣ Acidité ou alcalinité : ph neutre (6,8-7,2)
- ♣ Substances oxydables test colorimétrique
- ♣ Chlore total disponible < 0,1ppm
- ♣ Chlorures < 50 ppm
- ♣ Fluorures < 0,2 ppm

- ♣ Nitrates < 2 ppm
- ♣ Sulfates < 50 ppm
- ♣ Aluminium < 0,01 ppm
- ♣ Calcium < 2 ppm
- ♣ Ammonium < 0,2ppm
- ♣ Magnésium < 2 ppm
- ♣ Mercure < 0,001 ppm
- ♣ Métaux lourds < 0,1 ppm
- ♣ Potassium < 2 ppm
- ♣ Sodium < 50 ppm
- ♣ Zinc < 0,1 ppm

♣ **Contamination microbienne :**

L'eau à examiner satisfait à une limite du nombre de germes aérobies viables totaux de 102 microorganismes par millilitre, déterminé par dénombrement sur plaques de gélose.

Endotoxines bactériennes:

Moins de 0,25 UI/ml.

♣ **Qualité requise :**

- **Hémodialyse conventionnelle :**

Tableau 05: les niveaux de qualité à respecter pour l'eau pour hémodialyse conventionnelle³ (Castex et Dab, 2005).

Paramètres Microbiologiques	Niveau exigé
Flore aérobie revivifiable à 22°C	< 100 UFC / ml (1)
Endotoxines	< 0,25 UI / ml

- **Hémofiltration et hémodiafiltration en ligne :**

Tableau 06: les niveaux de la qualité à respecter pour l'eau pour hémofiltration et hémodiafiltration en ligne (Castex et Dab, 2005).

Flore aérobie revivifiable à 22°C	< 100 UFC / litre
Endotoxines	< 0,25 UI / ml

2-3-Eaux techniques :

2-3-1-Installations centrales de climatisation d'air:

Les climatiseurs sont situés le plus souvent sur le toit des hôpitaux: l'air ambiant est aspiré au travers de filtres puis passe au contact de batteries chaudes ou froides qui ajustent sa température. L'air est ensuite humidifié le plus souvent par projection de vapeur d'eau.

Cette opération est réalisée dans une enceinte close (le caisson de climatisation) dont les conditions de température et d'hygrométrie favorisent les développements bactériens. L'air conditionné circule à grande vitesse dans les caissons avant d'être distribué dans l'hôpital par des gaines. Ces vitesses créant des aérosols qui risquent d'être contaminés par de nombreux germes et notamment *Legionella Pneumophila* (Roussel et al, 1982).

2-3-2- Tours de refroidissement:

Ces installations servent à refroidir l'eau chaude produite par les systèmes de réfrigération. La ventilation importante, nécessaire au refroidissement de l'eau, disperse dans l'atmosphère, sous forme d'aérosol, de nombreuses bactéries qui y trouvent des conditions favorables de développement, notamment *Legionella pneumophila* qui y vit en association avec de nombreux autres microorganismes, bactéries, algues, amibes.

Les climatisations et les tours de refroidissement ont été ainsi à l'origine d'épidémies à *Legionella* aussi bien aux Etats-Unis qu'en France. Leur entretien régulier s'impose donc en prévention des *Légionelloses*, notamment le drainage systématique des boues. (Roussel et al, 1982).

1. Risques infectieux liés à l'utilisation de l'eau à l'hôpital

Les principaux risques sanitaires liés à l'utilisation de l'eau dans les établissements de santé sont essentiellement de nature infectieuse et plus rarement toxique. Si la présence de bactéries, de virus et de champignons constituent un risque à court terme, celle de substances toxiques est associée le plus souvent à un risque à moyen et à long terme, hormis le cas des pollutions accidentelles. (Chiguer, 2013).

1.1. Risques infectieux :

Les micro-organismes responsables d'infections (bactéries, virus, parasites, et micro-algues) peuvent être saprophytes, opportunistes ou pathogènes selon les cas. Le degré de gravité des manifestations pathologiques liées à l'eau est très variable : il va de gastro-entérites plus ou moins graves et de parasitoses (risque fécal en général), à des atteintes cutanées ou pulmonaires parfois fatales.

La gravité des infections varie selon :

- ❖ La nature des micro-organismes.
- ❖ Les voies d'exposition.
- ❖ L'état immunitaire des patients exposés (Ministère Des Solidarités, 2007).

1.1.1. Définition et évaluation des maladies infectieuses :

Une maladie infectieuse provoquée par la transmission d'un microorganisme : Virus, bactérie, champignon, constituent un problème de santé publique (Orth et Sansonetti, 2006).

Dans la nature, les maladies infectieuses se développent chez tous les organismes vivants (animaux, végétaux, fongiques, micro-organismes). Leur mode de transmission est variable et dépend de leur réservoir (humain, animal, environnemental) et parfois de vecteurs (maladies vectorielles). Elles sont plus ou moins contagieuses (Prescott et al., 2002).

Le développement d'une maladie infectieuse se déroule en plusieurs étapes :

♣ Une période d'incubation :

Généralement silencieuse, elle correspond à la période qui sépare le moment où le germe se fixe sur l'hôte et le moment où celui-ci manifeste les premiers signes cliniques de l'infection (Orth et Sansonetti, 2006).

♣ Une période d'invasion :

Presque toujours de courte durée, elle est marquée surtout par des signes généraux aux infections (fièvre, courbatures, etc.) (Orth et Sansonetti, 2006).

♣ Une période d'état :

Caractéristique de la maladie, le plus souvent elle fait apparaître des signes cliniques spécifiques qui conduisent au diagnostic (Orth et Sansonetti, 2006).

1.1.2. Principales maladies infectieuses liées à l'usage des eaux et leur mode de transmission :

Les maladies infectieuses liées à l'utilisation de l'eau dans les établissements de santé sont transmises de différentes façons :

1.1.2.1. voie respiratoire :

La contamination de l'homme se fait par voie aérienne, par inhalation de gouttelettes d'eau d'un diamètre inférieur à 5 mm contenant des bactéries (*Legionella*, mycobactérie non tuberculose) en suspension dans l'air. Les installations d'eau en cause sont : douche, robinets, spas, fontaines.

Les germes se transmettent lors d'un contact propice entre les muqueuses du nez et de la bouche, les principales maladies provoquées par cette voie : la légionellose, infections pulmonaires provoqués par MNT (Bachelot, 2003).

♣ La légionellose :

Est une infection respiratoire provoquée par des bactéries appelées legionelles qui prolifèrent en eau douce à des températures comprises entre 25°C et 42°C (Cardinaels, 2014).

L'infection présente deux formes :

- ♣ Une infection aiguë bénigne appelée fièvre de Pontiac, guérissant spontanément sans traitement en 2 à 5 jours.
- ♣ Une infection aiguë pulmonaire grave, pouvant entraîner le décès dans un peu plus de 15% des cas, appelée maladie du légionnaire.

La légionellose est une maladie soumise à déclaration obligatoire aux autorités sanitaires depuis 1987 (Bachelot, 2003).

Tableau 07 : caractéristiques cliniques respectives de la maladie de légionellose. (Cardinaels, 2014).

Cause	Diverses espèces de <i>Legionella</i> , fréquemment <i>Legionella pneumophila</i> , séro groupe 1.
Transmission	L'infection résulte de l'inhalation de vapeurs ou de brumes contaminées. Les bactéries vivent dans l'eau et colonisent les canalisations d'eau chaude) 20-50°C
Répartition géographique	Dans le monde entier.
Répartition géographique	Le risque pour les voyageurs est généralement faible. Des flambées se produisent occasionnellement par suite de la propagation de l'infection par des systèmes de climatisation ou des canalisations d'eau contaminés dans des hôtels ou d'autres installations

♣ Infections pulmonaire provoqués par mycobactéries non tuberculeuses (MNT)

Parmi les infections humaines aux MNT liées à l'eau, l'infection pulmonaire est très décrite. Dans ces cas l'eau sous forme d'aérosol est incriminée et cause des infections à MNT chez des adultes immunodéprimés et des adultes immunocompétents (Cardinaels, 2014).

Les caractéristiques respectives de l'infection pulmonaire provoquée par MNT sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 08: Les caractéristiques respectives de l'infection pulmonaire provoquée par MNT : (Crestani et al., 2009)

Cause	Complexe aviaire (<i>M avium</i> et <i>M intracellulare</i>), <i>M kansasii</i> , complexe <i>M abscesus</i> , <i>M. xenopi</i>
Transmission	L'infection résulte de l'inhalation de vapeurs contaminées par MNT.
Réservoir	Dans les réseaux de distribution d'eaux chaudes, surtout si ceux-ci présentent des zones de ralentissement du flux ou des bras morts qui favorisent la formation de biofilms
Symptômes	Atteinte bronchique chronique avec toux sèche est présente 90% des patients. La fatigue, la fièvre et la perte de poids sont moins fréquemment décrites qu'avec la tuberculose Souffle court, faiblesse et j'en passe.
Les personnes à risques	Les patients présentent une pathologie pulmonaire préalable : séquelles de tuberculose, pneumoconiose, bronchectasies, cancer broncho-pulmonaire, fibrose pulmonaire, etc. Personnes âgées Femmes enceintes

1.1.2.2. Voie Digestif :

Les pathologies digestives qu'ils sont susceptibles de provoquer sont avant tout communautaires et très rarement nosocomiales. C'est le cas des gastro-entérites et des diarrhées dues à des virus (calicivirus, entérovirus, rotavirus) ou à des micro-organismes très probablement d'origine virale, mais non identifiés à ce jour ou difficilement cultivables, à des bactéries telles *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria* et des parasites tels que *Giardia lamblia* et *Cryptosporidium parvum* (Leclerc et al., 1982).

Il est également possible de retrouver des pathologies hépatiques virales liées à l'eau, dues aux virus des hépatites A et E, et dont l'origine est encore plus exceptionnelle en milieu de soins.

Certaines bactéries sont plus spécifiques au milieu hospitalier : *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Morganella morganii*, *Aeromonas* ou *Clostridium difficile* car elles

s'attaquent à des sujets immunodéprimés et elles sont souvent résistantes aux antibiotiques (Avril et Fauchere, 2007). Elles peuvent provoquer des troubles digestifs (ex : *Clostridium difficile*) mais, sauf pour cet exemple, ce type de pathologie n'est pas l'expression la plus fréquente de leur pouvoir infectieux.

♣ Cholera :

Maladie diarrhéique contagieuse causée par des bactéries incurvées vibrions qui excrètent une toxine : diarrhée entéro-toxinique. Selon les estimations, il ya chaque année 3 à 5 millions de cas de choléra, avec 100 000 à 120 000 décès. La brève période d'incubation, de deux heures à cinq jours (Boulanger et Deschamps, 2007).

Le tableau 09 résumé les caractéristiques respectives de la maladie de choléra (Boulanger et Deschamps, 2007).

Cause :	Le bacille <i>Vibrio cholerae</i>
Mode de contamination :	<ul style="list-style-type: none"> ♣ Par contact direct avec les mains d'un malade- ou d'un porteur sain ♣ ingestion d'eau ou d'aliment souillés par déjections de malade.
Facteurs favorisant l'infection :	<ul style="list-style-type: none"> ♣ Mauvaise hygiène, malnutrition, inondation
Période d'incubation :	Quelque heures à 6 jours selon la dose de bactéries ingérées.
Symptômes :	<ul style="list-style-type: none"> ♣ Diarrhée aigue aqueuse (souvent comme de l'eau de riz, souvent avec une odeur de poisson) avec ou sans vomissement, avec ou sans déshydratation sévère ou décès, chez un patient de plus de 5 ans. ♣ En effet si des adultes ou enfants de plus de 5 ans sont affectés, il ya une forte suspension d'épidémie

♣ Amibiase :

Est une maladie infectieuse due à un parasite microscopique, un protozoaire hématophage dénommé *Entamoeba histolytica*, transmis par l'eau contaminée. Elle entraîne une infection gastro-entérite de type dysentérique (diarrhée accompagnée de sang et de mucus), qui se propage sur un mode épidermique et fait de très nombreux morts dans les pays

en voie de développement. Outre l'atteinte digestive, le parasite peut également infecter d'autres organes tels le foie, le poumon et le cerveau (Lesene, 1998). (Fig. 02)

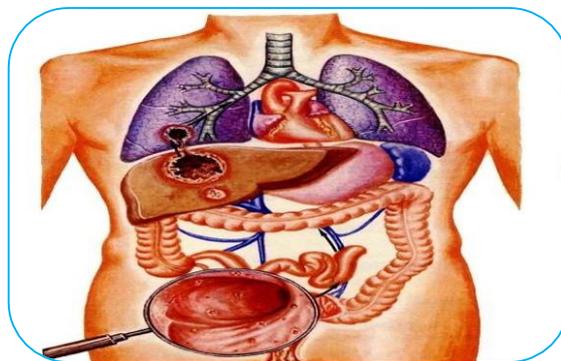


Figure 02 : amibiase intestinale [01]

Le tableau suivant résumé les caractéristiques respectives de l'amibiase.

Tableau 10 : caractéristiques cliniques respectives de la maladie de l'amibiase. (Lesene, 1998)

Cause	Le protozoaire <i>Entamoeba histolytica</i>
Transmission	L'infection se transmet par la voie féco-orale, soit directement de personne à personne soit indirectement par la consommation d'eau ou d'aliment contaminés par des matières fécales.
Nature de maladie	Le tableau clinique englobe infection asymptomatique, diarrhée, dysenterie, colite foudroyante, péritonite et amibiase extra-intestinale. L'amibiase aiguë se manifeste par une diarrhée ou une dysenterie avec selles fréquentes, peu abondantes et souvent sanguinolentes. l'amibiase chronique se manifeste par des symptômes gastro-intestinaux associés) la fatigue, une perte de poids et une fièvre occasionnelle. L'amibiase extra-intestinale survient quand le parasite envahit d'autres organes, généralement le foie, ou il provoque des abcès hépatiques amibiens. Les abcès amibiens du foie s'accompagnent de fièvre et de douleurs de l'hypocondre droit.
Répartition géographique	Présente dans le monde entier, mais plus fréquente dans les zones les pays ou les conditions d'hygiène sont mauvaises, en particulier sous les tropiques.
précautions	Mesures d'hygiène concernant l'eau et les aliments. Il n'existe pas de vaccin.

♣ La fièvre typhoïde :

Est une infection à déclaration obligatoire. Elle réalise un se psis à point de départ lymphatique. Le tableau suivant résume les caractéristiques respectives la fièvre typhoïde (Moustardier, 1972)

Le tableau 11 : caractéristiques cliniques respectives de la fièvre typhoïde (Moustardier, 1972)

Cause	<i>Salmonella typhi, paratyphi A, paratyphi B ou paratyphi C</i>
Répartition géographique	Elle est rare dans les pays développés ou elle existe de façon sporadique. En Algérie, elle reste épidémique
Source de contamination	Essentiellement de nature fécale provenant soit de malades soit de porteurs chroniques
	Strictement humain
Contamination	Soit : <ul style="list-style-type: none"> ♣ directe par les selles contaminées ou les aliments manipulés par des porteurs ; ♣ indirecte par l'eau, le laitage.etc.
L'incubation	Silencieuse et dure de 7 à 15 jours.
Clinique	<ul style="list-style-type: none"> ♣ Fièvre en plateau à 39 - 40°C ♣ Vomissements ♣ Diarrhée jaunâtre 'jus de melon' ♣ Céphalées, somnolence (tuphos) ♣ Langue saburrale ♣ Douleurs abdominales ♣ Taches rosées abdominales
Complications	Hémorragie intestinale

♣ Giardiase :

Est une infection intestinale causée par *Giardia lamblia*, parasite unicellulaire microscopique. Qui cause le Giardiase se loge dans les intestins des humains et des animaux infectés. Le mode d'infection le plus fréquemment est l'ingestion d'eau contaminée. L'infection se transmet de main en bouche par l'ingestion de nourriture contaminée ou en

touchant des surfaces contaminées puis en avalant le parasite sans le savoir (**Boulanger et Deschamps, 2007**).

Tableau 12 : résumé les caractéristiques respectives la Giardiase (Boulanger et Deschamps, 2007).

Cause	Le protozoaire <i>Giardia intestinalis</i> , appelé <i>G.lamblia</i> ou <i>G. duodenalis</i>
Transmission	L'infection résulte généralement de l'ingestion de kystes de <i>Giardia intestinalis</i> Présents dans l'eau (eau de boisson non filtrée ou eaux de baignade) Ou dans des aliments contaminés par des excréments humains ou animaux infestés
Nature de maladie	De nombreuses infestations sont asymptomatiques. Quand ils surviennent, les symptômes sont principalement intestinaux ; <ul style="list-style-type: none"> ♣ diarrhée chronique (selles d'abord aqueuse puis grasses et liquides), ♣ crampes abdominales, ♣ ballonnements, ♣ fatigue et perte de poids.
Répartition géographique	Dans le monde entier.
Répartition géographique	Le risque est important pour les voyageurs en contact avec des eaux de baignade utilisées par des animaux sauvages, avec de l'eau non filtrée dans des piscines ou avec de l'eau contaminée dans le système d'approvisionnement des collectivités.

1.2. Le risque toxique :

Se caractérise par la présence dans l'eau de substances chimiques en quantité trop importante.

Hormis les cas de pollutions accidentelles, les concentrations en substances toxiques sont généralement trop faibles pour provoquer des intoxications aiguës.

Pour l'eau de distribution publique et l'eau de source, la réglementation impose des limites de potabilité qui protègent le consommateur de façon très efficace (**Chiguer, 2013**).

2. Principaux modes de défaillances de la distribution de l'eau :

Des erreurs de conception ou de réalisation et un niveau insuffisant de maintenance peuvent entraîner des phénomènes de corrosion, de dégradation des matériaux, un entartrage, l'installation de dépôts ainsi que la prolifération de micro-organismes au sein des biofilms dont l'existence est impossible à éviter mais dont il faut maîtriser le développement.

La mise en place d'une démarche de maîtrise des risques hydriques repose sur une connaissance aussi précise que possible des installations de distribution de l'eau, ce qui nécessite la réalisation d'un diagnostic technique et sanitaire de l'ensemble des installations techniques et des réseaux existants (**Castex et Dab, 2005**).

Les contaminations microbiologiques et chimiques peuvent être liées :

- ♣ A la qualité de l'eau d'entrée, en provenance du réseau public qui peut, en cas de défaillance dans l'usine de traitement ou le réseau public, véhiculer des micro-organismes ou des substances chimiques indésirables
- ♣ A la dégradation de la qualité de l'eau dans le réseau intérieur de l'établissement.

Plusieurs paramètres peuvent influencer la qualité microbiologique et physico-chimique de l'eau à l'intérieur des réseaux et en particulier le développement du biofilm :

- ♣ l'entartrage
- ♣ la stagnation de l'eau
- ♣ la température de l'eau
- ♣ les retours d'eau contaminée et les travaux sur le réseau (**Castex et Dab, 2005**).

2.1. La prolifération excessive du biofilm :

2.1.1. Définition :

Les biofilms correspondent à des associations de microorganismes inclus dans une matrice d'exo-polymères, qui sont généralement attachées à la surface de toutes sortes de matériaux, tels que les métaux, les plastiques, les particules de sols, tissus (**Schmidt, 1999**).

2.1.2. développement d'un biofilm bactérien :

La prolifération bactérienne sous forme de biomasse fixée dans les réseaux de distribution d'eau est le résultat d'un ensemble de processus physique, chimique et

biologique. Ainsi la formation d'un biofilm se réalise en plusieurs étapes faisant intervenir ces différents processus (Lévi *et al.*, 2012).

♣ **Transport des microorganismes :**

Toute adsorption de microorganismes suppose un rapprochement de ceux-ci vers le support. Quatre mécanismes peuvent alors être impliqués :

- ♣ La sédimentation, due aux seules forces de gravité
- ♣ Les bactéries entrent en contact avec la surface des conduites de manière aléatoire (mouvement favorisés par les tournants des canalisations).
- ♣ La turbulence de l'eau à l'intérieur du réseau amène les microorganismes jusqu'au support.
- ♣ La mobilité, pour les microorganismes mobiles, avec ou non des phénomènes de chimiotactisme (Lévi *et al.*, 2012).

♣ **Attachement des microorganismes:**

L'adsorption des bactéries à la surface des canalisations s'effectue le plus souvent au niveau de dépôts minéraux et organiques, ou à la surface de tubercules de corrosion. Cette phase est divisée en deux étapes principales :

- ♣ **L'adhérence**, correspond à une adsorption réversible des cellules : une fraction des bactéries planctoniques transportées par l'eau, se dépose au niveau de la surface des canalisations. Cette phase est en général aspécifique et de courte durée (5 à 10heurs).
- ♣ **L'adhésion** ou fixation irréversible des bactéries : cette étape est plus lente que la précédente, l'irréversibilité de l'adhésion faisant appel au métabolisme bactérien. En effet, la sécrétion d'exopolymères par les microorganismes leur permet de consolider leur adhésion au support, formant autour de la bactérie, une enveloppe, appelée glycocalix [02].

♣ **Colonisation du support :**

- ♣ Dans des conditions favorables, lorsque les bactéries sont fixées de manière irréversible au support, les cellules peuvent se multiplier selon la quantité de matière organique biodégradable disponible, et le taux d'oxydant résiduel. Il ya alors accroissement de la

biomasse et production de métabolites sécrétés par les bactéries. Cette étape de croissance est divisée en trois phases.

- ♣ Une phase linéaire de croissance, traduisant une évaluation à taux constant et maximale du biofilm.
- ♣ Une phase de ralentissement, qui correspond à un début d'équilibre du biofilm entre le taux de multiplication et d'accumulation des microorganismes et le taux de détachement de matière. Ceci met en évidence des facteurs hydrodynamiques sur le développement du biofilm (Gauthier, 2002).

Les différentes étapes de la formation, puis de l'évolution d'un biofilm, sont présentées sur la figure ci-dessous.

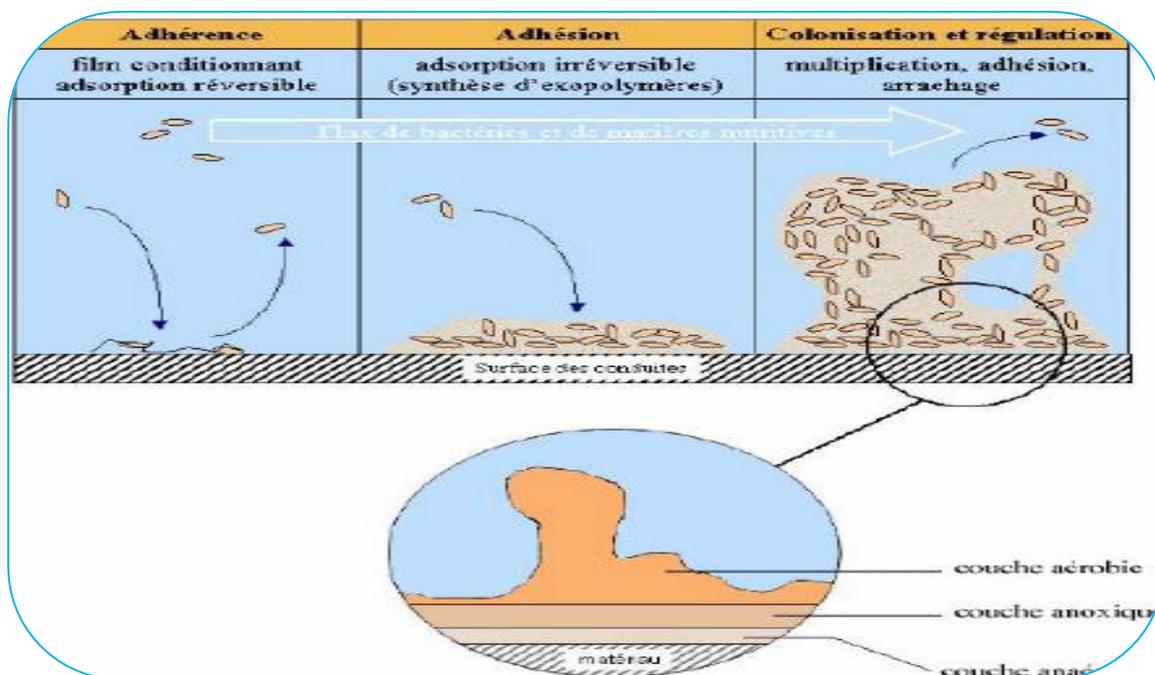


Figure N° 03: représentations schématiques de la formation et de la structure d'un biofilm au sein d'un réseau de distribution (Gauthier, 2002).

2.1.3. Agent bactérien formant un biofilm :

Presque tous les biofilms peuvent abriter (ou piéger) des organismes pathogènes pour d'autres espèces, y compris dans les tuyaux d'eau chaude où l'on trouve des *legionelles* d'origine hydro-telluriques qui survient au chlore dans les biofilms qui la protègent de la chloration et semble jouer un rôle important pour sa survie dans les installations. On en trouve y compris dans les biofilms de réseaux d'eau domestiques, parfois associée à *Pseudomonas aeruginosa* outre la nature de l'eau (acidité, minéralisation, teneur en matières organiques et

nutriments) , la température et le type de matériaux utilisés en plomberie jouent aussi un rôle important dans la formation des biofilms. En condition difficiles (chaleur élevée, biocide, etc.) [02].

2.1.4. Les effets d'un biofilm :

Différents problèmes peuvent être directement reliés à la formation et au développement d'un biofilm sur les parois des canalisations d'adduction d'eau. Ces conséquences peuvent porter sur le réseau de distribution lui-même, ou sur la consommation de l'eau issue du réseau contaminé :

- ❖ Les bactéries accumulées au niveau d'un biofilm constituent le premier maillon d'une chaîne alimentaire et ainsi favorisent le développement de macroorganismes.
- ❖ Certains types bactériens peuvent induire, par leur présence ou leur activité métabolique, une augmentation de la turbidité, de la sapidité et de l'odeur de l'eau.
- ❖ Certaines bactéries peuvent accélérer le phénomène de corrosion. Le terme de biocorrosion est alors utilisé.
- ❖ Les capacités de distribution d'un réseau peuvent être diminuées par l'augmentation des forces de résistance, induites par la présence de biofilm (**Gauthier, 2002**).
- ❖ Le biofilm constitue une source de contamination critique et difficile à supprimer.
- ❖ Protégés dans leur matrice organique, les microorganismes deviennent résistants aux procédures standards de nettoyage et de la désinfection.

Les méthodes classiques de nettoyage sont des solutions inefficaces et coûteuses, qui entraînent de nombreuses problématiques :

- ❖ Agressivité pour les utilisateurs
- ❖ Risque élevé ré-contamination de l'installation et des produits finis.
- ❖ Impact environnemental négatifs. [03]
- ❖ Une fraction des microorganismes peut également représenter un risque potentiel pour les consommateurs, et ainsi, augmenter la fréquence de symptômes gastro-entériques (diarrhées, vomissement)
- ❖ Des travaux épidémiologiques ont montré que le taux moyen d'incidents à tropisme gastro-intestinal était de 0,1 % par personne et par an, dans le cas d'une population générale, pour la consommation d'une eau respectant les critères de potabilité (**Gauthier, 2002**).

1. Matériel :

Notre partie expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire de la direction de la santé de la wilaya de Guelma (DDS) ainsi que le laboratoire pédagogique de microbiologie à l'université de Guelma sur une période de 2 mois et demi s'étale du mois de Février jusqu'à mi-Mai 2015.

Le prélèvement microbiologique de l'eau doit s'effectuer dans des conditions d'asepsie rigoureuse (**Guiraud, 1998**).

La verrerie destinée aux prélèvements d'eau doit être munis d'un nettoyage avec un détergent puis rinçage avec l'eau propre, puis un rinçage final avec l'eau distillée (**Lightfoot, 2002; Guiraud, 1998**).

L'ensemble du matériel utilisé au laboratoire pour effectuer les analyses bactériologiques de nos échantillons (milieux de culture, réactifs et appareillages) sera cité au sein des techniques dans la partie méthodologie au fur et à mesure de leurs utilisations, est représenté dans le tableau **13**.

Tableau 13 : Le matériel de laboratoire utilisé durant notre travail.

Appareillages	Les milieux de culture		Réactifs et colorants	Antibiotiques	Autres matériels
	Gélose	Bouillon			
- Microscope optique - Autoclave - Etuve - Réfrigérateur - Bain marie - La hotte - Appareil de filtration	- Hektoen	- BCPL	Réactifs : - Kovacs - TDA - Rouge de méthylène (RM) - Voges-Proskaur (VP 1 et VP 2) - NIN - Nitrate 1 et 2 - Disques pour test d'oxydase - H ₂ O ₂ Colorants : - Violet de Gentiane - Lugol - L'alcool - Fuchsine	Amoxicilline	- Membrane filtrante 0.45 micron - Huile de cèdre - Etiquettes - Anse de Platine - Pince mince - Bec Bunsen - Boîtes Pétri Stériles - Ecouvillons - Tube d'hémolyse - Api Système - Eau distillée Verreries : - Lames et lamelles - Pipettes Pasteur - Tubes à essai stériles
	- Chapman	- Roth		- Céfoxitine	
	- <i>Salmonella-Shigella</i> (SS)	- Eva		- Céfazoline	
	- Mac Conkey	Litskey		- Amikacine	
	- Cétrimide	- Eau		- Gentamicine	
	- Viande foie	peptonée		- Colistine	
	- TGEA	exempte d'indol		- Chloromphénicol	
	- Slanetz	- Clark et Lubs		- Fosfomycine	
	- Mueller-Hinton	- Mannitol-mobilité		- Tétracycline	
	- Gélose lactosé au TTC	- Urée-indole		- Pénicilline	
	- King A et King B	- Bouillon nutritif		- Erythromycine	
	- Citrate de Simmons	- Eau peptonée tamponnée		- Tétracycline	
	- TSI (Triple SugarIron)			- Vancomycine	

2. Stratégie d'échantillonnage :

2.1. Choix de sites de prélèvement :

Nos prélèvements ont été effectués dans deux hôpitaux de la ville de Guelma: Hôpital Ibn-Zohr et Hôpital El-Hakim Okbi. (Fig. 04 et 05)

Pour le choix du site de prélèvement d'eau du robinet dans les établissements de santé nous avons ciblé les services les plus fréquentés accueillant régulièrement des patients à haut risque infectieux et les immunodéprimés. (Tab. 14)



Figure 04: EPH IbnZohr.

Figure 05: EPH El-Hakim Okbi.

Tableau 14 : Les services qui ont fait l'objet des prélèvements d'eau au niveau des centres hospitaliers de la ville de Guelma.

Centres hospitaliers	
	Ibn-Zohr
Services	Infectieux Hémodialyse Bactériologie Pneumologie Cuisine Anatomopathologie
	El-Hakim Okbi
	Urgences Salle d'accouchement Chirurgie générale Médecine générale Ophtalmologie

2.2. Mode de prélèvement :

Le prélèvement d'un échantillon d'eau est une opération délicate à laquelle le plus grand soin doit être apporté ; il conditionne les résultats analytiques et l'interprétation qui en sera donnée. L'échantillon doit être homogène, représentatif et obtenu sans modifier les caractéristiques physicochimiques et microbiologiques de l'eau (**Fig. 06**) (**Catrine, 1998**).

- ❖ Démontez les éventuels accessoires (mousseur, brise-jets et tuyaux de caoutchouc ...) présents sur le robinet qui peuvent créer des éclaboussures.
- ❖ Avec un chiffon propre nettoyez l'intérieur du robinet pour éliminer tout déchet.
- ❖ Se laver très soigneusement les mains et avant-bras.
- ❖ Ouvrir le robinet à son débit maximum et laisser l'eau s'écouler pendant 1 à 2 minutes afin d'éliminer le volume mort non représentatif. Fermez le robinet.
- ❖ Stériliser le robinet pendant 1 minute avec un coton imbibé d'alcool enflammé.
- ❖ Ouvrir doucement le robinet et laisser l'eau s'écouler à un débit moyen 1 à 2 minutes pour le refroidir.
- ❖ Ouvrir avec précaution le flacon stérile pour éviter la contamination en veillant à ce que rien d'autre que l'eau ne touche l'intérieur du flacon.
- ❖ Remplir soigneusement le flacon en tenant le bouchon avec la main gauche dans sa protection orienté vers le bas pour éviter que des poussières viennent se déposer à l'intérieur.
- ❖ Un petit volume d'air doit se laisser à la surface de manière à faciliter l'agitation de l'eau avant son analyse.
- ❖ Fermez le flacon avec le bouchon.
- ❖ Le prélèvement terminé, inscrivez sur l'étiquette les indications nécessaires à l'identification du prélèvement. (**Rodier et al., 2009**)



Figure 06 : Mode de prélèvement d'eau à partir d'un robinet.

2.3. Transport et conservation des échantillons :

Tout flacon d'échantillonnage doit être clairement identifié et étiqueté. Le prélèvement ainsi réalisé doit être acheminé au laboratoire dans les plus brefs délais, il convient de commencer l'analyse le jour même. L'échantillon devrait être protégé contre les effets de la température à l'aide d'un isolant thermique pendant le transport qui se fait dans glacière portable, (la température aux environs de 4°C). Les échantillons reçus dans des délais de prélèvements inacceptables c'est-à-dire après à 24 heures du prélèvement ne doivent pas être analysés (Catrine, 1998 ; Guiraud, 1998).

3. Analyses physico-chimique :

Les analyses physico-chimiques de l'eau sont indispensables car sont susceptibles de fournir des renseignements utiles pour apprécier la qualité de l'eau ainsi que la qualité de traitement (Catrine, 1998). Les analyses physico-chimiques procédées aux échantillons d'eau potable prélevés en milieu hospitalier inclus les paramètres suivants : la mesure du pH, la température, le chlore libre et la turbidité.

3.1. Dosage du chlore libre :

Méthode à la N,N-Diéthylphendiène-1,4 diamine (DPD) : la DPD est introduite sous forme de pastille dans 100 ml d'eau à analyser, en présence de chlore une coloration rose se développe, l'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration du chlore libre dans l'échantillon (Catrine, 1998 ; Frank, 2005). Cette coloration est mesurée ensuite à l'aide Comparateur qui effectuer immédiatement la lecture [6]. (Fig. 07).

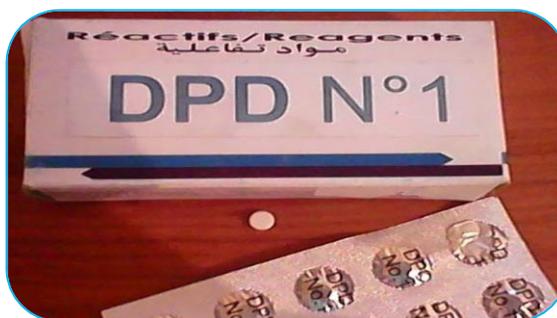


Figure 07 : Pastille de réactif chimique DPD N°1

3.2. Mesure de la turbidité :

Un liquide trouble s'éclaire vivement lorsqu'il est traversé par un faisceau lumineux, c'est le phénomène dit de Tyndall due aux particules insolubles en suspension diffusant latéralement une partie des rayons lumineux (Rodier, 1996; Amino, 1983).

L'appareillage utilisé est un turbidimètre et une cuve stérile (Fig. 08). Les étapes à suivre sont :

- Remplir la cuve stérile avec l'eau à analyser.
- Appuyer sur le bouton mesure.
- Faire la lecture après la stabilisation de turbidimètre (Rodier, 1996; Amino, 1983).



Figure 08 : Turbidimètre.

Tableau 15 : Classes de turbidité usuelles (NTU, nephelometric turbidity unit) (Hakmi, 2002).

NTU<5	Eau claire
5<NTU<30	Eau légèrement trouble
NTU>50	Eau trouble

3.3. Mesure de pH :

Le potentiel hydrogène, plus connu sous le nom de "pH" est la valeur qui détermine si une substance est acide, neutre ou de base, il est calculé à partir du nombre d'ions hydrogène présents. Le pH d'une solution aqueuse varie de 0 à 14, un pH de 7 signifie que la solution est neutre. Un pH inférieur à 7 indique que la solution est acide, et un pH supérieur à 7 indique que la solution est basique. Une solution est neutre lorsqu'il y a autant de H⁺ que d'OH⁻ (Rodier. 1996).

Le pH peut être déterminé par diverses méthodes d'analyses, telles que les indicateurs colorés, le papier-pH ou l'utilisation d'un pH-mètre (Fig10) (Rodier. 1996).

3.4. Mesure de la température :

La température de l'eau est mesurée à l'aide d'un thermomètre de terrain (Fig. 09).



Figure 09: multi paramètres utilisé.

4. Analyse bactériologique :

L'analyse bactériologique permet de mettre en évidence la pollution de l'eau, elle représente également un bon moyen pour contrôler l'efficacité des mesures de protection ou de traitement. (Rodier *et al.*, 2009)

4.1. Recherche et dénombrement sur milieu liquide :

Cette méthode est une estimation statistique du nombre des micro-organismes supposés distribués dans l'eau de manière parfaitement aléatoire (loi de poisson). Dans ce type de méthode, les bactéries se multiplient dans le milieu liquide. En cas de présence, l'ensemble du milieu liquide inoculé vire à la positivité (trouble ou virage de l'indicateur). (Rejsek, 2002).

4.1.1. Recherche et dénombrement des micro-organismes revivifiables:

Les germes totaux (GT) ou revivifiables sont la totalité des bactéries, levures et moisissures aéro-anaérobies, capables de former des colonies dans ou sur un milieu de culture. (Rodier, 2009).

♣ Mode opératoire :

A partir de l'eau à analyser porter aseptiquement 2 fois 1 ml dans deux boîtes de Pétrie vides, numérotées et préparées à cet usage comme l'indique le schéma n° 10 (Lebres, 2002).

Compléter ensuite chacune des boîtes avec environ 20 ml de gélose TGEA fondue puis refroidie à $45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. Faire ensuite des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de «8» pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose (Lebres, 2002).

Laisser solidifier sur paillasse environ 15mn. Les boîtes seront partagées en deux séries distinctes, dont la 1ère sera incubée couvercle en bas, dans une étuve à 22°C pendant 72 heures, et la 2ème dans une étuve à 37°C durant 48 heures (Rodier, 2009).

♣ Lecture :

Les colonies des micro-organismes revivifiables apparaissent sous formes lenticulaires poussant en masse. Retenir les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies, au niveau de deux dilutions successives (Lebres, 2002).

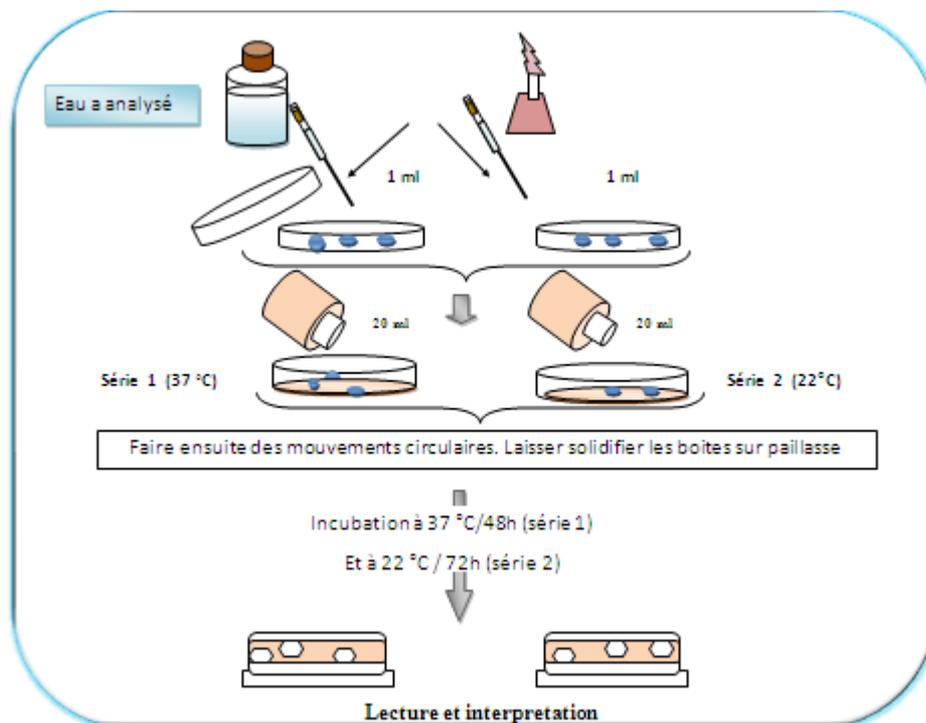


Figure 10 : Protocole de recherche et dénombrement des microorganismes revivifiables à 22 °C et à 37°C dans les eaux.

4.1.2. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et coliformes fécaux :

♣ Définition des coliformes totaux

Les coliformes totaux sont des bacilles à Gram négatifs, aérobies ou anaérobies facultatif, non sporulés, ne possédant pas d'oxydase, capables de se multiplier en présence de sels biliaires et capables de fermenter le lactose avec production d'acides et de gaz en 24 à 48 heures à une température comprise entre 36 et 37°C (Camille, 2003).

♣ Définition des coliformes fécaux :

Les coliformes fécaux, ou coliformes thermo-tolérants, sont un sous-groupe des coliformes totaux capable de fermenter le lactose à une température de 44°C. L'espèce la plus fréquemment associée à ce groupe bactérien est *Escherichia coli* (Roux, 2003).

Les *Escherichia coli* sont des coliformes thermo-tolérants ayant la particularité de produire de l'indole à partir du tryptophane présent dans le milieu à une température comprise entre $42 \pm 2^\circ\text{C}$ (Bourgeois et Leveau, 1980).

♣ Mode opératoire :

La recherche et le dénombrement des bactéries coliformes, coliformes thermo-tolérants et des *Escherichia coli* dans les eaux, en milieu liquide par la technique du NPP, se fait en deux étapes consécutives :

- ♣ Le test de présomption: réservé à la recherche des coliformes.
- ♣ Le test de confirmation : réservé à la recherche des coliformes thermo-tolérants et de *Escherichia coli*. (Labres *et al.*, 2008; Chaouch, 2007).

Test présomptif :

On a travaillé avec 3 séries de 3 tubes bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol(BCPL):

- ♣ 3 tubes de BCPL D/C+ cloche de Durham,ensemencés avec 10 ml d'échantillon.
- ♣ 3 tubes de BCPL S/C+ cloche de Durham,ensemencés avec 1 ml d'échantillon.
- ♣ 3 tubes de BCPL S/C+ cloche de Durham,ensemencés avec 0.1 ml d'échantillon.

Les tubes inoculés sont homogénéisés par agitation douce pour ne pas faire pénétrer d'air dans la cloche (Lebres, 2002).

Lecture :

La lecture se fait après 48 heures d'incubation dans une étuve à 37°C. On considère comme positifs tous les tubes présentant à la fois un trouble microbien accompagné d'un virage de la couleur du milieu vers le jaune, et un dégagement gazeux (supérieur au 1/10^{ème} de la hauteur de la cloche) (Lebres, 2002).

On note le nombre de tubes positifs dans chaque série et on reporte à la table du NPP (Annexe 01) le nombre de coliformes totaux dans 100 ml d'échantillon d'eau (Fig. 11). (Lebres, 2002)

Test confirmatif :

A partir de chaque tube de BCPL positif, on ensemence avec 4 à 5 gouttes le milieu eau peptonée exempte d'indole muni d'une cloche de Durham (Fig.11).

Lecture :

Après incubation à 44°C pendant 24 heures, Dans les tubes montrant un trouble microbien et un dégagement gazeux dans la cloche de Durham, ajouter quelques gouttes de réactif Kovacs. Une réaction considérée positive correspond à la formation d'anneau rouge à la surface de tube autrement dit présence de coliformes fécaux (*E. coli*) (Labres, 2002).

On détermine le nombre des coliformes fécaux à partir de la table de NPP (Annexe 01), Les résultats sont exprimés sous la forme : nombre le plus probable de coliformes fécaux par 100 ml d'eau analysée (Labres et al., 2006).

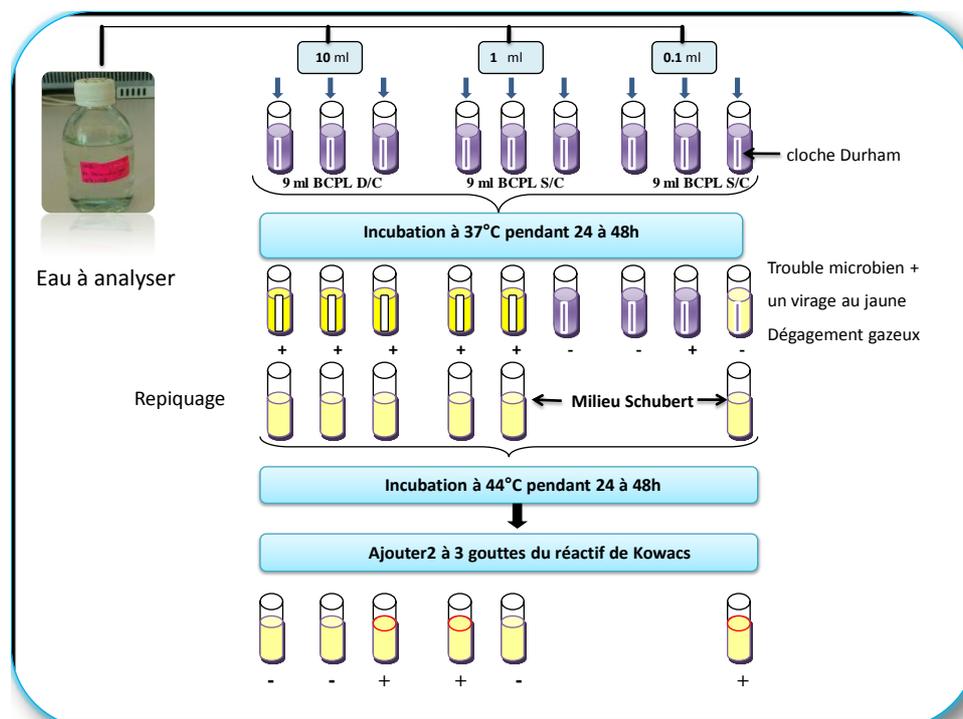


Figure 11 : Protocol de recherche et dénombrement des coliformes totaux, fécaux et *E. coli* dans les eaux.

4.1.3. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux :

Les streptocoques fécaux ou de groupe «D» sont des bactéries qui se présentent sous forme de cocci à Gram positif, sphériques ou ovoïdes formant des chainettes (Bourgeois et Leveau, 1980). ne possédant pas de catalase mais possédant l'antigène du groupe «D». Ils sont capables de se développer en 24 à 48h à 37°C sur un milieu sélectif à l'azoture de sodium (Labres et Mouffok, 2008).

Les streptocoques fécaux sont dénombrés en milieu liquide à l'aide de deux bouillons de culture (milieu Rothe et milieu Eva Litsky) par la technique de NPP en passant par deux tests consécutifs :

♣ Mode opératoire

La recherche et le dénombrement des streptocoques du groupe « D » dans les eaux, en milieu liquide, se fait en deux étapes consécutives :

- ♣ Le test de présomption: réservé à la recherche présomptive des Streptocoques.
- ♣ Le test de confirmation : réservé à la confirmation réelle des Streptocoques du groupe « D ». (Fig.12) (Chaouch, 2007).

Test présomptif :

L'inoculation du milieu de culture s'effectue comme le cas précédent pour le milieu BCPL. Le dénombrement est réalisé en milieu liquide sur bouillon glucosé à l'azoture (Roth). On travaille avec une série de 3 tubes :

- ♣ 3 tubes de Roth D/C,ensemencé avec 10 ml de l'échantillon.
- ♣ 3 tubes de Roth S/C,ensemencé avec 1 ml de l'échantillon.
- ♣ 3 tubes de Roth S/C,ensemencé avec 0.1 ml de l'échantillon.

L'incubation des tubes ensemencés s'effectue dans l'étuve à 37° C pendant 24 à 48 heures. (Lebres, 2002).

Lecture :

Seront considérés comme positifs les tubes présentant un trouble microbien, seulement ces tubes doivent faire l'objet d'un repiquage sur le milieu Eva Litsky.

Test confirmatif :

Le test de confirmation est basé sur la confirmation des streptocoques du groupe «D» éventuellement présents dans le test de présomption.

Après agitation les tubes de Roth trouvé positifs feront donc l'objet d'un repiquage à l'aide d'un ose bouclé dans des tubes contenant le milieu Eva Litsky. Bien mélanger le milieu et l'inoculum, l'incubation se fait à 37°C, pendant 24 heures (Lebres, 2002).

Lecture :

Seront considérés comme positifs les tubes présentant à la fois :

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

La lecture finale s'effectue également selon la prescription de la table du NPP (Lebres, 2002). (Annexe 01)

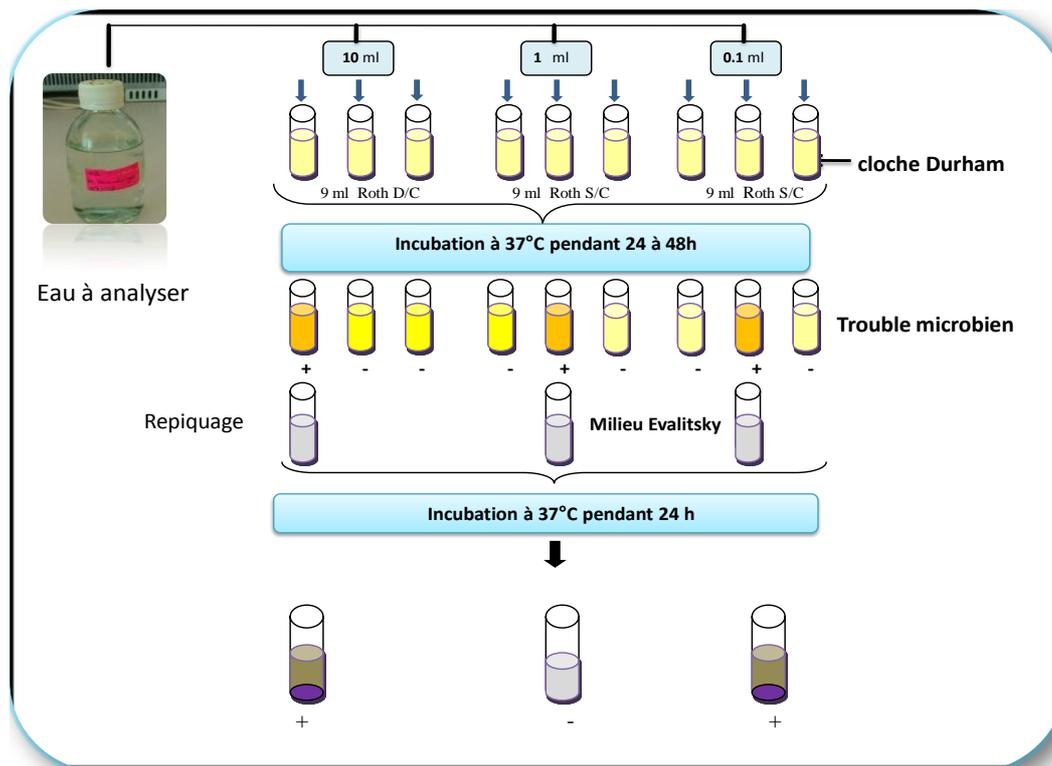


Figure 12: Protocole de recherche et dénombrement des streptocoques fécaux dans les eaux.

4.1.4. Recherche et dénombrement des spores de *Clostridium* sulfito-réducteurs :

Les bactéries anaérobies sulfito-réductrices (ASR) se présentent sous forme de Gram positif, elles se développent en 24 à 48 heures sur une gélose Viande Foie en donnant des colonies typiques réduisant du sulfite de sodium (Na_2SO_3), qui se trouve dans le milieu, en sulfure qui en présence de Fe_2^+ qui donne FeS (sulfure de fer) de couleur noire (Lebres, 2006).

Ces bactéries (émise dans les matières fécales sous forme de spores fortement résistantes) ont la capacité de survivre dans l'environnement pendant des mois. Ce phénomène explique bien la survenue fréquente d'épidémies en milieu hospitalier et les

récidives. Elle est responsable de diarrhée et d'autres maladies intestinales plus graves comme la colite pseudo- membraneuse. Elle est considérée comme la première cause bactérienne de diarrhée nosocomiale (**Bellini et Federli, 2008**).

♣ Mode opératoire

La recherche et dénombrement des spores des ASR dans l'eau se fait par la méthode d'incorporation en gélose en tubes profonds (**Fig. 13**) :

- ♣ Prendre environ 25 ml à partir de l'eau à analyser, dans un tube stérile, qui sera par la suite soumis à un chauffage de l'ordre de 80°C pendant 10 minutes, dans le but de détruire toutes les formes végétatives des ASR éventuellement présentes.

- ♣ Après chauffage, refroidir immédiatement le tube en question, sous l'eau de robinet.

- ♣ Répartir ensuite le contenu de ce tube, dans 4 tubes différents et stériles, à raison de 5 ml par tube.

- ♣ Ajouter dans chacun d'eux environ 18 à 20 ml de gélose viande foie, fondue puis refroidie à 45 ± 1 °C, additionnée de 1 ml de la solution de sulfite de sodium et 4 gouttes de la solution d'alun de fer.

- ♣ L'incorporation se fait dans un tube et non dans une boîte afin de limiter la surface de contact entre le milieu et l'air.

- ♣ Mélanger doucement le milieu et l'inoculum en évitant la formation des bulles d'air et en évitant l'introduction d'oxygène.

- ♣ Laisser solidifier sur paillasse pendant 30 minutes environ, puis incubé à 37°C, pendant 24 à 48 heures (**Labres et Mouffok, 2008**).

♣ Lecture et dénombrement :

La première lecture doit absolument être faite à 16 heures et la deuxième lecture se fera à 24 heures et la troisième et dernière à 48 heures (**Rejsek, 2002**).

Dénombrement sur les 04 tubes de culture, la totalité des colonies noires de 0,5 mm de diamètre, poussant en masse (**Rejsek, 2002**).

Cette coloration est due à la germination des spores des bactéries dans le milieu de culture car elles se trouvent dans un milieu favorable à leur développement (Rejsek, 2002). Exprimer le résultat en nombre de spore par 20 ml d'eau à analyser (Labres, 2006).

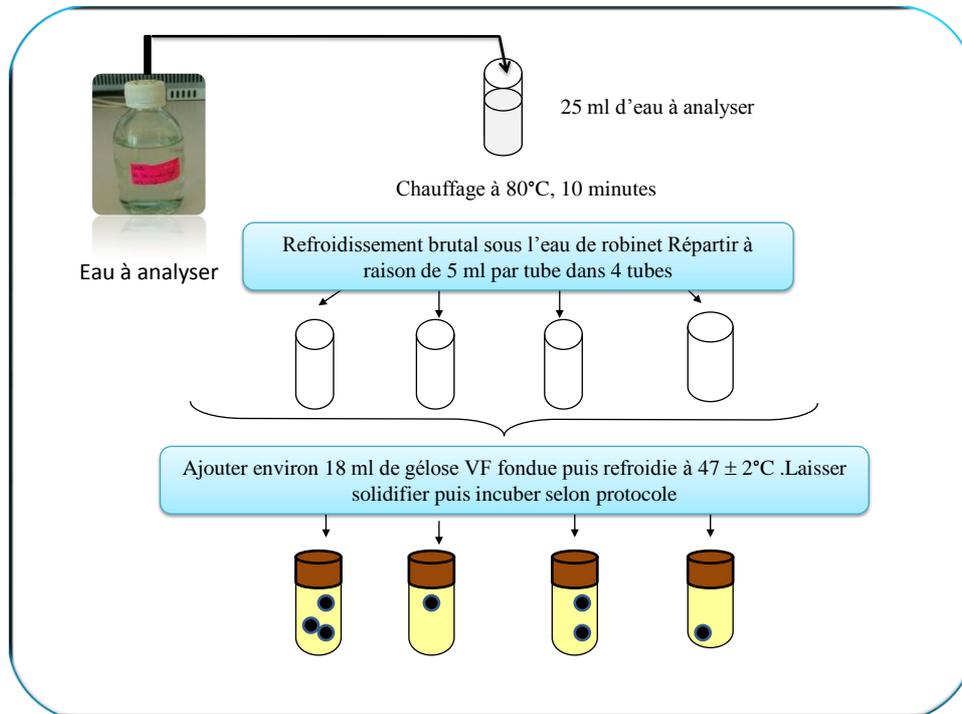


Figure 13: Protocole de recherche et dénombrement des spores des bactéries anaérobies sulfito-réducteurs dans les eaux.

4.2. Recherche des germes pathogènes :

Il existe une grande variété de bactéries pathogènes ou potentiellement pathogènes (opportunistes) pour l'homme dans tous les types d'eaux. Celles-ci vivent ou survivent dans l'environnement, soit provenant des rejets humains, éliminées par des sujets malades ou des porteurs sains, soit étant autochtones et pouvant s'adapter à l'homme : *Campylobacter jejuni*, *Legionella pneumophila*, leptospires, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, *Shigella*, staphylocoques pathogènes, *Vibrio*, *Yersinia enterocolitica*. (Rodier et al., 2009)

Le travail d'ensemencement des microorganismes se pratique sur une paillasse conforme à la réglementation autour de la flamme d'un bec Bunsen (Delarras, 2007). L'ensemencement par stries sur boîtes de Pétrie est pratiqué le plus souvent dans un but d'isolement. L'inoculum est prélevé directement à partir de l'eau à analyser est déposé sur un point périphérique de la gélose puis disséminé par stries sur toute la surface (méthode des quadrants) (Aouissi, 2008). Un isolement est effectué à l'aide d'une anse de platine, une pipette Pasteur ou d'un ensemenceur à usage unique stérile (Denis et al., 2007).

4.2.1. Recherche de *Salmonella* et *Shigella* :

On entend par *Salmonella*, des bactéries qui se présentent sous forme de bacilles à Gram négatif se développant à une température de $36 \pm 2^\circ\text{C}$ en 24 à 48 heures, sur milieu Hektoen, elles forment de petites colonies, lisses à contours réguliers, pigmentées en vert ou en bleu vert à centre noir (Rodier et al., 2009).

La notion d'espèce est peu employée pour le genre *Salmonella* et on réfère plutôt au sérotype. Ce genre contient plus de 2000 sérotypes différents (Nauciel et Vildé, 2005).

Salmonella et *Shigella* sont des agents étiologiques courants de maladies gastro-intestinales et sont donc présents dans les matières fécales des sujets colonisés. La présence de l'un ou l'autre de ces micro-organismes dans l'environnement découle en général d'une contamination fécale récente. On a signalé de nombreuses éclosions qu'on a reliées à l'eau potable contaminée (Boring et al., 1971).

Les salmonelles peuvent donc être présentes dans l'eau des égouts agricoles et domestiques, les eaux douces, y compris les eaux potables et les nappes phréatiques, ainsi que l'eau de mer (Rodier et al., 2009).

♣ Mode opératoire :

Jour 1 : Premier enrichissement

Introduire 1 ml de l'échantillon d'eau dans 10 ml de Sélénite Cystéine (SFB) (Ait Hamlet, 1998), puis incubé à 37°C pendant 18 à 24 heures (Fig. 14) (Labres, 2002).

Jour 2 : Deuxième enrichissement et isolement

Ce flacon fera l'objet :

- D'une part, d'un deuxième enrichissement sur milieu SFB en tubes à raison de 1 ml.
- D'autre part, d'un isolement sur gélose Hektoen, SS et Mac Conkey (Labres, 2002).

Jour 3 : Lecture des boîtes et identification :

- D'une part, le tube de Sélénite fera l'objet d'un isolement ;
- D'autre part, les boîtes des géloses Hektoen SS et Mac Conkey subira une lecture (Tab. 16) (Labres, 2002).

Tableau 16: La couleur des colonies isolées à partir des géloses SS et Hektoen. (Rodier et al., 2009)

Gélose	La couleur des colonies	Espèces
Gélose SS	Rouges	<i>Enterobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , et autres coliformes tels <i>E. coli</i>
	Incolores, centre noir	<i>Salmonella</i> à H ₂ S ⁺ , <i>Proteus vulgaris</i> et <i>mirabilis</i>
	Incolores transparentes	<i>Salmonella</i> à H ₂ S ⁻ , <i>Shigella</i> , <i>Serratia</i> , <i>E. hafniae</i> , <i>Alkalescens</i> , <i>Proteus morgani</i> ;
	Colonies à centre orangé	<i>Proteus rettgeri</i> , <i>Providencia</i>
	Rouges, centre noir	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Arizona</i> .
Gélose d'Hektoen	Jaune saumon	<i>E. coli</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Arizona</i>
	Jaune saumon, centre noir	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Proteus vulgaris</i>
	Bleues ou vertes, centre noir	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Salmonella</i>
	Bleuâtres ou vertes	<i>Shigella</i> , <i>Providencia</i> , <i>Proteus morgani</i> , <i>Proteus rettgeri</i> , <i>Salmonella</i> à H ₂ S ⁻ .

Identification morphologique et biochimique

- Etat frais et coloration de Gram (bacilles Gram négatifs) ;
- Inoculation d'un tube de TSI qui sera incubé à 37°C, 24 h ;
- Inoculation : * Soit d'une galerie biochimique classique (ONPG, Oxydase, LDC, ODC, ADH, Urée, TDA, VP, RM ...),
* Ou d'une galerie biochimique API 20 E (Lebres, 2002).

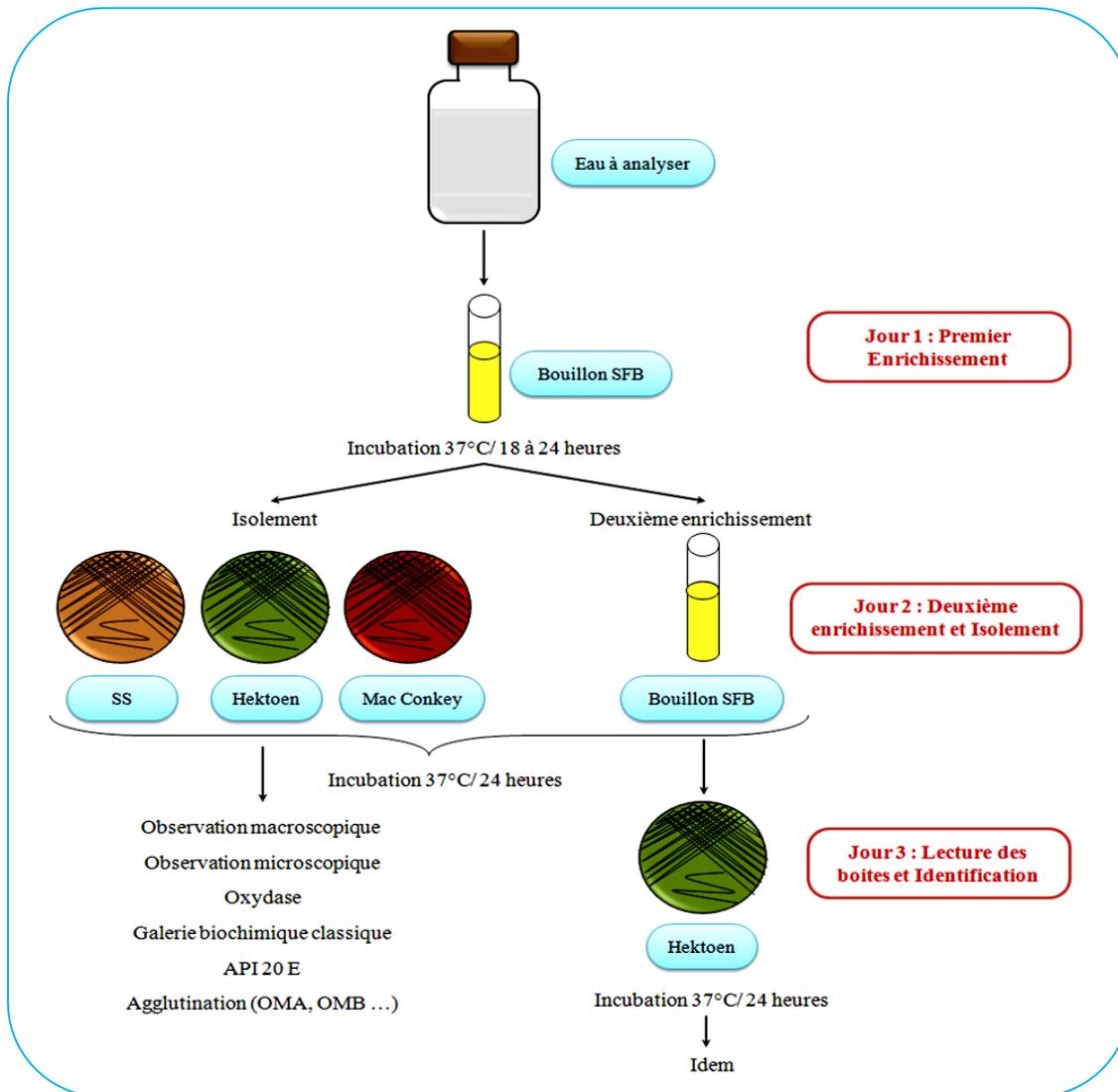


Figure 14 : Protocole opératoire de la recherche de *Salmonella* dans les eaux.

Les Shigelles sont des Enterobacteriaceae, rencontrées exclusivement chez l'homme, elles ne font partie d'aucune flore commensale chez l'homme, elles sont toutes pathogènes et spécifiques du tube digestif (**Berche et al., 1988**).

Génétiquement ce sont des variétés invasives d'*Escherichia coli* toujours immobiles, auxotrophes et non gazogènes, métaboliquement moins actives que les autres *E. coli*, et strictement adaptées au parasitisme du colon de l'homme (**Janda et Abbott, 1988 ; Ewing et Edwards, 1986**).

Classiquement elles sont divisées en 4 espèces sur la base des caractères biochimiques et antigéniques : *S. dysenteriae* subdivisée en 16 sérotypes, *S. flexneri* en 6 sérotypes, *S. boydii* en 20 sérotypes, et *S. sonnei* (un seul sérotype) (**WHO, 2005 ; Janda et Abbott, 1988 ; Ewing et Edwards, 1986**).

♣ Culture :

Il n'existe pratiquement pas un milieu d'enrichissement adapté à *Shigella* (WHO, 2005). Pour chercher du *Shigella*, à partir de l'échantillon mère on prélève 0,1 ml et on l'étale sur la surface des géloses Hektoen, SS et Mac Conkey par la méthode des quatre quadrants. L'incubation se fait à 35 – 37 °C pendant 18 - 24 heures (Fig. 16) (Tab. 16 et 17).

Tableau 17 : Caractères d'identification biochimique de *Shigella* (Sayad, 2008).

Milieu	Tests	<i>Shigella</i>
TSI	Glucose	+
	Lactose	-
	Saccharose	-
	H ₂ S	-
	Gaz	-
Mannitol – mobilité	Mobilité	-
Urée – indole	Uréase	-
	TDA	-
Citrate de Simmons	Citrate	-

Tableau 18 : Caractères biochimiques différentiels des différentes souches de *Shigella* (Aouissi, 2009 ; Carbonnelle et al., 1988).

	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. boydii</i>	<i>S. sonnei</i>
Mannitol	-	(+)	+	+
ODC	-	-	(-)	+
ONPG	(+)	-	(-)	d
Indole	d	d	d	-
Gaz en glucose	-	- ou d	- ou d	-
Dulcitol	(+)	(-)	(-)	-
Xylose	d	(-)	d	-
Rhamnose	d	d	(-)	+

(-) négatif pour la majorité des souches. (+) positif pour la majorité des souches.

4.2.2. Recherche de *Vibrio cholerae* :

Le genre *Vibrio* fait partie de la famille des Vibrionaceae. Les espèces de *Vibrio* qui sont le plus souvent à l'origine de phénomènes pathologiques chez l'homme sont : *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*. Leur température de croissance va de 18 à 40 °C et la zone de pH permettant leur culture va de 6 à 9 (Cohen et Karib, 2007 ; Federighi, 2005)

Les *Vibrio* sont des bacilles à Gram négatif, droits ou incurvés, assez court, d'un diamètre compris entre 0,5 et 0,8 µm et une longueur comprise entre 1,4 et 2,6 µm (Cohen et Karib, 2007), très mobiles grâce à une ciliature polaire, le plus souvent monotriche. (Denis et al., 2007 ; Harvey et al., 2007 ; Nauciel et Vildé, 2005). Ils sont aéro-anaérobies facultatifs et possédant une oxydase et fermentant le glucose sans production de gaz ni d'H₂S (Labres et al., 2008 ; Cohen et Karib, 2007).

Dans les pays où le choléra a pratiquement disparu, il est rare que la recherche du vibrion cholérique dans les eaux d'alimentation présente un intérêt (Rodier et al., 2009).

♣ Mode opératoire :

Jour 1 : Premier enrichissement

Le premier enrichissement s'effectue sur le milieu eau peptonée alcaline (EPA) 10 fois concentré réparti à raison de 50 ml par flacon auquel on ajoute aseptiquement 450 ml d'eau à analyser au moment du prélèvement. Ce dernier sera par la suite incubé à 37 °C pendant 18 à 24 heures, comme l'indique le schéma n° 15 (Lebres, 2002).

Jour 2 : Deuxième enrichissement et isolement

Ce flacon fera l'objet :

- D'une part, d'un deuxième enrichissement sur milieu EPA en tubes à raison de 1 ml ;
- D'autre part, d'un isolement sur gélose TCBS et GNAB. L'incubation se fait donc à 37 °C pendant 24 heures (Lebres, 2002).

Jour 3 : Lecture des boîtes et identification

- D'une part, le tube d'EPA fera l'objet d'un isolement sur TCBS ;

– D'autre part, les boîtes de gélose TCBS et GNAB subiront une lecture en tenant compte du fait que les *Vibrions* se présentent le plus souvent sous forme de grosses colonies lisses et transparentes caractéristiques (Lebres, 2002).

Identification morphologique et biochimique

Sur gélose TCBS, après 24 h \pm 3 h d'incubation à 37 °C \pm 1 °C les colonies caractéristiques de *V. cholerae* sont jaunes (saccharose positif) pour la plupart, celles de *V. parahaemolyticus* sont vertes (saccharose négatif) (Carbonnelle et al., 1988).

Sur GNAB, les colonies sont rondes, plates, bord réguliers, surface lisse brillantes, translucides sous forme de goutte de rosée (Patrick et al., 2009). Une identification morphologique et biochimique basée essentiellement sur :

- Coloration de Gram
- Oxydase (+)
- Ensemencement d'une galerie API 20 NE. (Tab. 19)

Tab.19 : Principaux caractères d'orientation du diagnostic des *Vibrio* potentiellement pathogènes. (Carbonnelle et al., 1988)

	<i>V. cholerae</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. fluvialis</i>
Croissance à 42 °C	+	d	d	+	d	d
ONPG	+	+	-	-	+	+
ADH	-	-	-	-	-	+
LDC	+	+	+	+	+	-
ODC	+	+	+	d	d	-
VP	d	-	-	+	-	-
Production d'indole	+	+	+	+	+	-
Nitrateréductase	+	+	+	+	+	+
Galactosidase	+	d	-	-	d	+

d : 11 à 89 % des souches positives.

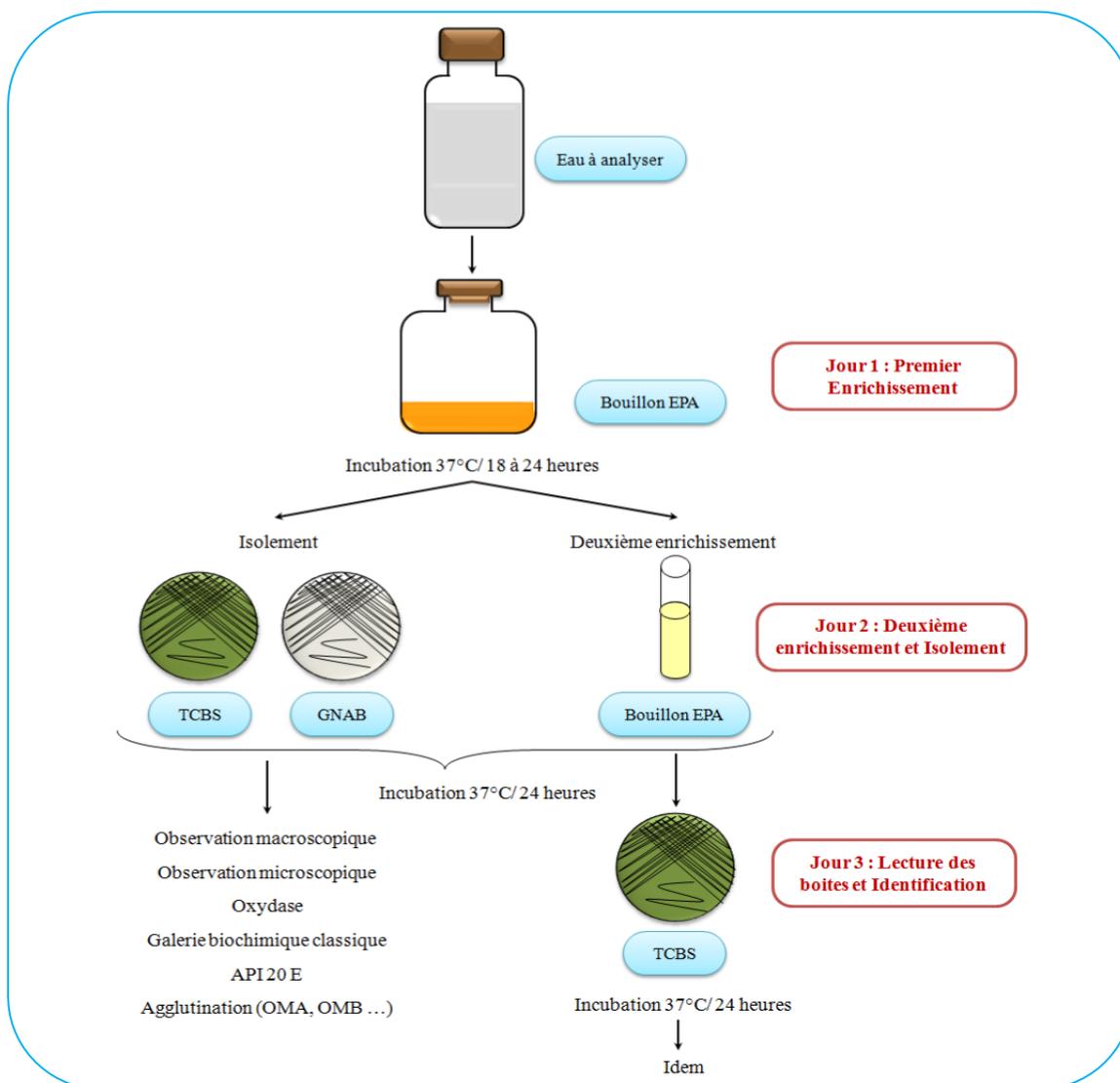


Figure 15: Protocole opératoire de recherche et identification de *Vibrio* dans les eaux.

4.2.3. Recherche des *Staphylococcus* :

Les espèces de genre *Staphylococcus* peuvent être classées en fonction de leur capacité à coaguler le plasma de lapin (**Federighi, 2005**). Ce sont des cocci à Gram positif de 0,5 à 2,5 μm de diamètre, qui se divisent dans des plans différents et de ce fait, forment très souvent des amas cellulaires irréguliers ; ils sont immobiles, non sporulés, et aérobies ou anaérobies facultatifs (**Pechère et al., 1982**).

Parmi les espèces retrouvées chez l'homme, trois occupent une place privilégiée: *S. aureus*, *S. epidermidis* et *S. saprophyticus* (**Avril et al., 1992**).

♣ Culture :

Pour les produits polymicrobiens, on a recours à des milieux sélectifs tels que le milieu de Chapman qui est un milieu gélosé hypersalé (7,5 % de NaCl) et contient du mannitol. L'incubation se fait à 37 °C pendant 24 à 48 heures. (Fig. 16) (Denis et al., 2007).

♣ Identification :

Les colonies sont alors entourées d'un halo jaune puisqu'elles fermentent le mannitol tout comme parfois *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* et *S. cohnii*. (Denis et al., 2007).

Les souches de *Staphylococcus aureus* sont de taille importante et élaborent leurs propre pigment ; elles apparaissent en jaune, surmontant une zone jaune par la suite de la fermentation du mannitol (Rodier et al., 1996). L'identification des staphylocoques nécessite la mise en œuvre de réactions spéciales au genre :

- Coloration de Gram ;
- Test à la catalase ;
- Oxydase ;
- Mannitol ;
- Recherche de la coagulase libre (Tab.20).

♣ Recherche de la Staphylocoagulase :

Les souches *Staphylococcus aureus* provoquent la coagulation du plasma oxalaté de lapin en 24 heures, ainsi que des espèces de staphylocoques animale (*S. intermedius*). Les autres espèces d'origine animale et humaine sont à coagulase négative.

♣ Mode opératoire :

Nous avonsensemencé un bouillon cœur cerveau à 37°C pendant 24h par des colonies de Chapman, ensuite on prend 0,1 ml de bouillon cœur cerveau est ajouté au plasma de lapin en suite incubé à 36±2°C. Examiner les tubes 2 h, 6 h puis 24 h après.

Les résultats du test est de voir le coagulum occupe plus de $\frac{3}{4}$ du volume du liquide initial. (Bourgeois et al, 1980 ; Délarras, 2008)

Tableau 20 : Les principaux caractères discriminants permettant le diagnostic d'espèce de *Staphylococcus* (Grosjean et al., 2009 ; Sayad, 2008 ; Denis et al., 2007)

	<i>S. aureus</i>	<i>S. Intermedius</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Catalase	+	+	+	+
Coagulase	+	+	-	-
Mannitol	+	-	+	-
Résistance à la Novobiocine (5 µg)	S	S	R	S

V : 11 à 89 % des souches positives, S : Sensible, R : Résistante

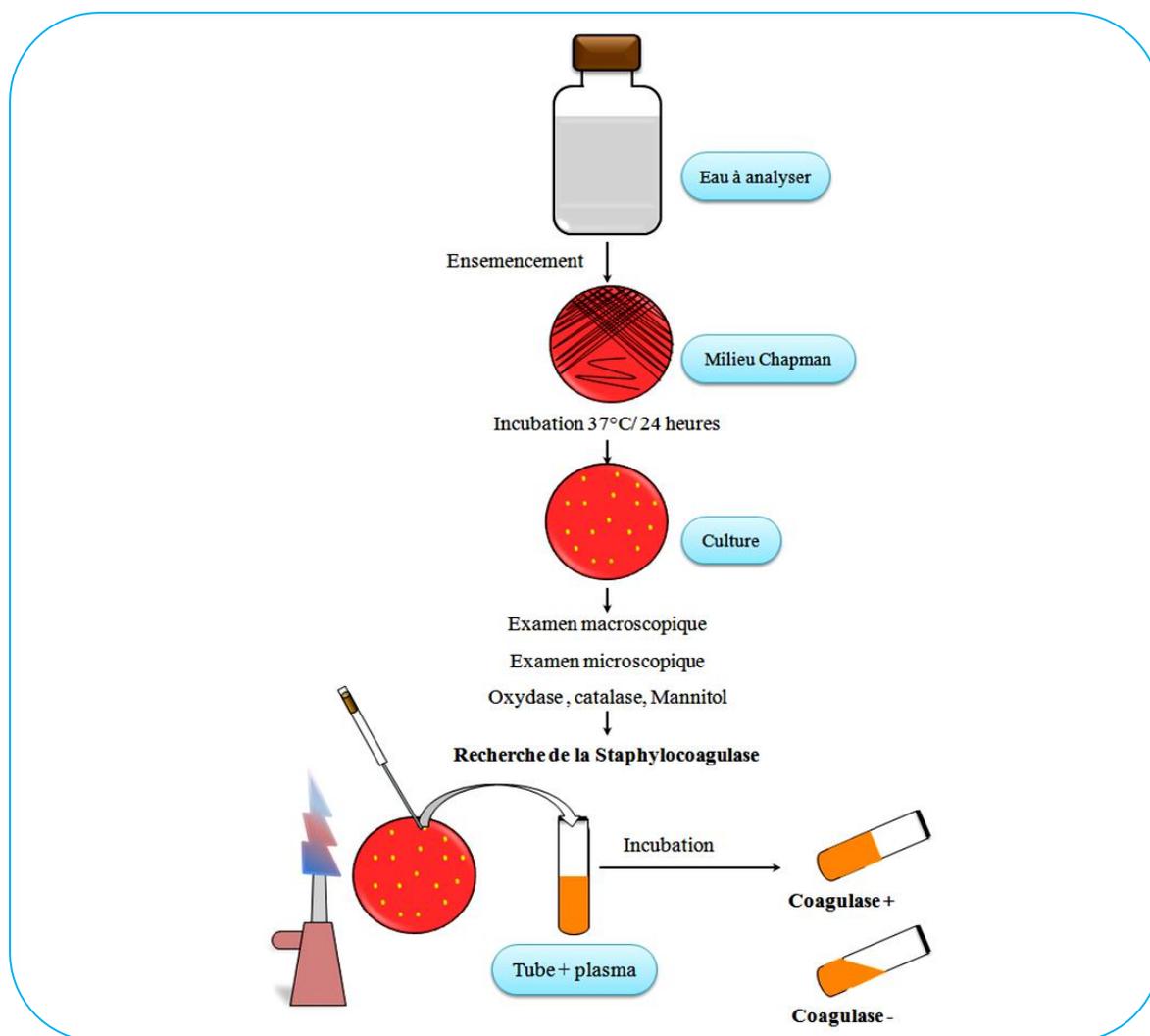


Figure 16: Protocole de recherche de *Staphylococcus* dans les eaux.

4.2.4. Recherche de *Pseudomonas* :

Le genre *Pseudomonas* (ou bacille pyocyanique) est fait de bacilles Gram négatif, droits et fins, aux extrémités arrondies, mobiles (à ciliature polaire), aérobies stricts, oxydase positive (**Rossignol, 2007**) et se caractérise par la pigmentation bleu-vert de ses colonies. *P. aeruginosa* est mésophile tandis que la majorité des espèces sont psychotropes. (**Rossignol, 2007**).

Le bacille pyocyanique ou *Pseudomonas aeruginosa*, Commensal du tube digestif mais peu abondant chez le sujet sain, il occasionne de nombreuses infections chez les sujets fragilisés. Il est à l'origine de 11% des infections nosocomiales, broncho-pulmonaires, cutanées, oculaires, et digestives. (**Cavallo et Fabre, 2004**)

♣ Culture :

Ensemencement par stries sur boîtes de pétri coulées de gélose cétrimide à partir de l'eau à analyser et incubé à 37°C pendant 24 à 48h. (**Fig. 17**) (**Delarras, 2007**)

♣ Identification :

Considérer comme colonie caractéristique toute colonie présentant une fluorescence. Du fait de la sélectivité du milieu cétrimide, on peut suspecter les colonies présentes d'être *Pseudomonas*. Dans tous les cas, il faudra réaliser une identification de l'espèce (**Rejsek, 2002**) :

- Coloration de Gram.
- Oxydase ; (**Rejsek, 2002**)
- Recherche de la pyocyanine : pigment bleu caractéristique de *Pseudomonas aeruginosa* responsable de la teinte bleue intense des milieux de culture : sa production est favorisée sur milieu de King A ;
- Recherche de la pyoverdine : présente une teinte vert fluorescent (*P. fluorescence*) est souvent masquée par la pyocyanine, sa production est maximale sur milieu de King B (**Tab.21**) (**Labres et al., 2008**).

Tableau 21: Caractéristiques d'identification des principales espèces de *Pseudomonas* (Sayad, 2008 ; Denis et al., 2007).

	Pyocyanine	Pyoverdine	Nitrate	Gélatinase	ADH	Uréase	Mannitol
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	d	+
<i>P. fluoresces</i>	-	+	d	+	+	+	+
<i>P. putida</i>	-	+	-	-	+	-	-
<i>P. stutzeri</i>	-	-	+	-	-	-	d

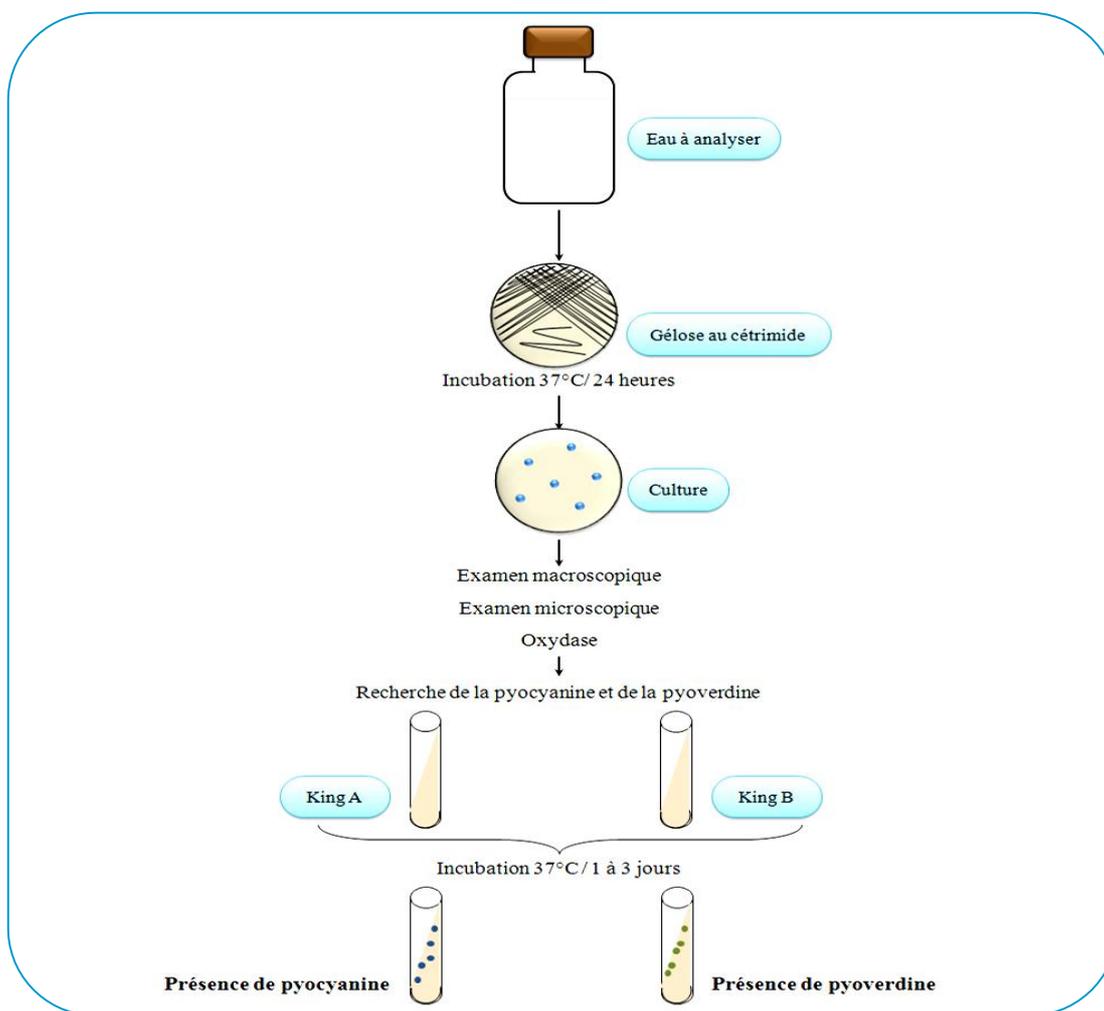


Figure 17 : Protocole de recherche de *Pseudomonas* dans les eaux

4.2.5. Recherche de *Yersinia enterocolitica* :

Le genre *Yersinia* famille Enterobacteriaceae comprend 03 espèces pathogènes : *Yersinia pestis*, *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* (Amos, 2003). Ces bactéries ont

une croissance plus lente que celle des autres entérobactéries (Nauciel et Vildé, 2005). L'espèce *Yersinia enterocolitica* est un bacille Gram négatif, non sporulée, asposulée, catalase positive (Amos, 2003) et mobile grâce à une ciliature péritriche. Cette espèce tolère : des pH compris entre 4 - 10 avec un optimum à 7.2 (Robins-Browne, 1997), des températures comprises entre 0 et 42 °C avec un optimum à 29 °C et cultive en présence de 0 à 5 % d'NaCl (Leclerc, 1994 ; Berche et al., 1988).

♣ Mode opératoire :

Enrichissement

En inoculant l'échantillon dans de l'eau peptonée tamponnée et de maintenir le mélange à cette température de + 4 °C. À intervalle périodique, tous les deux ou trois jours par exemple, il convient de repiquer sur milieu d'isolement (Rodier et al., 2009 ; Amos, 2003).

Isolement

Il peut être conseillé un milieu lactosé, type Mac Conkey ou Hektoen. (Amos, 2003). Il est possible de favoriser leur croissance en utilisant des températures peu élevées, et leur possibilité de survivre, et même de se multiplier, dans des milieux très pauvres et en anaérobiose. Ces propriétés sont mises à profit, soit :

- En incubant à des températures relativement basses, par exemple à 25 °C pendant 48 heures;
- En incubant en anaérobiose, aux températures précédentes, dans une jarre. (Fig. 18) (Rodier et al., 2009)

Identification morphologique et biochimique

Parmi les caractères principaux qui aideront au diagnostic, citons essentiellement : la non-fermentation du lactose en 48 heures, la présence de galactosidase (ONPG positive), la présence d'uréase très active, l'absence de phénylalanine désaminase et de tryptophane désaminase. Un caractère important est l'étude de la mobilité, sur milieux mannitol mobilité, aux deux températures de 25° et 37 °C, *Yersinia enterocolitica* est immobile à 37 °C et mobile à 25 °C (Rodier et al., 2009).

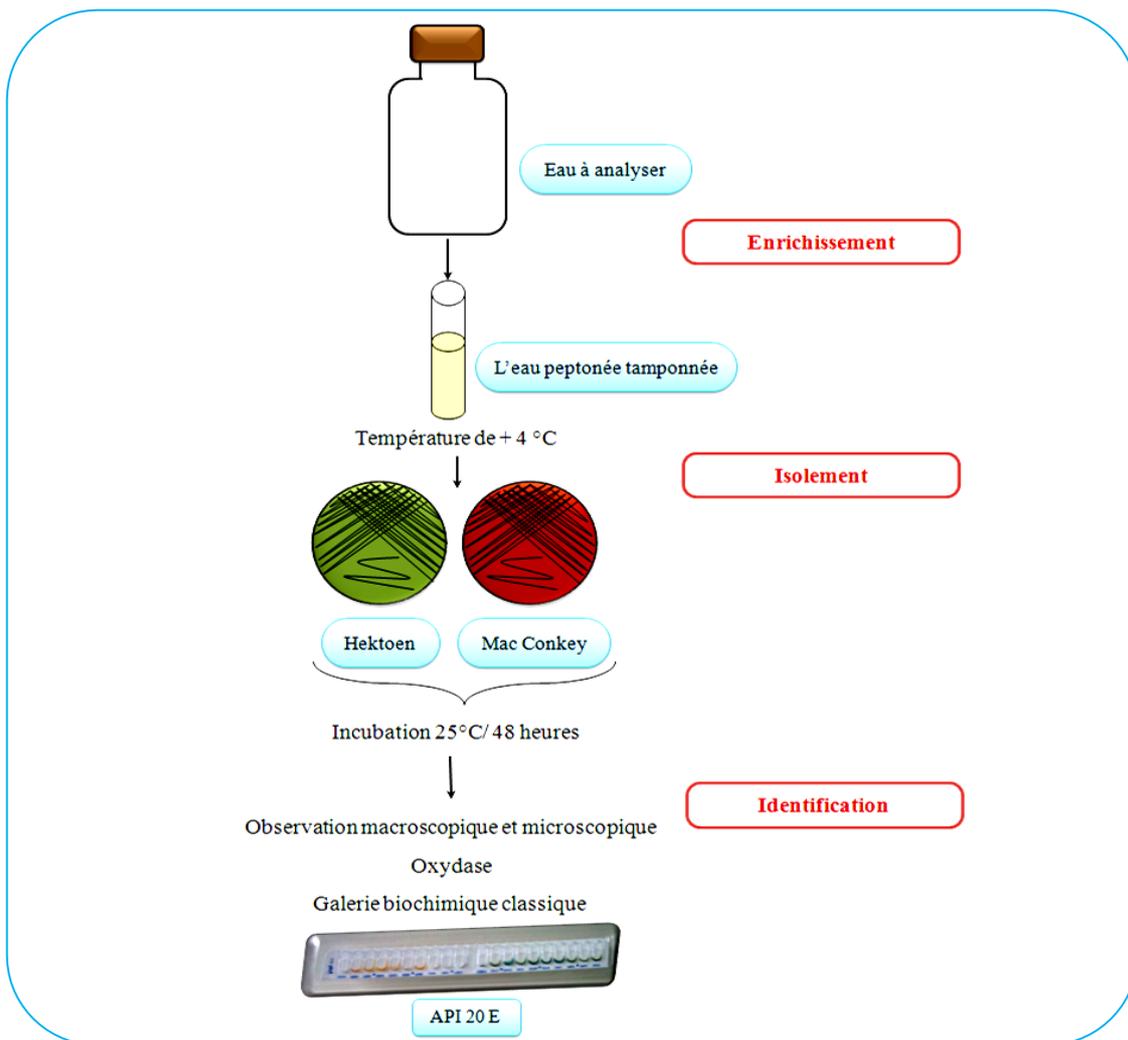


Figure 18 : Protocole de recherche de *Yersinia enterocolitica* dans les eaux.

4.3. Recherche et de dénombrement par filtration sur membrane filtrante :

4.3.1. Définition :

C'est la technique la plus utilisée au laboratoire. Le plus généralement, on procède à une filtration sur membranes en esters de cellulose, de porosité 0,22 μ ou 0,45 μ , susceptibles de retenir les bactéries. (Rodier *et al.*, 2009). (Annexe 07)

4.3.2. Matériel pour filtration sur membranes :

Plusieurs modèles d'appareil de filtration sont commercialisés. Ils comprennent tous les mêmes éléments de base, dont l'assemblage est schématisé dans la figure ci-dessous.

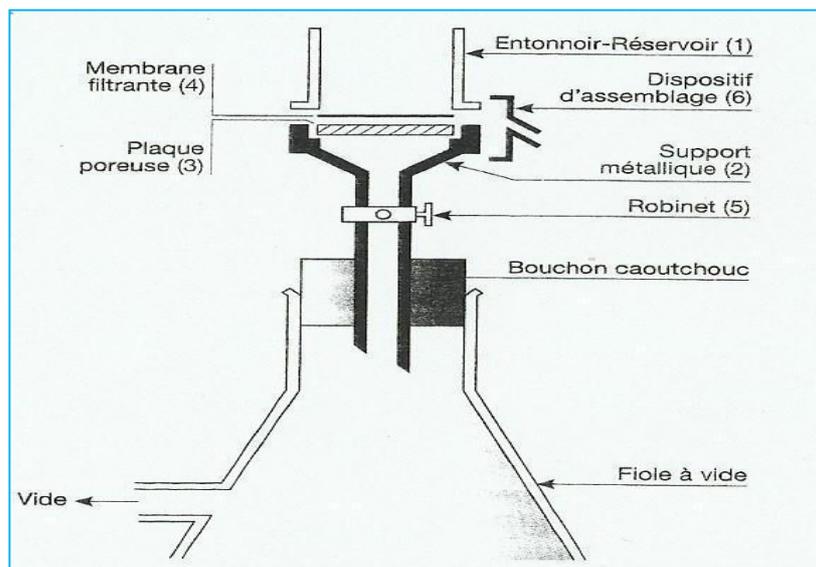


Figure 19 : Schéma simplifié d'un appareil de filtration (Rodier et *al.*, 2009).

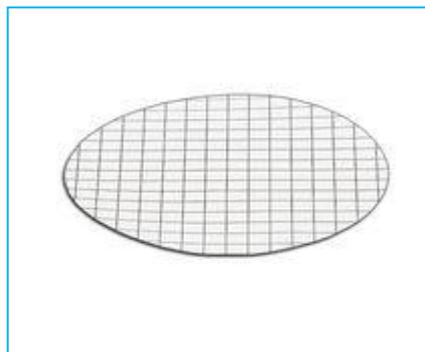


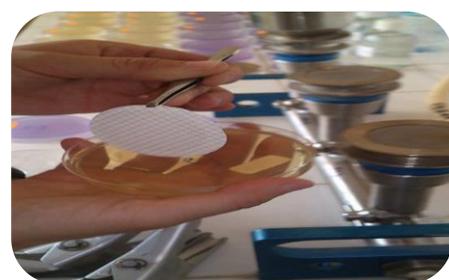
Figure 20: Membrane filtrante 0.45 micron (Rodier, 1984).

4.3.3. Technique de la filtration sur membrane :

Une rampe de filtration à trois postes en inox toujours stérilisée par flambage avant toute filtration a permis de filtrer les échantillons (Rodier, 1984).

Tableau 22: Les différentes étapes de la technique de filtration sur membrane.

- ♣ Flamber la face supérieure (plaque poreuse) de l'appareil.
- ♣ Fermer le robinet du support et mettre en marche la pompe à vide.
- ♣ Prélever une membrane stérile en la saisissant par son bord extérieur, avec une pince flambée et refroidie ; déposer sur la plaque poreuse.
- ♣ L'entonnoir-réservoir flambé et refroidi est placé au-dessus de la membrane.
- ♣ Installer le dispositif de fixation.
- ♣ Agiter soigneusement le flacon d'eau à analyser et verser l'eau, stérilement, dans le réservoir jusqu'au repère (100 ml).
- ♣ Ouvrir le robinet du support suffisamment pour laisser l'eau s'écouler lentement sous l'action du vide,
- ♣ Rincer avec de l'eau stérile (40 à 50 ml) dès la filtration terminée.
- ♣ Dès que la membrane paraît sèche, fermer le robinet, enlever le dispositif de fixation et, avec la pince à creuset, le réservoir.
- ♣ Prélever la membrane avec une pince flambée en la saisissant par son extrême bord, et l'introduire sur le milieu de culture choisi (Rodier et al., 2009).



Figures 21 : Les étapes de la filtration sur membrane.

♣ Isolements :

Selon les paramètres recherchés dans chaque type d'eau, on utilise différents milieux de cultures cités dans les normes correspondantes :

- ♣ Pour la recherche et le dénombrement de la flore aérobie revivifiable à 37°C : on utilise le milieu Gélosé Mueller Hinton (**ISO 6222 1999**).
- ♣ Pour la recherche et le dénombrement des coliformes totaux : on utilise une gélose lactosées au TTC et TERGITOL, incubé à 37°C (**ISO 9308-1**).
- ♣ Pour la recherche et le dénombrement des coliformes fécaux : on utilise une gélose lactosées au TTC et TERGITOL, incubé à 44°C (**ISO 9308-1**).
- ♣ Pour la recherche et le dénombrement des streptocoques fécaux : on utilise le milieu SLANETZ au TTC, incubé à 37°C (**ISO 7899-2**).
- ♣ Pour la recherche et le dénombrement de *Pseudomonas Aeruginosa*: on utilise le milieu CETRIMIDE, incubé à 37 °C (**Annie, 1999**).

Toutes Les boîtes de pétries sont incubées à 37 °C sauf pour la recherche des coliformes fécaux ou les boîtes sont incubé à 44 °C pendant 24 à 48h (**Rodier et al., 2009**).

♣ Lecture :

L'expression des résultats se fait sous forme d'un nombre d'unités formant colonies (UFC) (**Rodier et al., 2009**).

4.4. Identification microbienne :**4.4.1. Examen macroscopique des caractères cultureux**

Observer à l'œil nu ou à l'aide d'un loupe binoculaire les colonies développées sur les milieux gélosés et noter les caractéristiques suivantes (**Denis et al., 2007**) .

- La taille : colonies petites (< 1 mm), moyennes (1,5 à 3 mm), grosses (> 3 mm) ;
- La forme : Bombée, plate, ombiliquée, surélevée ;
- Le contour : à bords circulaire, irrégulières et parfois envahissantes, déchiquetées et parfois envahissantes ;

- Elévation de la colonie : convexe, légèrement convexe, plate ;
- L'opacité : opaque, translucide, transparente ;
- Pigmentation. (Delarras, 2007)

4.4.2. Examen microscopique :

Les techniques les plus communément utilisées au laboratoire de bactériologie médicale font appel à des colorations. La préparation est fixée sur une lame puis colorée (bactéries tuées et colorées) (Denis *et al.*, 2007).

Les étapes de coloration de Gram sont :

- ❖ A partir de la culture à étudier préparer un frottis.
- ❖ Réaliser une coloration simple au violet de Gentiane, laisser agir pendant 1 minute.
- ❖ Ajouter le Lugol et laisser agir pendant 1.30 minutes.
- ❖ Laver à l'eau puis à l'alcool.
- ❖ Recolorer avec la Fuchsiine, laissé agir pendant 30 secondes. (Fig. 22) (Bourdon et Marchal, 1981).

Les bactéries Gram positive (G+) sont bien colorées en violet, et les bactéries Gram négative (G-) sont colorées en rose. (Boukrouma, 2008)

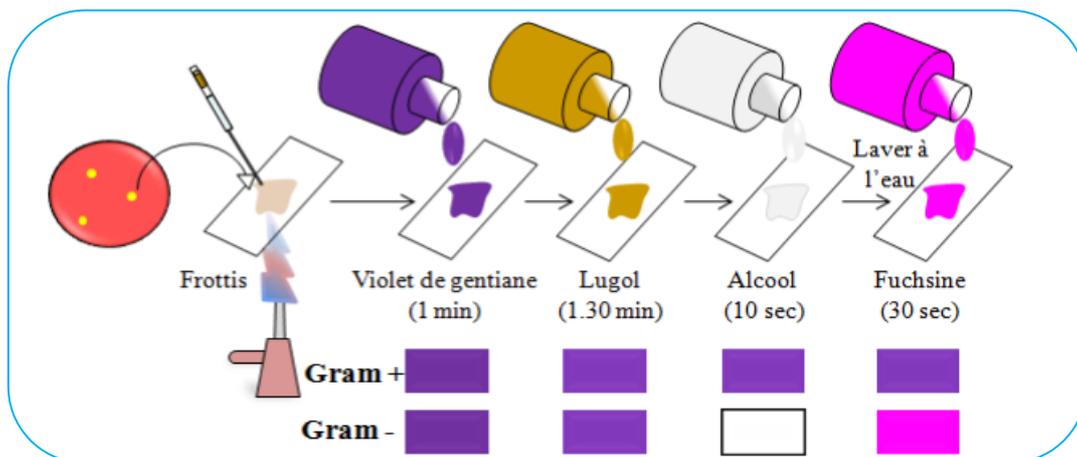


Figure 22: Procédure de la coloration de Gram.

4.4.3. Examens liés aux caractères biochimiques :

4.4.3.1. Galerie biochimique classique :

♣ Le milieu urée – indole (improprement appelé milieu urée – tryptophane) :

Ensemencer un milieu urée – indole avec une suspension bactérienne. Incuber 18 à 24 heures à 37 °C (Denis et al., 2007).

-Recherche d'indole :

L'indole est le métabolite terminal de la dégradation du tryptophane présent initialement dans le milieu. Seul les bactéries indologènes permettent cette dégradation jusqu'à la formation de l'indole (Khaled, 2009).

Après incubation, ajouter 0,5 ml de réactif Kovacs. La réaction est positive lorsqu'une coloration rouge profond se développe dans la partie supérieure du liquide (anneau rouge en surface) (Rodier et al., 1996).

-Recherche d'une uréase :

Les uréases sont des enzymes qui hydrolysent l'urée en dioxyde de carbone et ammoniac. (Singleton, 2005). Après incubation l'urée, sous l'action d'une uréase bactérienne va être transformée en carbonate d'ammonium alcalin entraînant une coloration rouge violacée du milieu (Uréase positive). Si le milieu persiste orange, cela indique un test négatif. (Denis et al., 2007).

♣ Milieu Clark et Lubs :

Ensemencer un tube du milieu Clark et Lubs avec la souche bactérienne à tester. Incuber à 37 °C pendant 24 heures (Delarras, 2007).

Test VP (Voges-Proskauer) :

- Ajouter 10 gouttes d'alpha naphthol et le même volume de coude concentré (ou de potasse) ;
- Incliner le tube pour permettre une bonne oxygénation et attendre 10 min.
- L'apparition d'une couleur rose à rouge signe la réaction positive. Si le milieu reste jaune, le test est négatif (Delarras, 2007).

Test RM (Rouge de Méthyle) :

- Ajouter 2 à 3 gouttes de méthyle ;
- La lecture est immédiate. Les résultats sont comme suit : teinte rouge : RM^+ , teinte jaune : RM^- (Sayad, 2008).

♣ Milieu mannitol – mobilité :

Le milieu mannitol-mobilité permet de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité. Le milieu estensemencé par piqûre centrale à l'aide d'une pipette Pasteur, chargé de culture en milieu solide, puis incubé à 37°C pendant 24h. La fermentation du mannitol entraîne le virage au jaune du milieu :

- ♣ Si le germe est très mobile, une la masse microbienne se développe le long de la piqûre et envahit tout le tube;
- ♣ S'il est peu mobile, elle se développe le long de la piqûre et se réduit à de petites ramifications
- ♣ Enfin, s'il est immobile, il se développe seulement dans la trace de la piqûre qui demeure fine et nette (Sayad, 2008).

♣ Bouillon nitrate (Recherche d'un nitrate réductase) :

Les bactéries, lorsqu'elles possèdent un nitrate réductase, sont capables de transformer les nitrates (NO_3^-) en nitrites (NO_2^-) et éventuellement en azote (N_2). La recherche d'un nitrate réductase se fait par la mise en évidence des nitrites formés (Denis et al., 2007).

Un bouillon nitraté estensemencé avec la bactérie à étudier et incubé 18 heures à 37 °C. Après incubation, 3 gouttes d'une solution d'acide sulfanilique (Griess A) et 3 gouttes d'une solution de naphtylamine (Griess B) sont ajoutées au bouillon. Si une coloration rose fugace apparaît, les nitrates ont été réduits au stade nitrites (nitrate +). En absence de coloration, soit les nitrates ont été réduits au stade azote soit la bactérie ne possède pas de nitrate réductase (Nitrate -) (Singleton, 2005).

♣ Le milieu Citrate de Simmons :

Le milieu Citrate de Simmons permet de mettre en évidence certaines bactéries qui sont capables d'assimiler le citrate de sodium comme seule source de carbone et d'énergie. Ces bactéries possèdent un citrate perméase et les enzymes du catabolisme du citrate.

Ensemencer la pente de ce milieu gélosé en stries longitudinales et parallèles à partir d'une colonie isolée prélevée sur un milieu gélosé. Incuber à 37 °C pendant 24 à 48 heures. Le test citrate est dit positif lorsque la couleur du milieu vire au bleu. Les bactéries citrate négatif ne donnent ni culture ni bleuissement, même après 7 jours d'incubation (Delarras, 2007).

♣ **Le milieu TSI (Triple Sugar Iron) :**

Le milieu TSI est principalement utilisé pour la caractérisation biochimique des entérobactéries. Il permet de mettre en évidence en 24 heures l'attaque du glucose, du lactose et/ou saccharose ainsi que la production d'hydrogène sulfuré et de gaz (Delarras, 2007).

Ce milieu est ensemencé avec la souche à étudier en effectuant des stries à la surface de la pente de la gélose puis le culot est ensemencé par piqure centrale à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. Incuber à 37°C pendant 24 heures (Delarras, 2007).

La lecture de ce milieu est résumée dans le tableau 23.

Tableau 23 : Lecture et interprétation des tests biochimiques du milieu TSI.

	Glucose		Lactose et/ou du saccharose		Production de gaz	Formation d'H ₂ S
Le culot	Rouge	Glucose non fermenté	-		Apparition de gaz dans le culot	Formation d'une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqure
	Jaune	Glucose fermenté				
La pente inclinée	-		Rouge	Lactose et saccharose non fermentés	-	
			Jaune	Lactose et/ou saccharose fermenté(s)		

♣ Mise en évidence d'une catalase :

La catalase est une enzyme qui décompose le peroxyde d'Oxygène ou l'eau oxygénée (H₂O₂) en eau et en Oxygène gazeux. La méthode consiste à prélever une colonie du germe à étudier sur l'extrémité d'une pipette Pasteur fermée que l'on plonge ensuite dans un millilitre d'eau oxygénée à 10 volumes. Le dégagement de bulles gazeuses signe la présence de l'enzyme (Carbannelle *et al.*, 1988).

♣ Recherche des cytochromes oxydases :

Les bactéries possédant une chaîne respiratoire complète sont dotées d'un cytochrome oxydase. (Denis *et al.*, 2007).

La recherche s'effectue avec des disques prêts à l'emploi du commerce. On pose le disque sur une lame, on l'imbibe avec une goutte d'eau distillée et étaler une colonie sur le disque. La présence d'une oxydase se traduit par l'apparition d'une coloration violette (Carbannelle *et al.*, 1988).

4.4.3.2. API Système :**a- L'API 20 E :**

API 20 E est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux.

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. [4]

♣ Mode opératoire :

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Incrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Sortir la galerie de son emballage et la placer dans la boîte d'incubation.
- Préparation de l'inoculum :
 - ♣ Utiliser un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile ou d'eau distillée stérile.

- ♣ A l'aide d'une pipette, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18 – 24 heures).
- ♣ Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.
- Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie :
 - ♣ Pour les tests [CIT], [VP]et[GEL], remplir tube et cupule,
 - ♣ Pour les autres tests, remplir uniquement les tubes (et non les cupules),
 - ♣ Pour les tests : ADH, LDC, ODC, H₂S, URE créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Refermer la boîte d'incubation. Incuber à 37 °C pendant 18 – 24 heures (**Fig. 23**) [5]

♣ **Lecture :**

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.
- Si 3 tests ou plus (test GLU + ou -) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :
 - ♣ Test TDA : ajouter 1 goutte de réactif TDA.
 - ♣ Test IND : ajouter 1 goutte de réactif JAMES.
 - ♣ Test VP : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. (**Annexe 03**) [5]

♣ **Interprétation :**

L'identification est obtenue à partir du profil numérique.

- Détermination du profil numérique : sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. La galerie API 20 E comportant 20 tests, en additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres ; la réaction de l'oxydase qui constitue le 21^{ème} test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive.
- Identification : elle est réalisée à partir de la base de données.
 - ♣ A l'aide du Catalogue Analytique.
 - ♣ A l'aide du logiciel d'identification apiwebTM. (**Fig. 23**) [5]

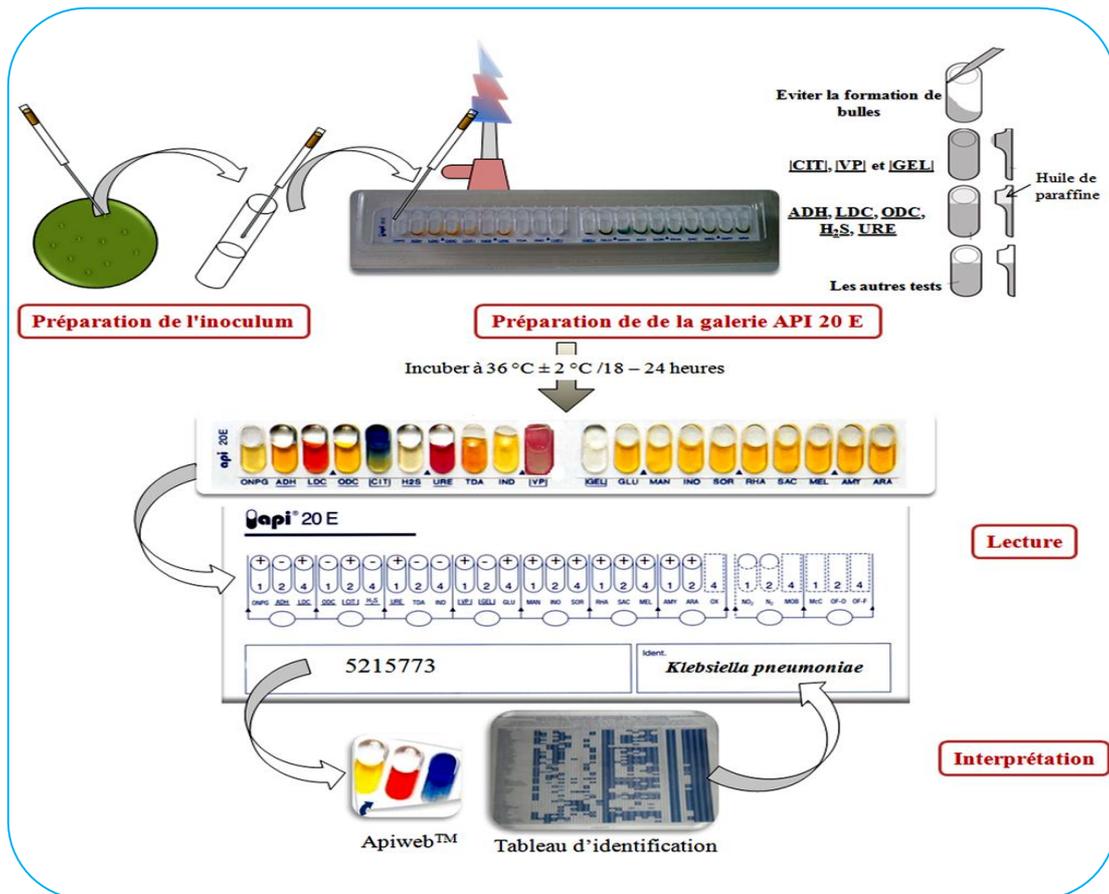


Figure 23 : Préparation de la galerie API 20E.



Figure 24 : Api 20 E tous les tests positifs (en haut) et tous-tests négatifs (en le bas).

b- API 20 NE :

La galerie biochimique standardisée et miniaturisée API 20 NE pour l'identification de certains bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux, oxydase positif. Elle se compose d'une galerie constituée de 20 microtubes contenant milieux et substrats sous forme déshydratée. (Fig. 25)

Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. [04]

♣ Mode opératoire :

- La préparation de la galerie API 20 NE se fait de la même façon que l'API 20 E.
- Préparation de l'inoculum : Faire une suspension bactérienne, dans une ampoule de NaCl 0,85 % Medium ou dans un tube d'eau distillée stérile, de turbidité égale à celle de l'étalon 0,5 Mc Ferland.
- Remplir les tubes (et non les cupules) des tests NO₃ à PNPG avec la suspension précédente. Eviter la formation de bulles.
- Transférer 200 µl (4 à 8 gouttes) de la suspension précédente, dans une ampoule AUX Medium. Homogénéiser.
- Remplir les tubes et cupules des tests GLU à PAC.
- Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests GLU, ADH, URE.
- Incuber 24 heures à 30 °C.

Lecture et interprétation :

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de Lecture. Réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs. (Annexe 04)

L'identification est réalisée avec le catalogue analytique ou à l'aide d'un logiciel d'identification. [5]



Figure 25 : Api 20 NE tous les tests positifs (en haut) et tous-tests négatifs (en bas).

c- API 20 Strep :

API 20 Strep est un système standardisé associant 20 tests biochimiques qui présentent un grand pouvoir discriminant (Fig. 26). Il permet de faire un diagnostic de groupe ou d'espèce

pour la plupart des streptocoques, entérocoques et pour les germes apparentés les plus courants.

Les tests enzymatiques sont inoculés avec une suspension dense, réalisée à partir d'une culture pure, qui reconstitue les milieux. Les tests de fermentation sont inoculés avec un milieu enrichi (contenant un indicateur de pH) qui réhydrate les sucres. La préparation de la galerie API 20 Strep se fait de la même façon que l'API 20 E (**anonyme, 2009**).

♣ Inoculation de la galerie :

- Dans la première moitié de la galerie (tests VP à ADH) répartir la suspension précédente en évitant la formation de bulles (pour cela, incliner la boîte d'incubation vers l'avant et placer la pointe de la pipette sur le côté de la cupule)
- Pour les tests VP à LAP : environ 100 µl dans chaque cupule. - pour le test ADH : remplir uniquement le tube.
- Dans la deuxième moitié de la galerie (tests RIB à GLYG) : - ouvrir une ampoule d'API GP Medium comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" et y transférer le reste de la suspension, soit 0,5 ml au minimum. Bien homogénéiser.
- Répartir cette nouvelle suspension dans les tubes uniquement.
- Remplir les cupules des tests soulignés ADH à GLYG avec de l'huile de paraffine en formant un ménisque convexe.
- Refermer la boîte d'incubation. Incuber à $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en aérobiose pendant 4H00 - 4H30 pour une première lecture et 24 heures (± 2 heures) si nécessaire pour une deuxième lecture. (**anonyme, 2009**).

♣ Lecture de la galerie :

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de Lecture. Réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs (**Annexe 05**). L'identification est réalisée avec le catalogue analytique ou à l'aide d'un logiciel d'identification. (**anonyme, 2009**).



Figure 26: API 20 Strep tous les tests positifs (en haut) et tous-tests négatifs (en bas).

d- API 20 Staph :

API20 Staph est un système standardisé pour l'identification des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Kocuria* comprenant des tests biochimiques miniaturisés ainsi qu'une base de données. (Fig.27)

La galerie API Staph comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans API Staph Medium qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La préparation de la galerie API 20 Staph se fait de la même façon que l'API 20 E. (anonyme, 2009).

♣ Inoculation de la galerie :

- A l'aide d'une pipette, remplir les tubes de la galerie avec API Staph Mediumensemencé.
- Ne remplir que les tubes et non les cupules, sans dépasser le niveau du tube. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant, créer une anaérobiose dans les tests ADH et URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine pour former un ménisque convexe.
- Renfermer la boîte d'incubation. Incuber à $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 18-24 heures.

♣ Lecture de la galerie :

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de Lecture (Annexe 06) et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.



Figure 27: API 20 Staph tous les tests positifs (en haut) et tous-tests négatifs (en bas).

4.4.4. Antibiogramme (méthode de disques) :

4.4.4.1. Principe :

Pour réaliser l'antibiogramme par la méthode des disques, la culture bactérienne est effectuée à la surface d'une gélose spécialement étudiée, la gélose de Mueller-Hinton, éventuellement additionnée, dans des cas particuliers, de sang ou d'autres additifs. Des disques préimprégnés d'une dose connue d'antibiotique sont déposés à la surface de la gélose (Jean et Guy, 2001)

4.4.4.2. Technique :

♣ Préparation de l'inoculum :

Comme pour tout antibiogramme ne peut être réalisé qu'à partir d'une souche pure.

A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, réaliser une suspension microbienne d'opacité équivalente au point 0,5 de l'échelle de Mac Ferland (étalon d'opacité réalisé en ajoutant 0,05 cm d'une solution de chlorure de baryum à 1 % dans 9,95 cm d'acide sulfurique à 1 % (Jean et Guy, 2001)

Dans le cas de *Streptococcus* spp. et de *Hémophiles* spp. Utiliser un écouvillon pour prélever plus facilement les colonies bactériennes. Bien décharger l'anse ou l'écouvillon dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9% (Jean et Guy, 2001)

♣ Ensemencement (technique par écouvillonnage):

- Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum et l'essorer sur les bords.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.

- Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose (**Fig. 28**) (**Jean et Guy, 2001**).

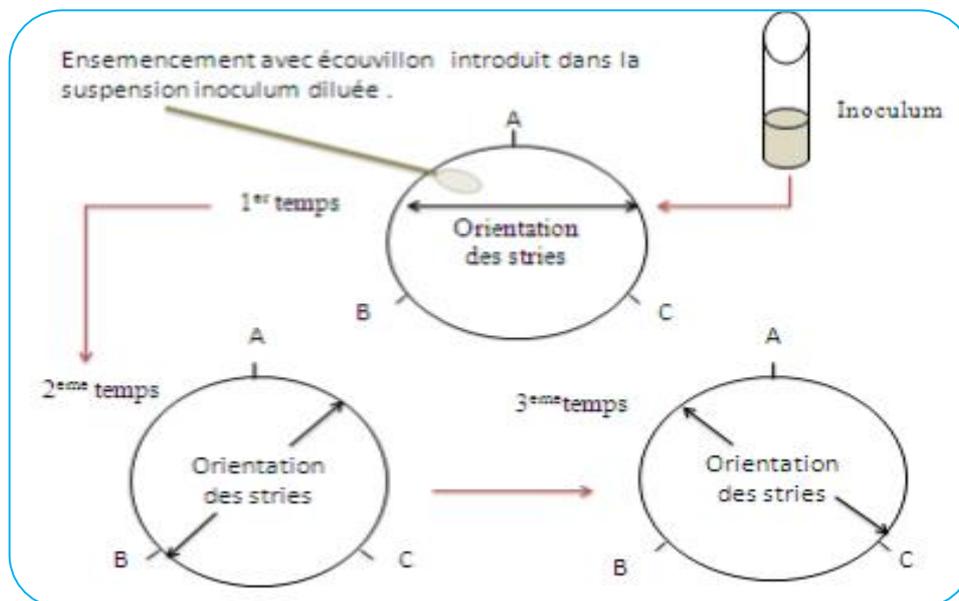


Figure 28 : protocole présente l'ensemencement par écouvillonnage. (**Jean et Guy, 2001**)

♣ Application des disques d'antibiotiques :

- Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotique sur une boîte de 90 mm.
- Pour les bactéries exigeantes (*Streptococcus* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus* spp.....), ne pas mettre plus de 4 disques par boîte de 90 mm.
- Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de pinces bactériologiques stériles et ne pas déplacer les disques après application.
- La liste des antibiotiques à tester selon la bactérie isolée, figure dans le tableau **06**. (**anonyme, 2011**).

♣ Incubation :

Les boîtes sont placées dans l'étuve. Respecter la température, l'atmosphère et la durée d'incubation recommandées pour chaque bactérie (**anonyme, 2011**).

♣ Lecture :

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.
- Pour les bactéries testées sur Mueller-Hinton simple, les mesures seront prises en procédant par transparence à travers le fond de la boîte de Petri fermée.

- Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes.
- Classer la bactérie dans l'une des catégories S, R ou I. (Fig.29) (anonyme, 2011)

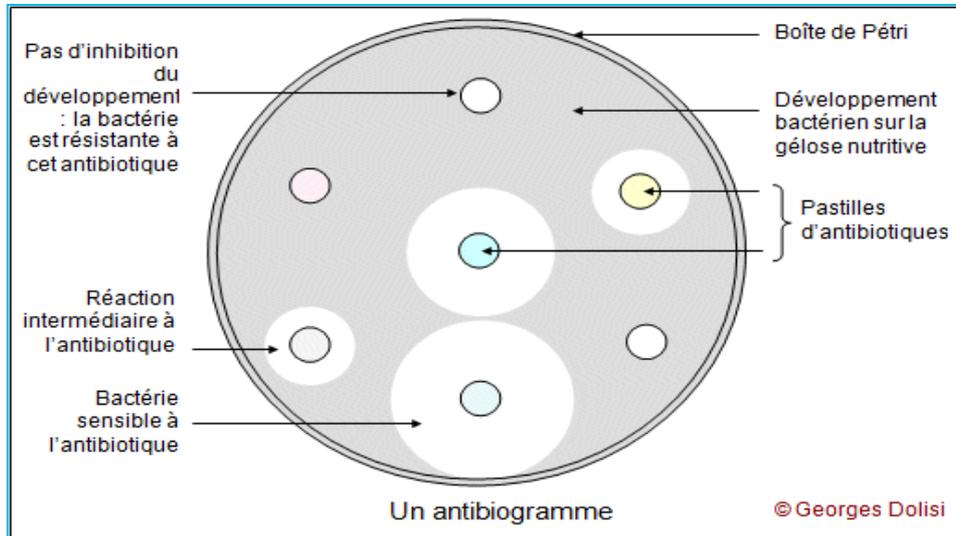


Figure 29 : La lecture d'antibiogramme. (Jean et Guy, 2001)

Les résultats des paramètres physicochimiques mesurés *in situ* et les paramètres microbiologiques (recherche des indicateurs de contamination fécale et des germes pathogènes) sont résumés dans des tableaux et des graphiques suivis d'une interprétation.

1. Les paramètres physicochimiques:

Les résultats des analyses physicochimiques des échantillons d'eau prélevés dans les différents services hospitaliers ciblés sont représentés dans les diagrammes en-dessous.

Nous remarquons une homogénéité pour tous les échantillons d'eau analysés concernant les deux paramètres physico-chimiques : la température et le pH.

1.1. La température (T) :

La température donne des valeurs presque stables pour tous les échantillons d'eau analysés à partir de l'EPH Ibn Zohr et l'EPH Hakim Okbi,

♣ Pour l'EPH Ibn Zohr, la valeur la plus élevée est de 18 °C enregistrée dans le service pneumologie durant le 2^{ème} prélèvement, tandis que la valeur minimale est de 14,80 °C enregistrée dans le service d'hémodialyse durant le 1^{er}prélèvement.

♣ Quant à l'EPH Hakim Okbi, la valeur la plus élevée est de 17,5 °C enregistrée dans le service de chirurgie durant le 2^{ème} prélèvement, tandis que la valeur minimale est de 14,09 °C enregistrée dans les urgences durant le 1^{er} prélèvement.

Selon la grille d'appréciation de la qualité de l'eau en fonction de la température, notre eau est de qualité bonne (**Monod, 1989**)

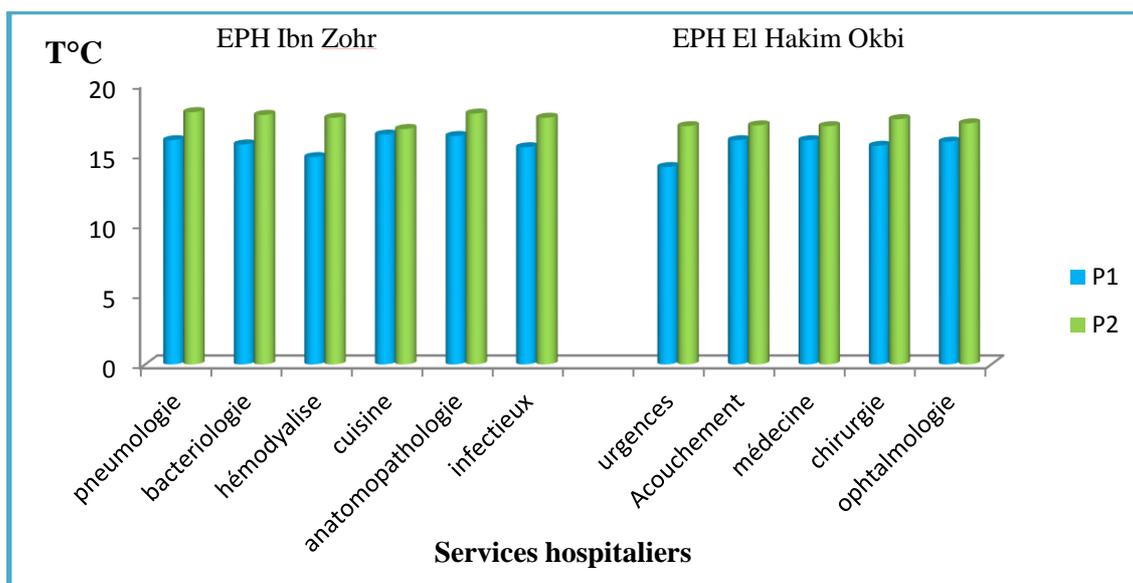


Figure 30 : Variations de la température de l’eau à l’EPH Ibn Zohr et l’EPH Hakim Okbi

1.2. Le Potentiel Hydrogène (pH) :

Le pH est l’un des paramètres parmi les plus importants de la qualité de l’eau. (Rodier et al., 2009)

Pour ce paramètre, on n’a pas remarqué de grande variation entre les deux prélèvements; les valeurs enregistrées sont globalement très proche de la neutralité. Ces valeurs sont comprises entre 6,5 et 7,2 pour les deux établissements. (Fig. 31)

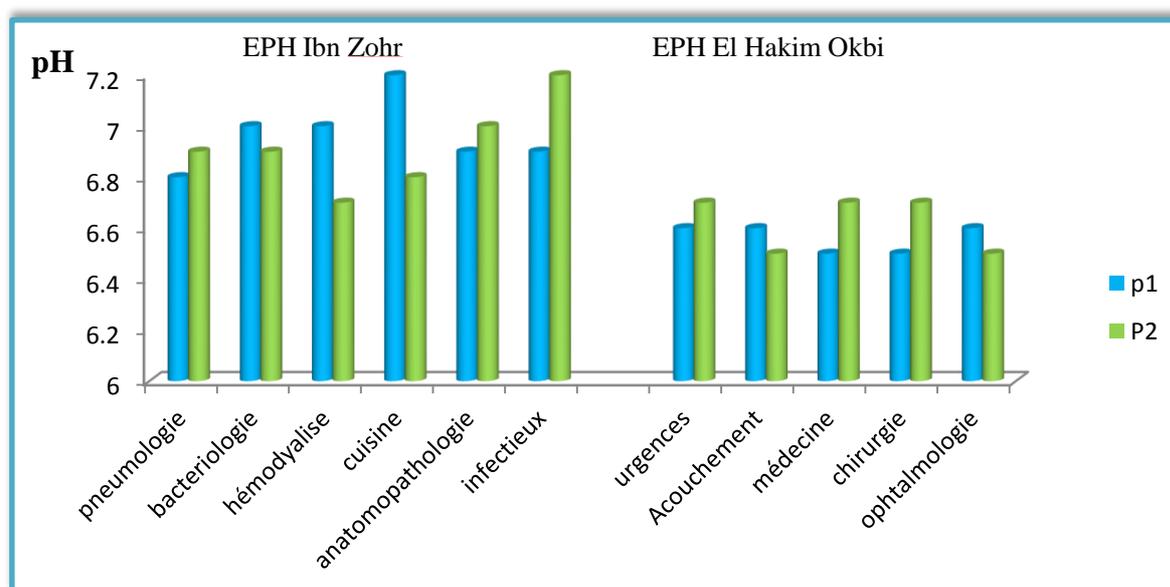


Figure 31 : Variations de pH de l’eau à l’EPH Ibn Zohr et l’EPH Hakim Okbi.

♣ Pour l'EPH Ibn Zohr, les valeurs obtenues oscillent entre 7.2 et 6.7 notées dans la cuisine durant le 1^{er} prélèvement et dans le service d'hémodialyse durant le 2^{ème} prélèvement, respectivement.

♣ Quant à l'EPH Hakim Okbi, la valeur la plus élevée est de 6.7 enregistrée durant le 2^{ème} prélèvement dans les urgences et les services de médecine générale et chirurgie, tandis que la valeur minimale est de 6.5 enregistrée dans les services de médecine générale et chirurgie durant le 1^{er} prélèvement et dans les services d'accouchement et ophtalmologie durant le 2^{ème} prélèvement.

Une eau acide et agressive ($0 < \text{pH} < 7$) corrode les parties métalliques des canalisations de distribution (libération de métaux). Le risque sanitaire est alors fonction des métaux qui passent en solution dans l'eau.

Selon la grille d'appréciation de la qualité de l'eau de robinet en fonction de pH, notre eau est de qualité moyenne (**Monod, 1989**)

1.3. La turbidité (NTU) :

La turbidité d'une eau est due à la présence des particules en suspension, notamment colloïdales : argiles, limons, grains de silice, matières organiques...etc. l'appréciation de l'abondance de ces particules mesure son degrés de turbidité (**Fig. 32**) (**Rodier, 2009**).

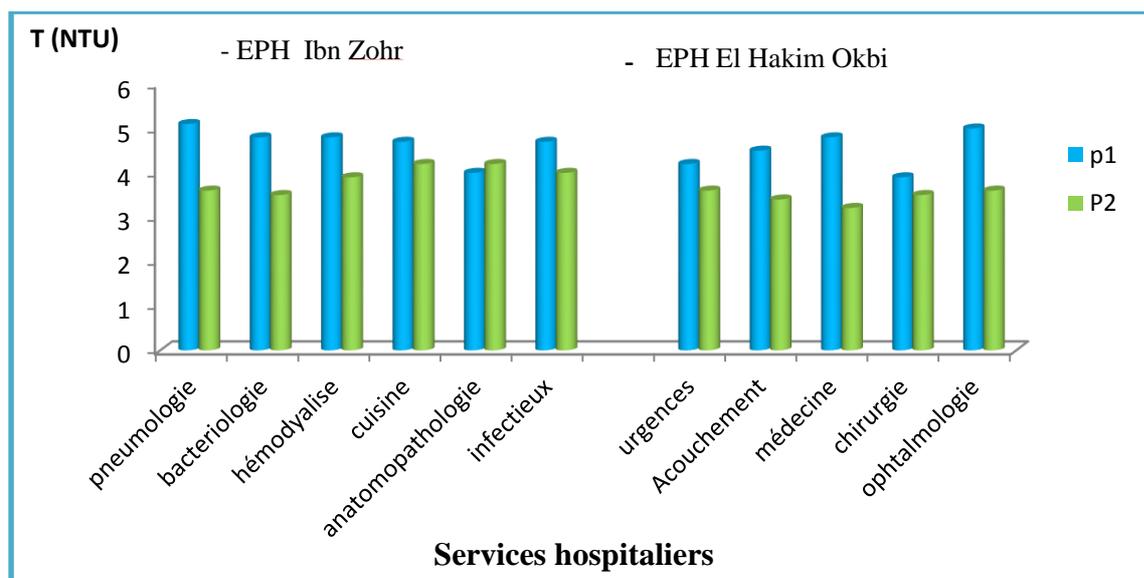


Figure 32 : Variations de la turbidité de l'eau à l'EPH Ibn Zohr et l'EPH Hakim Okbi.

♣ Pour l'EPH Ibn Zohr, la valeur la plus élevée est de 6.30 enregistrée dans le laboratoire de bactériologie durant le 2^{ème} prélèvement, tandis que la valeur minimale est de 3.8 enregistrée dans la cuisine, les services de anatomo-pathologie et infectieux durant le 1^{er} prélèvement et dans le service de pneumologie durant le 2^{ème} prélèvement.

♣ Cependant, pour l'EPH Hakim Okbi, les valeurs les plus élevées ont été marquées durant le 2^{ème} prélèvement dans les services de chirurgie et ophtalmologie, tandis que valeurs les plus faible ont été enregistrées durant le 1^{er} prélèvement dans les urgences et les services d'accouchement et médecine générale.

Lorsque la turbidité est égale ou supérieures à 5 (NTU) les cas d'échec de la désinfection sont fréquents, c'est pourquoi il est universellement admis que pour assurer le succès de la désinfection la turbidité doit toujours être inférieur à 5 NTU et de préférence inférieures à 1 NTU.

La matière organique associée à la turbidité favorise la formation de biofilms dans le réseau et par conséquent, le développement de bactéries insensibles au chlore notamment. Elle indique une probabilité plus grande de présence d'éléments pathogènes.

Selon la grille d'appréciation de la qualité de l'eau de robinet en fonction de la turbidité, notre eau est de qualité moyenne. (**Monod, 1989**)

1.4. Chlore libre (CL):

♣ Pour l'EPH Ibn Zohr, la valeur la plus élevée est de 0.22 mg/100ml enregistrée dans le service pneumologie durant le 2^{ème} prélèvement, tandis que la valeur minimale est de 0.19 enregistrée dans le service d'hémodialyse durant le 1^{er}prélèvement.

♣ Quant à l'EPH Hakim Okbi, la valeur maximale est des 0.28mg/100ml dans le service de médecine durant le 1^{er} prélèvement, tandis que la valeur minimale est de 0.1mg/100ml notée sur le service d'accouchement durant le 2^{ème} prélèvement. (**Fig.33**)

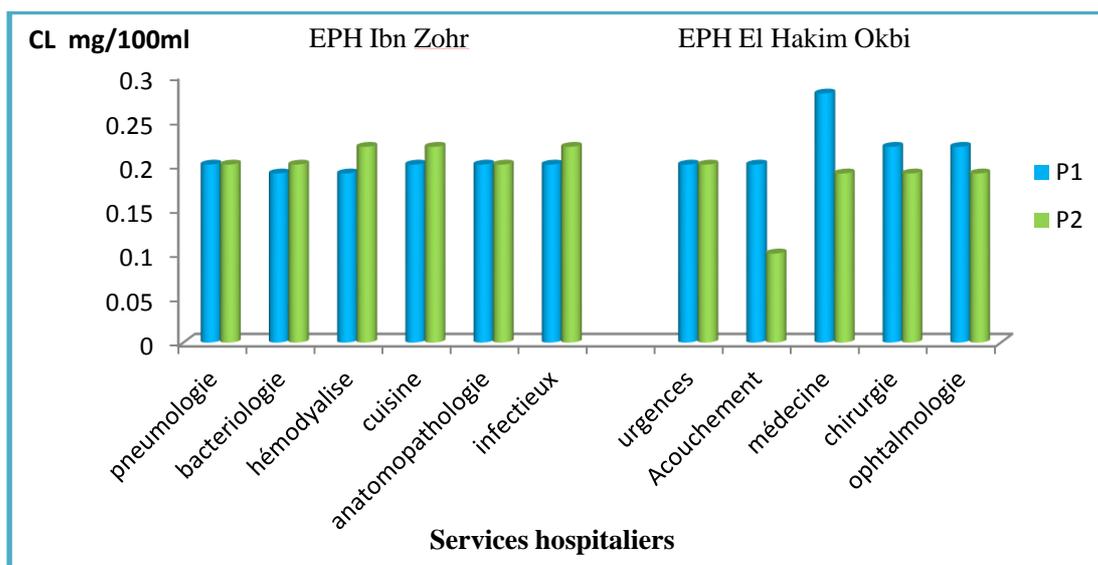


Figure 33 : Variations de chlore libre de l'eau à l'EPH Ibn Zohr et l'EPH Hakim Okbi.

La concentration en chlore libre, est diminuée avec la turbidité de ceci se traduit par la présence d'un contenu élevé en matières en suspension et en matières colloïdales d'origine minérale ou organique consommatrice d'oxydant.

2. Les analyses microbiologiques :

Les analyses microbiologiques des eaux des deux établissements de santé ont montrées une grande variation des concentrations des microorganismes.

2.1. Recherche et dénombrement des germes totaux revivifiables:

Bien que la présence de bactéries revivifiables en grande quantité n'a aucune valeur indicative, leur dénombrement doit être régulièrement effectué car une évolution importante, peut être représentative d'un apport contaminant (matière organique par exemple) (Tab. 24 ; Fig. 34) (Bouchaala, 2010).

Tableau 24: Variations de germes revivifiables dans l’eau à l’EPH Ibn Zohr et El Hakim Okbi.

Services		P1		P2	
		22°C	37°C	22°C	37°C
Ibn zohr	Pneumologie	30000	50000	30000	50000
	Bacteriologie	2100	1100	32000	25000
	Hémodyalise	30000	50000	35000	46000
	Cuisine	14600	64400	2000	54600
	Anatomopathologie	54000	24800	37500	24500
	Infectieux	1500	24100	32000	34500
EPH Hakim Okbi	Urgences	30000	50000	2430	25000
	Acouchement	2200	25000	53200	55200
	Médecine	30000	2800	60000	64000
	Chirurgie	7800	19200	35000	37000
	Ophtalmologie	9100	10000	3500	1500

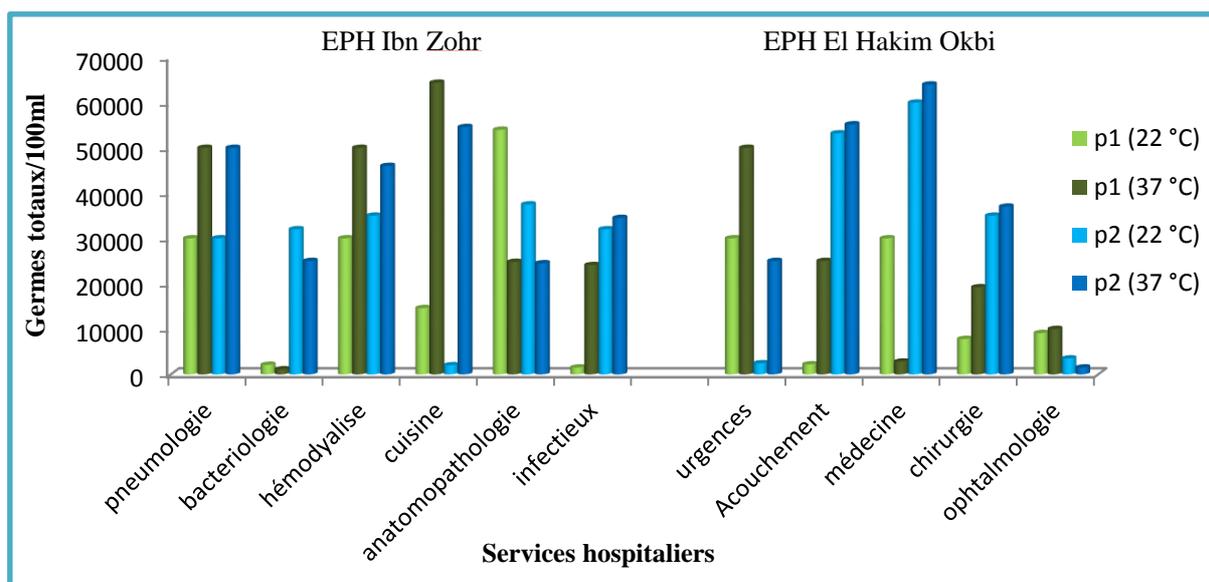


Figure 34 : Variations de germes revivifiables dans l’eau à l’EPH Ibn Zohr et l’EPH Hakim Okbi.

✿ Pendant le 1^{er} prélèvement, les valeurs les plus élevées ont été enregistrées dans l’EPH Ibn Zohr : 5.4×10^4 UFC/ml à 22 °C et 6.4×10^4 UFC/ml à 37 °C dans le service d’anatomopathologie et la cuisine respectivement. Les valeurs minimales enregistrée dans le même hôpital ont été de l’ordre : 1.5×10^2 UFC/ml à 22 °C et 1.1×10^2 UFC/ml à 37 °C dénombrée dans le service infectieux et le laboratoire de bactériologie respectivement (Fig.35 et 36).

♣ Durant le 2^{ème} prélèvement, pour le dénombrement des germes totaux à 22 °C, les valeurs les plus élevées ont été enregistrées dans l'EPH El Hakim Okbi avec 6.0×10^4 UFC/ml dans le service de médecine générale. La valeur minimale est de 2.0×10^2 UFC/ml dénombrée dans l'EPH Ibn Zohr dans la cuisine. Pour le dénombrement des germes totaux à 37 °C, les valeurs les plus élevées et les plus faibles ont été enregistrées dans l'EPH El Hakim Okbi avec 6.4×10^4 UFC/ml et 1.5×10^2 UFC/ml au niveau de la médecine générale et l'ophtalmologie respectivement (**Fig. 37 et 38**).

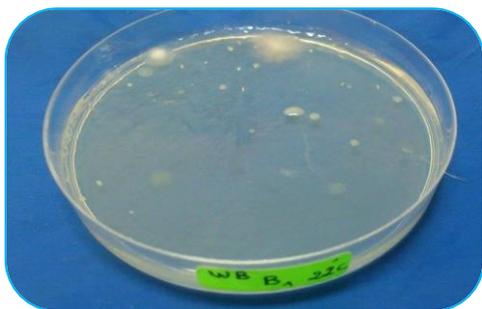


Figure 35: germes totaux à 22°C
Par incorporation sur milieu solide



Figure 36 : germes totaux à 37°C
Par incorporation sur milieu solide

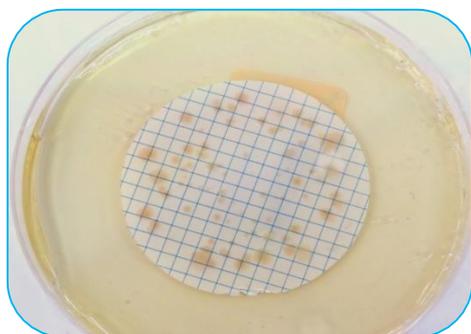


Figure 37 : germes totaux à 22°C
Par filtration sur membrane

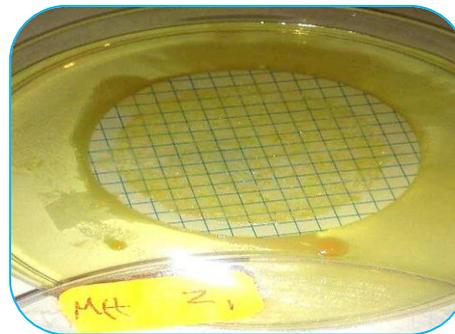


Figure 38 : germes totaux à 37°C
Par filtration sur membrane

C'est à dire les grandes valeurs de P1 ont été enregistrées à l'EPH Ibn Zohr et celles de P2 à l'EPH El Hakim Okbi. D'une façon générale tous les taux mesurés pendant toute la période de l'étude sont supérieures aux normes admissibles.

2.2. Recherche et dénombrement des germes indicateurs de contamination fécale :

Le dénombrement des bactéries indicatrices de contamination fécale reste la seule approche opérationnelle de contrôle de la qualité microbiologique des eaux (**Camille et al., 2003**).

2.2.1. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et coliformes fécaux :

La présence de bactéries coliformes dans un milieu signifie forcément une contamination fécale (**Camille et al., 2003**).

♣ Coliformes totaux :

La variation du nombre des bactéries dans les différents sites de prélèvement situés dans les différents services hospitalier sont illustrés dans le tableau **25** et les figures ci dessous.

Tableau 25: Variations de coliformes totaux dans l'eau à l'EPH Ibn Zohr et à l'EPH Hakim Okbi(CT/ml).

Services		P1	P2
EPH Ibn zohr	Pneumologie	200	1000
	Bactériologie	2100	1580
	Hémodialyse	2100	1152
	Cuisine	4300	130
	Anatomopathologie	430	400
	Infectieux	2800	680
EPH Hakim Okbi	Urgences	1200	800
	Accouchement	1400	156
	Médecine	1500	532
	Chirurgie	1100	656
	Ophtalmologie	300	412

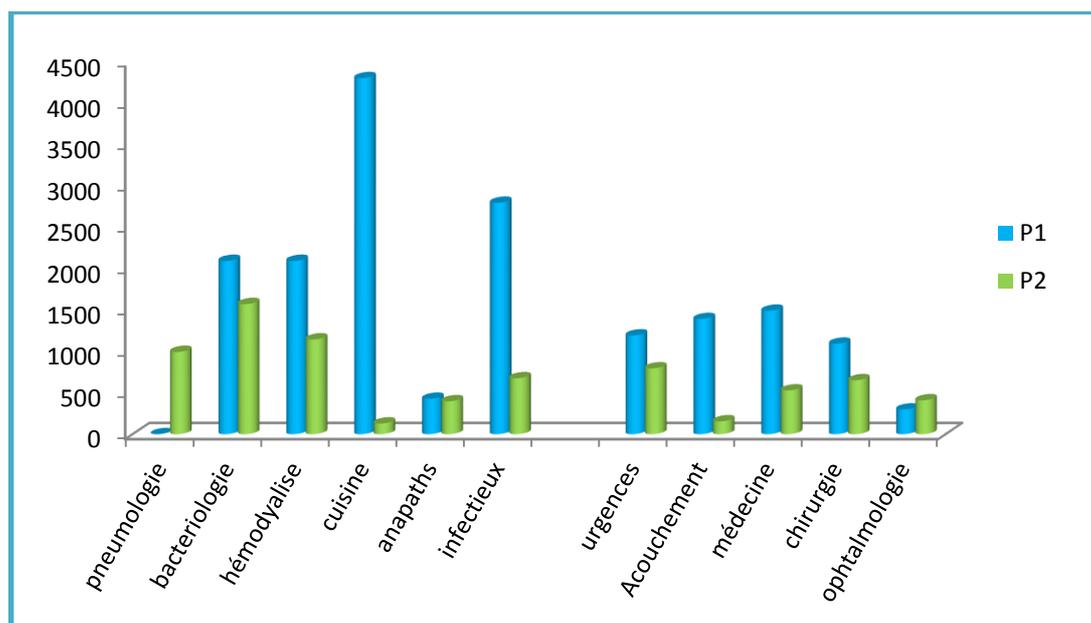


Figure 39 : Variations de coliformes totaux dans l'eau à l'EPH Ibn Zohr et l'EPH Hakim Okbi

♣ Durant le 1^{er} prélèvement, les valeurs les plus élevées sont enregistrées dans l'EPH Ibn Zohr (cuisine) avec 4.3×10^3 CT/ml. La valeur minimale est de 3.0×10^2 CT/ml dénombrée dans le service ophtalmologie à l'EPH El Hakim Okbi (**Fig. 40**).

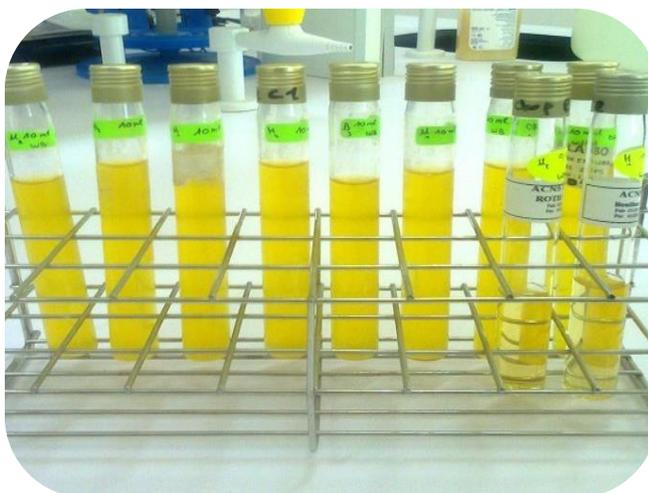


Figure 40 : Dénombrement des coliformes totaux par la méthode de NPP (Mars 2015).

♣ Durant le 2^{ème} prélèvement, Les valeurs les plus élevées sont enregistrées dans l'EPH Ibn Zohr (bactériologie) avec 1.58×10^3 CT/ml. La valeur minimale est de 3.0×10^2 CT/ml dénombrée dans le service ophtalmologie à l'EPH El Hakim Okbi (**Fig. 41**).



Figure 41 : Dénombrement des coliformes totaux par la méthode de filtration sur membrane (Avril 2015).

♣ **Coliformes fécaux :**

Les résultats du dénombrement des coliformes fécaux sont résumés dans les figures et le tableau ci- dessous.

Tableau 26 : Variations de coliformes fécaux dans l'eau à l'EPH Ibn Zohr et à l'EPH Hakim Okbi(CF/ml).

Services		p1	p2
EPH Ibn zohr	Pneumologie	1500	55
	Bactériologie	700	6
	Hémodialyse	2100	20
	Cuisine	290	104
	Anatomopathologie	0	160
	Infectieux	0	228
EPH Hakim okbi	Urgences	640	35
	Accouchement	900	37
	Médecine	0	135
	Chirurgie	0	124
	Ophtalmologie	0	140

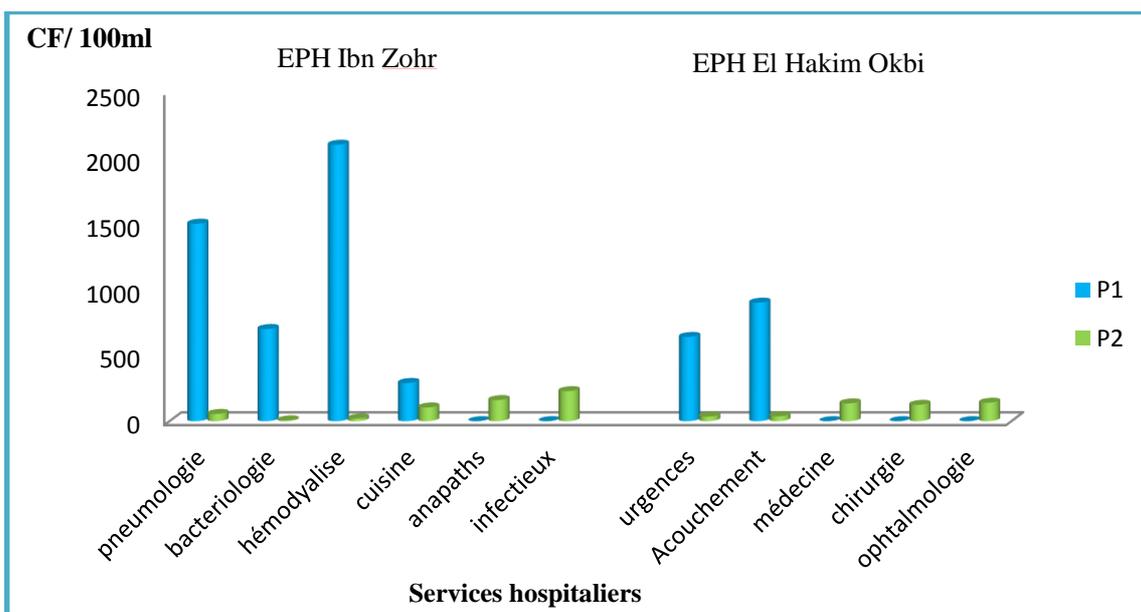


Figure 42 : Variations de coliformes fécaux dans l'eau à l'EPH Ibn Zohr et l'EPH Hakim Okbi.

♣ D'après le graphique d'évaluation du nombre des coliformes fécaux, on observe que durant le 1^{er} prélèvement, la valeur maximale est de 2.1×10^3 CF/ml notée dans le service d'hémodialyse à l'EPH El Hakim Okbi tandis que la valeur minimal égale à 0.0 CT/ml observée dans la plupart des autres services (Fig. 44 et 45).



Figure 43 : coliformes fécaux résultats positifs de test confirmatif de la méthode de NPP



Figure 44 : résultats positif à droite et résultat négatif à gauche

♣ Durant le 2^{ème} prélèvement, on observe que 6.0 CF/ml notée dans le laboratoire de bactériologie à l'EPH Ibn Zohr, tandis que la valeur maximale égale à 1.4×10 CT/ml observée dans le service ophtalmologie à l'EPH El Hakim Okbi (Fig. 45).

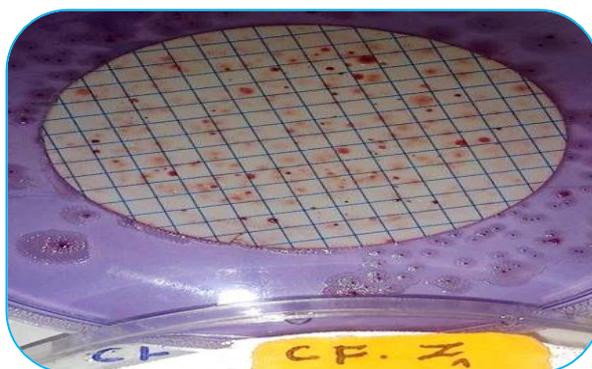


Figure 45 : Dénombrement des coliformes fécaux par la méthode de filtration sur membrane (Avril 2015).

2.2.2. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux :

Les streptocoques fécaux sont des excellents indicateurs de contaminations récentes par la matière fécale des animaux (**Rodier, 1996**). Les résultats de dénombrement de ces derniers sont présentés dans et le tableau 27 et la figures ci dessous.

Tableau 27 : Variations de streptocoques fécaux dans l'eau à l'EPH Ibn Zohr et à l'EPH Hakim Okbi (SF/ml).

Services	P1	P2
Pneumologie	1100	0
Bactériologie	2800	0
Hémodialyse	1500	0
Cuisine	700	3400
Anatomopathologie	1100	4500
Infectieux	12000	4000
Urgences	46000	0
Accouchement	7500	3000
Médecine	9300	0
Chirurgie	1500	0
Ophthalmologie	700	0

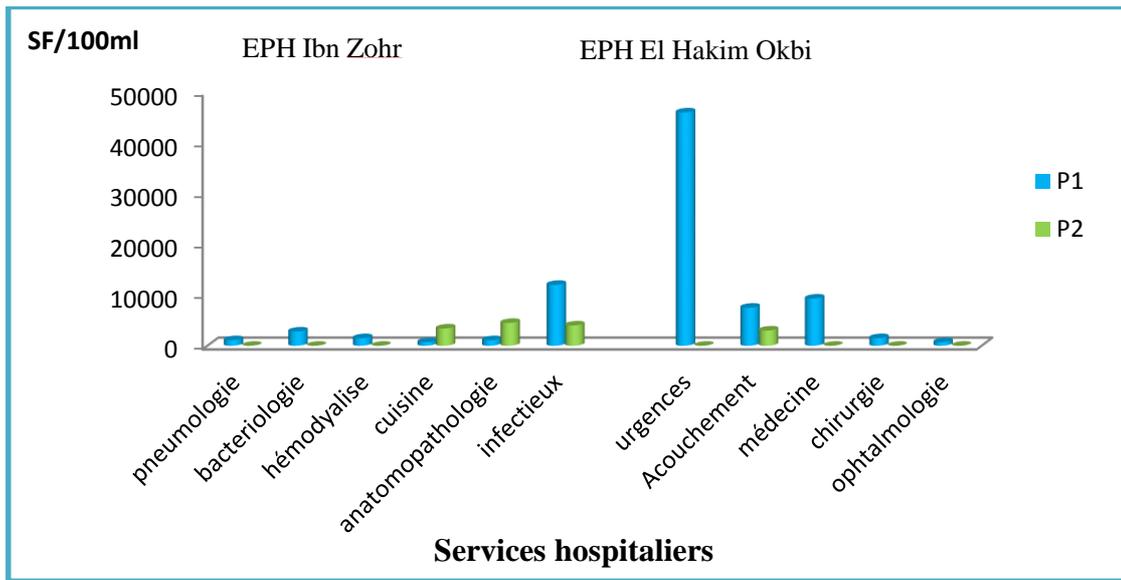


Figure 46 : Variations de streptocoques fécaux dans l'eau à l'EPH Ibn Zohr et l'EPH Hakim Okbi

♣ Durant le 1^{er} prélèvement, la valeur maximale enregistrée à l'EPH El Hakim Okbi est de 4.6×10^3 SF/ml dans les urgences. La valeur minimale est de 7.0×10^2 SF/ml dénombrée dans le service d'ophtalmologie du même hôpital et dans la cuisine de l'EPH Ibn Zohr (Fig.47).



Figure 47 : Dénombrement des streptocoques fécaux par la méthode de NPP (Avril 2015).

♣ Durant le 2^{ème} prélèvement, la valeur maximale enregistrée à l'EPH Ibn Zohr est de 4.5×10^3 SF/ml dans l'anatomo-pathologie, tandis que la valeur minimale est de 3.0×10^3 SF/ml dénombrée dans la salle d'accouchement de l'EPH El Hakim Okbi. Une absence totale des streptocoques fécaux a été notée dans les autres services (Fig. 48).

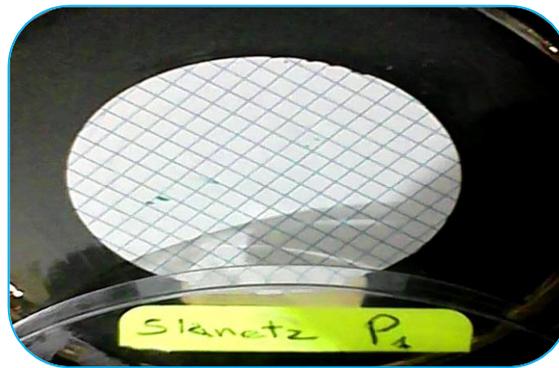


Figure 48 : Recherche des Streptocoques fécaux par la méthode de filtration sur membrane (Avril 2015).

Dans le but de pratiquer et contrôler le diagnostic bactériologique, à partir d'un tube Litsky positif on a effectué un simple examen microscopique (coloration de Gram) qui a fait apparaître des cocci à Gram positif en courtes chaînettes. (Fig. 50)



Figure 49 : Cocci à Gram positif en courtes chaînettes (Grossissement $\times 100$).

2.2.3. Recherche et dénombrement des spores des bactéries anaérobies sulfite-réducteurs (ASR) :

Une absence totale de ces bactéries a été marquée dans les deux prélèvements sauf durant le 1^{er} prélèvement 2 ASR/20 ml ont été enregistrés dans le service d'accouchement (Fig. 50 et 51).

Tableau 28 : Dénombrement des spores des bactéries anaérobies sulfito-réducteurs (ASR/20 ml) dans l'eau à l'EPH Ibn Zohr et l'EPH El Hakim Okbi

Services	p1	p2
Pneumologie	0	0
Bactériologie	0	0
Hémodialyse	0	0
Cuisine	0	0
Anatomopathologie	0	0
Infectieux	0	0
Urgences	0	0
Accouchement	0	2
Médecine	0	0
Chirurgie	0	0
Ophtalmologie	0	0

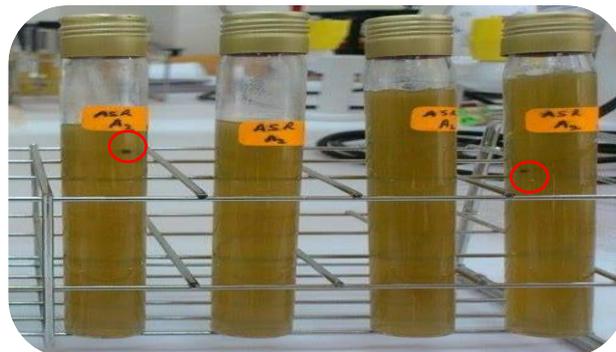


Figure 50 : Dénombrement des spores des bactéries anaérobies sulfito-réducteurs.



Figure 51 : Observation microscopique des formes sporulantes (entourées par un cercle rouge) et végétatives des bactéries anaérobies sulfito-réducteurs (Grossissement $\times 100$).

Ces bactéries (émise dans les matières fécales sous forme de spores fortement résistantes) à la capacité de survivre dans l'environnement pendant des mois. Ce phénomène explique bien la survenue fréquente d'épidémies en milieu hospitalier et les récidives. (**Bellini et Federli, 2008**).

2.3. Identification des colonies bactériennes :

2.3.1. Caractères morphologiques et coloration de Gram :

Les résultats des indicateurs de contamination fécale sont confirmés par la présence d'une grande diversité microbienne. Ainsi pendant notre étude, nous avons isolé et identifié d'innombrables bactéries pathogènes qui peuvent être à l'origine des maladies à transmission hydrique. Ces bactéries sont souvent isolées avec des effectifs et des colonies assez importantes.

Le repiquage successif utilisé dans le seul but de purifier les souches nous a permis de distinguer les caractères de toutes les colonies sur leurs milieux préférentiels d'isolement.

Deux étapes primordiales ont été suivies durant la recherche des germes pathogènes : l'observation macroscopique et microscopique des colonies isolées et une identification biochimique par la galerie biochimique classique, les API systèmes, l'antibiogramme et autres tests. Les résultats sont résumés dans les tableaux et les figures ci-dessous, (**Annexe 08**).

Tableau 29 : Aspects macroscopiques et microscopiques des colonies bactériennes isolées dans l'eau des différents établissements de santé (EPH Ibn Zohr ; EPH Al Hakim Okbi)

Milieux de culture	Observation macroscopique	Observation microscopique
Hektoen	<ul style="list-style-type: none"> - Colonies petites, vertes, circulaires, bombées, lisses, opaques. (Fig. 52) - Colonies petites, bleu vertes à centre noir, circulaires à bords régulier, bombées, lisses, opaques. - Colonies grandes, jaunes saumon, irrégulières, plates, lisses, opaques. 	<ul style="list-style-type: none"> - Petits bacilles Gram négatif, isolés asporulés. - Petits bacilles Gram négatif, isolés, asporulés, mobiles. - Petits bacilles Gram négatif, isolés, asporulés.

	- Colonies moyennes, jaunes saumon, circulaires, bombées, lisses, opaques.	
SS	- Colonies petites, incolores, circulaires, bombées, lisses, transparentes. (Fig. 52) - Colonies moyennes, roses, circulaires, bombées, lisses, opaques. (Fig. 52) - Colonies petites, avec centre noir, circulaires, bombées, lisses. (Fig. 52)	- Petits bacilles Gram négatif, isolés, asporulés.
Mac Conkey	- Colonies petites, incolores, légèrement blanchâtre, circulaires, bombées, lisses, transparentes. - Rose élevée, lisse brillante, circulaire, 1mm à 2 mm de diamètre. (Fig. 52)	- Petits bacilles Gram négatif, isolés, asporulés.
GNAB	- Colonies petites, incolores, circulaires, bombées, lisses, transparentes. (Fig. 52)	- Bacilles droits Gram négatif, isolés, mobiles, asporulés.
Chapman	- Colonies petites, jaunes dorée, circulaires, bombées, lisses, translucides. - Colonies petites, jaunes, circulaires, bombées, lisses, translucides. - Colonies jaunes, lisses, rondes, bombées, très petites (moins de 1 mm de diamètre), translucides. - Colonies grandes de 3 mm de diamètre, jaunes, muqueuses, bords irréguliers, opaques.	- Cocci Gram positif groupés en amas sous forme de grappes de raisin, immobiles, asporulés. - Cocci Gram positif groupés en amas irrégulier, mobiles, asporulés. - Cocci Gram positif disposés en paires, en tétrades ou en amas irrégulier, asporulé. - Bacilles Gram positif, longs, à bouts arrondies, isolés ou groupés en chaîne présentant l'aspect en « canne de bambou », asporulés.

Cétrimide	<ul style="list-style-type: none"> - Colonies petites, incolores, circulaires, bombées, lisses, transparentes. - Colonies très petites, bleu – vertes, rondes, convexes, lisses et translucides. 	<ul style="list-style-type: none"> - Bacilles droits Gram négatif, isolés, mobiles, asporulés. - Bacilles Gram négatif, fins, droits, isolés ou groupés par diplobacilles ou en courtes chaînes, mobiles, asporulés.
------------------	--	--

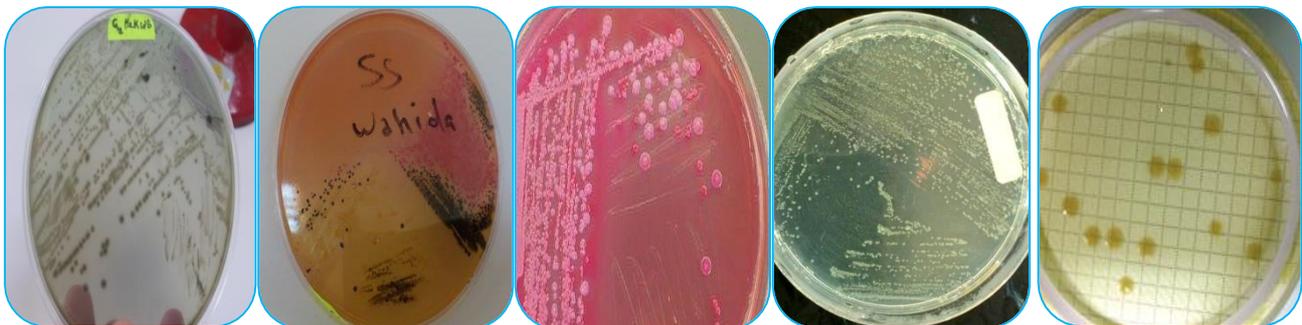


Figure 52: Aspect des colonies sur gélose Hektoen, gélose SS, gélose Mac Conkey, gélose GNAB et gélose Cetrimide (respectivement de gauche à droite).

2.3.2. Résultats de l'identification biochimique :

♣ Isolement de *Staphylococcus* :

L'aspect macroscopique des colonies isolées sur gélose Chapman ainsi que la coloration de Gram sont présentés dans les figures suivantes.



Figure 53 : Aspect des colonies sur gélose Chapman.

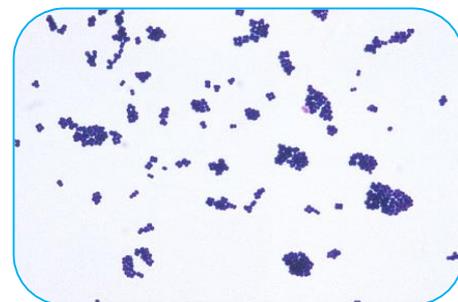
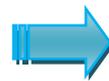


Figure 54 : Cocci à Gram positif en amas (Grossissement×100).

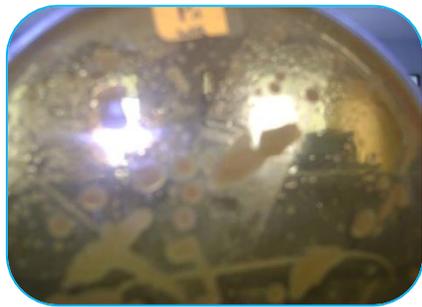


Figure 55 : Aspect des colonies sur gélose Chapman.

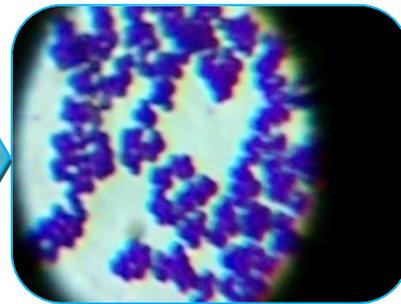


Figure 56 : Cocci à Gram positif en grappe de raisin (Grossissement $\times 100$).

L'identification de la bactérie repose sur la mise en évidence des caractères suivants : catalase, fermentation du mannitol et le staphylocoagulase (Tab. 33).

Tableau 30 : Résultats du profil biochimique des *Staphylococcus* isolés.

Oxydase	Catalase	Mannitol	mobilité	Staphylocoagulase (Fig. 57)	Espèces isolées
-	+	- (Fig 60)	-	-	<i>S. hominis</i>
-	+	+ (Fig 60)	-	-	<i>S. xylosus</i>



Figure 57: Test de staphylocoagulase négatif .

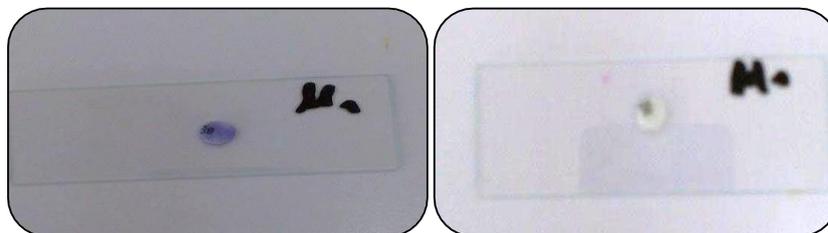


Figure 58: Test oxydase (positif à gauche, négatif à droite)

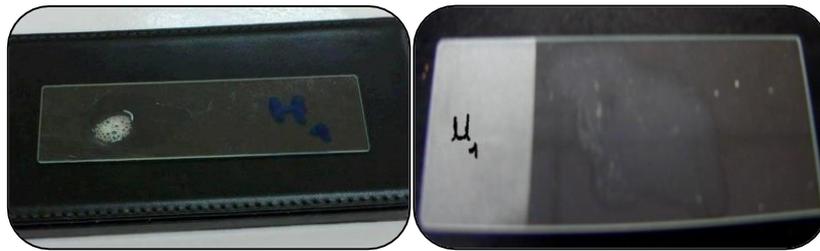


Figure 59: Test catalase (positif à gauche, négatif à droite)

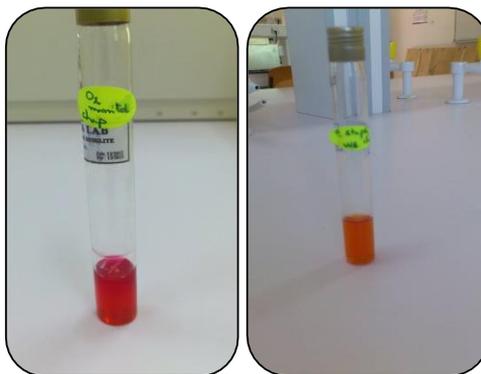


Figure 60 : Mannitol positif à droite et mannitol négatif à gauche.

Staphylococcus xylosus est mentionnée comme une espèce dominante dans les ateliers de fabrication. Certaines souches de *S. xylosus* sont capables de coloniser les surfaces en formant des biofilms. (Gregor et al., 2008)

♣ Isolement de *Micrococcus* :

Les microcoques se différencient des staphylocoques par un résultat positif pour le test oxydase.

La bactérie isolée est *Kocuria varians rosea*.

♣ Isolement de *Pseudomonas* :

Tableau 31 : Résultats du profil biochimique des *Pseudomonas* isolé :

Coloration de Gram	Oxydase	Pyocyanine et Pyoverdine	mannitol	espèce
bacilles à Gram négatif aux extrémités arrondies (Fig. 62)	+	(-) (-) Fig (63)	+	<i>Pseudomonas luteola</i>



Figure 61 : Aspect des colonies sur gélose Cétrimide.

Figure 62 : Bacilles à Gram négatif (Grossissement ×100).

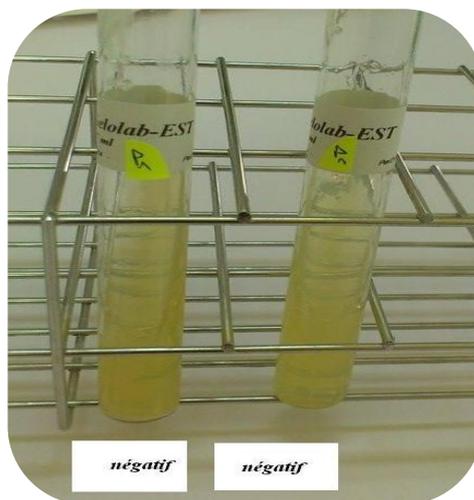


Figure 63: Résultat négatif de la recherche de la pyocyanine et de la pyoverdine dans les milieux King A et King B.

♣ **Isolement de *bacille a Gram positif* :**

Les colonies obtenues sur milieu de Chapman apparaissent grandes et muqueuses. (Fig. 64 et 65)



Figure 64: Aspect des colonies sur gélose Chapman.



Figure 65 : Bacilles à Gram positif (Grossissement $\times 100$).

La coloration de Gram montrant des bacilles à Gram positif asporulés. Donc ces colonies par manque de moyens, on n'a pas pu l'identifier.

♣ **Isolement de *Aerococcus* :**

Les colonies de *Aerococcus* obtenues sur gélose Slanetz (méthode de dénombrement par filtration sur membrane), elles apparaissent plus petites, isolées et presque invisibles. (Fig. 66). La démarche de l'identification est résumée dans le tableau ci-dessous.

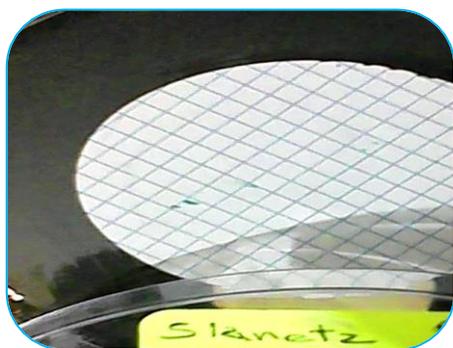


Figure 66 : Aspect des colonies sur membrane filtrante

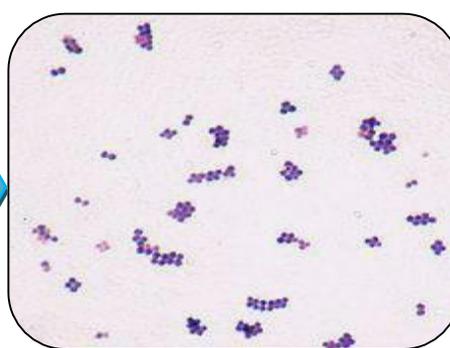


Figure 67 : Cocci à Gram positif en amas (Grossissement $\times 100$).

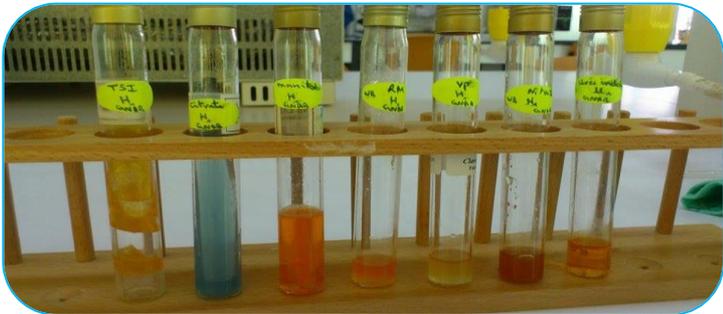
Tableau 32: Résultats du profil biochimique des *Aerococcus* isolés.

Coloration de Gram	Oxydase	Catalase	mannitol	mobilité	espèce
Coques à Gram positif, groupés en paires, tétrades et amas (Fig. 67)	+	-	(+)	(-)	<i>Aerococcus viridans</i>

2.3.3. Identification par la galerie biochimique classique :

Les espèces bactériennes identifiées par la galerie biochimique classique sont résumées dans le tableau et la figure ci-dessous.

Tableau 33: Les espèces identifiées par la galerie biochimique classique.

Milieu de culture	galeries biochimiques classiques
SS	 <p>Figure 68 : profil biochimique classique de <i>Escherichia coli</i></p>
SS	 <p>Figure 69 : profil biochimique classique de <i>Enterobacter aerogenes</i></p>

<p>SS</p>	 <p>Figure 70 : profil biochimique classique de <i>Enterobacter chloacae</i></p>
<p>SS</p>	 <p>Figure 71 : profil biochimique classique de <i>Citrobacter freundii</i></p>
<p>SS</p>	 <p>Figure 72 : profil biochimique classique de <i>Citrobacter brakii</i></p>

2.3.4. Identification par les API systèmes :

Les espèces bactériennes identifiées par les API systèmes sont résumées dans les tableaux et les figures ci-dessous.

Salmonelles, Shigelles, *Yersinia* et *Vibrio* n'ont été pas isolées (résultats négatifs).

Tableau 34 : Les espèces identifiées par l'API 20 E et l'API 20 NE, Api20 Strep, Api 20 Staph.

API système	Espèces bactériennes identifiées	Le code	Milieux de culture
API 20 E	<i>Escherichia coli 1</i> (Fig. 73)	5144572	SS
	<i>Aeromonas hydrophila</i> .	3246166	SS ,Hektoen, GNAB
	<i>Pseudomonas luteola</i> .	1004002	SS,Hektoen
	<i>Citrobacter braakii</i> . (Fig. 74)	3744573	SS
	<i>Serratia liquefaciens</i>	6216052	SS
	<i>Enterobacter chloasae</i> (Fig. 75)	330557	SS, Hektoen
	<i>Enterobacter sakazakii</i> (Fig. 76)	3345373	SS ,Hektoen, GNAB
API 20 NE	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Fig. 81)	0151452	Hektoen
	<i>Pseudomonas luteola</i> . (Fig. 80)	5477761	Cetrimide, Hektoen GNAB
	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i> (Fig. 79)	5167761	SS, Hektoen
	<i>Aeromonas hydrophila</i> (Fig. 77)	3577754	Hektoen ,GNAB
	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	0047741	Hektoen
Api Strep	<i>Aerococcus viridans</i>	6112711	Slanetz
	<i>Leuconostoc spp</i>	3246001	Slanetz
	<i>Lactococcus lactis premoris</i>	3020541	Slanetz
Api Staph	<i>Staphylococcus hominis</i> (Fig. 82)	6216112	Chapman
	<i>Staphylococcus xylosus</i> (Fig. 83)	6771753	Chapman
	<i>Kocuria varians/rosea</i> (Fig. 84)	610200	Chapman



Figure 73 : profil biochimique de *Escherichia coli 1*



Figure 74 : profil biochimique de *Citrobacter brakii*

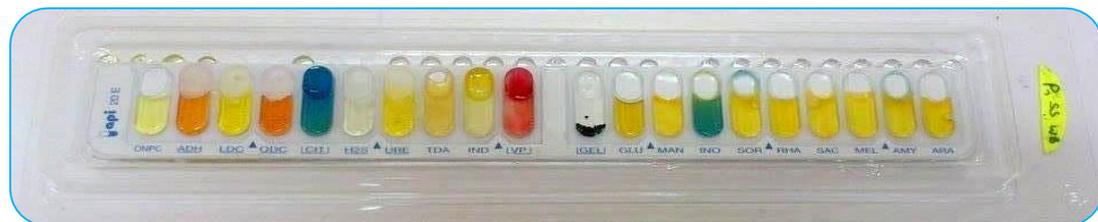


Figure 75 : profil biochimique de *Enterobacter chloasae*



Figure 76 : profil biochimique de *Enterobacter sakazakii*



Figure 77 : profil biochimique de *Aeromonas hydrophila*.



Figure 78 : profil biochimique de *Aeromonas hydrophila*.gr. 2



Figure 79 : profil biochimique de *Aeromonas hydrophila / caviae*

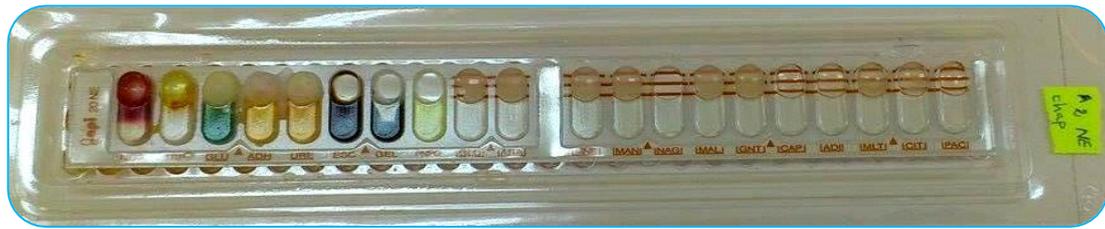


Figure 80 : profil biochimique de *Pseudomonas luteola*.

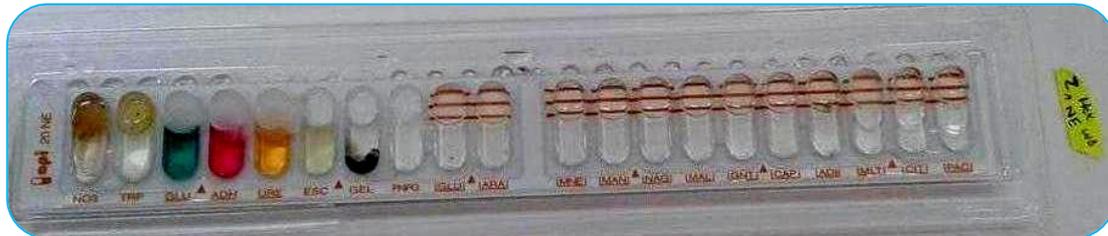


Figure 81 : profil biochimique de *Pseudomonas fluorescens*



Figure 82 : profil biochimique de *Staphylococcus hominis*



Figure 83 : profil biochimique de *Staphylococcus xylosus*



Figure 84: profil biochimique de *Kocuria varians/rosea*

2.3.5. Résultats de l'antibiogramme :

Tableau 35: résistances et sensibilités aux antibiotiques des *Entérobactéries* :

Espèce bactérien	Antibiotiques avec leur charge des disques en (µg) et le diamètre Ø de zone inhibition en (mm)							
	AMX (25)	FO (200)	CL (25)	AK (30)	C (30)	CZ (30)	GEN (10)	CX (30)
<i>Escherichia coli 1</i>	16	30	10	14	19	16	15	18
Catégorie clinique	I	S	R	R	S	R	S	S
<i>Citrobacter braakii</i>	18	37	17	24	32	17	24	10
Catégorie clinique	S	S	I	S	S	I	S	R
<i>Serratia liquefaciens</i>	14	35	12	25	30	32	50	30
Catégorie clinique	I	S	R	S	S	S	S	S
<i>Enterobacter chloasae</i>	08	29	13	21	23	08	18	00
Catégorie clinique	R	S	I	S	S	R	S	R
<i>Enterobacter sakazakii</i>	09	31	13	21	28	09	19	07
Catégorie clinique	R	S	R	S	S	R	S	S
<i>Enterobacter sakazakii</i>	08	24	12	17	23	00	18	00
Catégorie clinique	R	S	R	S	S	R	S	S
<i>Enterobacter aerogenes</i>	14	21	14	20	36	00	19	00
Catégorie clinique	I	S	I	S	S	R	S	R

R : résistante I : intermédiaire S : sensible

Tableau 36: résistances et sensibilités aux antibiotiques des non *Entérobactéries* (NE)

Espèce bactérien	Antibiotiques avec leur charge des disques en (μg) et le diamètre \emptyset de zone inhibition en (mm)							
	AMX (25)	FO (200)	CL (25)	AK (30)	C (30)	CZ (30)	GEN (10)	CX (30)
<i>Burkholderia cepacia</i>	07	27	10	14	19	16	15	18
Catégorie clinique	R	S	R	S	S	R	S	R
<i>Aeromonas hydrophila</i>	00	27	16	26	35	00	22	00
Catégorie clinique	R	S	I	S	S	R	S	R

R : résistante I : intermédiaire S : sensible

Tableau 37: résistances et sensibilités aux antibiotiques des *Staphylococcus*.

Espèce bactérien	Antibiotiques avec leur charge des disques (μg) et le diamètre \emptyset de zone inhibition en (mm)							
	P (10)	CL (25)	AK (30)	C (30)	E (15)	GEN (10)	TE (30)	K (30)
<i>Staphylococcus hominis</i>	11	22	28	26	32	27	40	25
Catégorie clinique	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus xylosus</i>	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30
Catégorie clinique	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Kocuria varians/rosea</i>	00	17	26	32	09	22	25	22
Catégorie clinique	R	S	S	S	R	S	S	S

R : résistante I : intermédiaire S : sensible

Tableau 38: résistances et sensibilités aux antibiotiques des *Pseudomonas* :

Espèce bactérien	Antibiotiques avec leur charge des disques (µg) et le diamètre Ø de zone inhibition en (mm)			
	FO (200)	CL (25)	AK (30)	GEN (10)
<i>Pseudomonas fluorescens/putida.</i>	28	11	17	16
Catégorie clinique	S	R	S	S
<i>Pseudomonas luteola</i>	25	16	25	22
Catégorie clinique	S	S	S	S

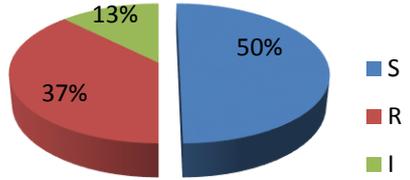
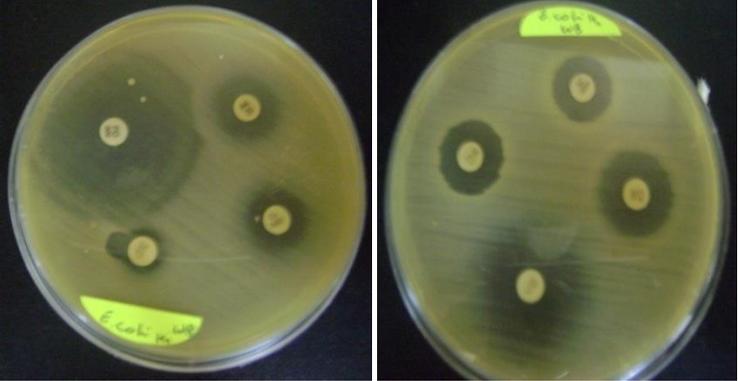
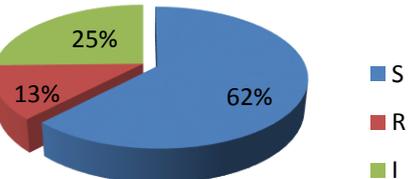
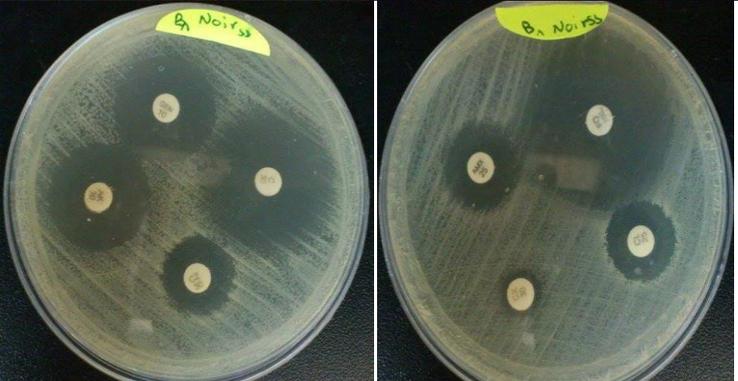
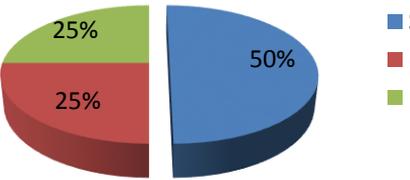
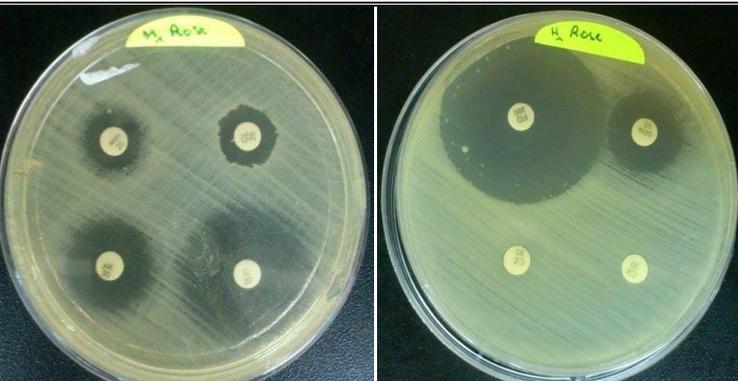
R : résistante I : intermédiaire S : sensible

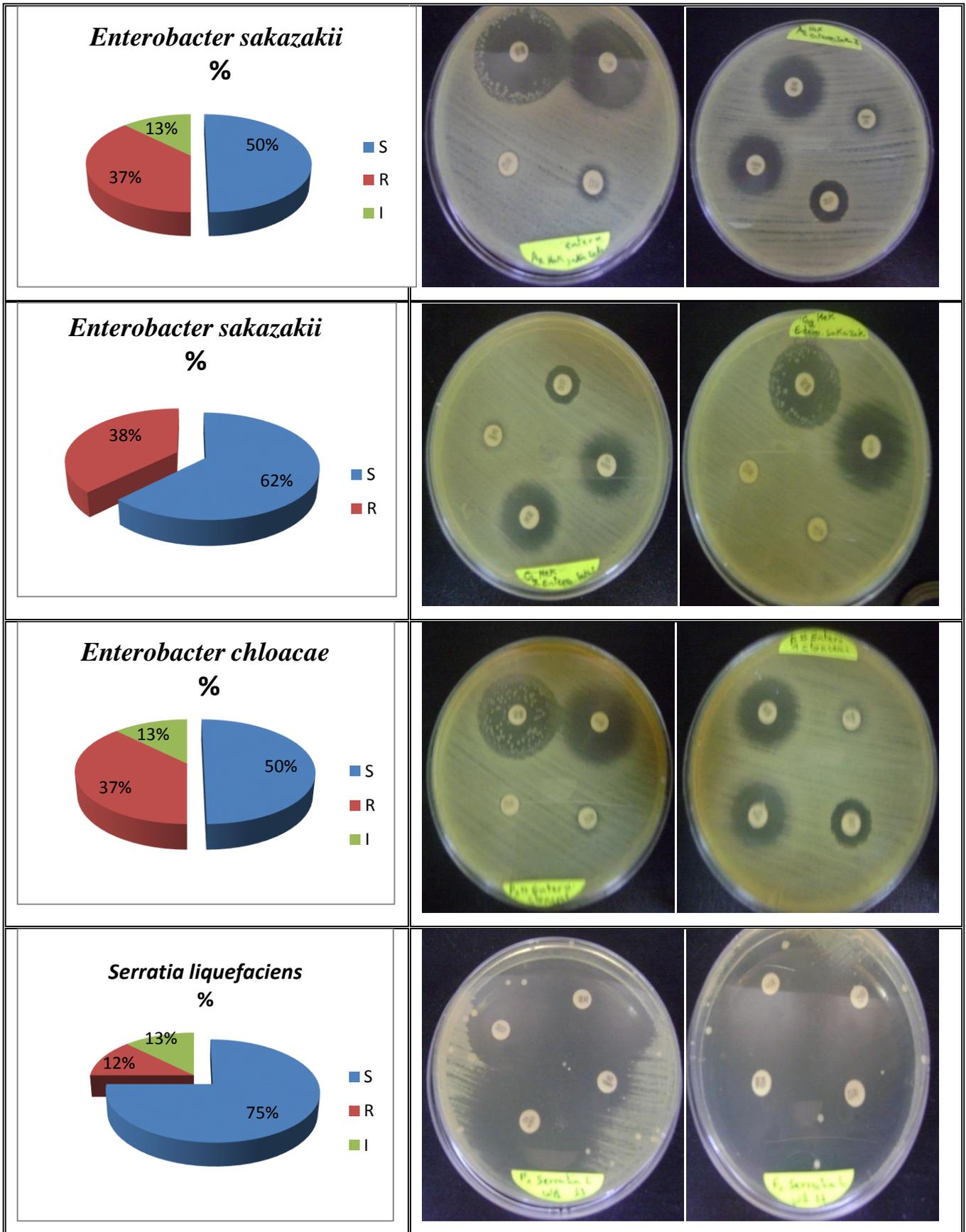
Tableau 39: résistances et sensibilités aux antibiotiques des Micrococcaceae,
Streptococcus, *Leuconostocaceae* :

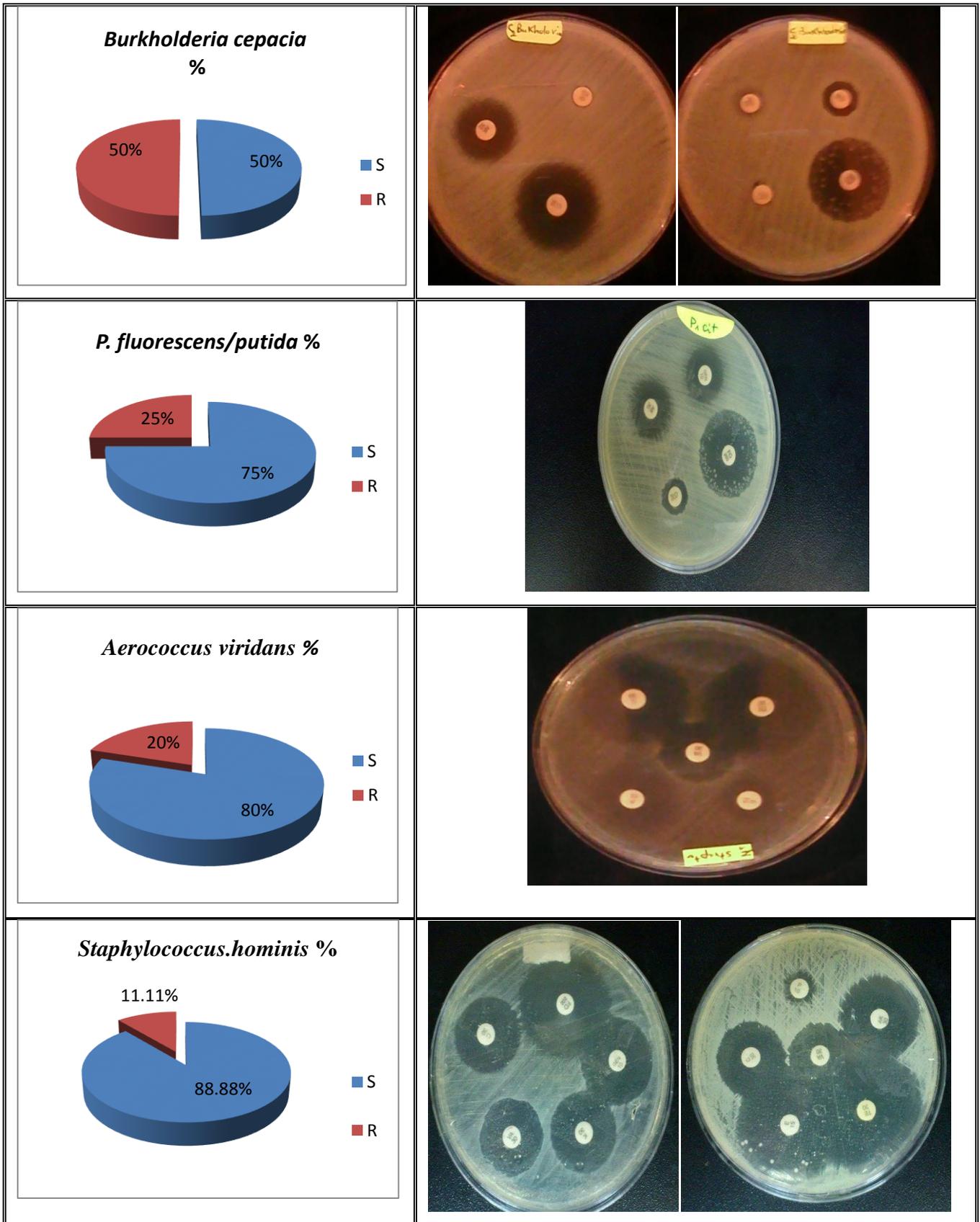
Espèce bactérien	Antibiotiques avec leur charge des disques (µg)				
	E (15)	C (30)	VA (30)	TE (30)	P (10)
<i>Aerococcus viridans.</i>	12	29	20	30	19
Catégorie clinique	S	R	S	S	S
<i>Leuconostoc spp.</i>	16	24	21	37	23
Catégorie clinique	S	S	S	S	S
<i>Lactococcus lactis ssp cremoris.</i>	20	30	21	37	24
Catégorie clinique	S	R	S	S	S

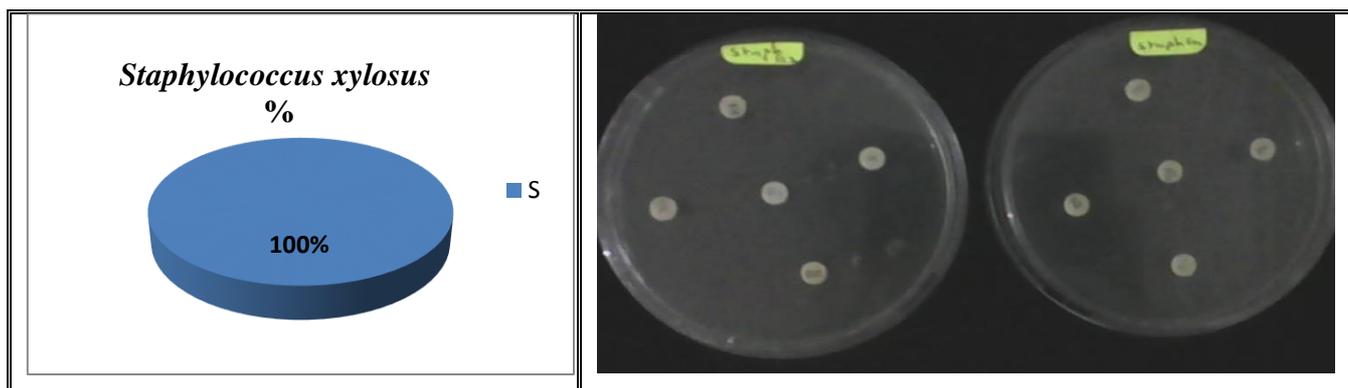
R : résistante I : intermédiaire S : sensible

Tableau 40: Taux de résistances et sensibilités des espèces étudiées et l'antibiogramme schématisé en boîtes

Taux de résistance %	Antibiogramme en boîtes	
<p><i>E.coli 1</i> %</p>  <p>■ S ■ R ■ I</p>		
<p><i>Citrobacter braakii</i> %</p>  <p>■ S ■ R ■ I</p>		
<p><i>Enterobacter aerogenes</i> %</p>  <p>■ S ■ R ■ I</p>		







2.3.6. Interprétation de l'antibiogramme :

- ❁ *Escherichia coli 1* : est -résistante avec 37% au Cefazoline (CZ), Amikacine (AK), et Colistine (CL).
- ❁ *Citrobacter braakii* : est -résistante avec 13% au Cefoxitine (CX).
- ❁ *Enterobacter aerogenes* : est -résistante avec 25% au Cefazoline (CZ), et Cefoxitine (CX).
- ❁ *Enterobacter sakazakii* : est -résistante avec 37% au Cefazoline (CZ), Colistine (CL), et Amoxycilline (AMX).
- ❁ *Enterobacter sakazakii* : est -résistante avec 38% au Cefazoline (CZ), Colistine (CL), et Amoxycilline (AMX).
- ❁ *Enterobacter chloasae* : est -résistante avec 37% au Cefazoline (CZ), Cefoxitine (CX), et Amoxycillin (AMX).
- ❁ *Serratia liquefaciens* : est -résistante avec 12% au Colistine (CL).
- ❁ *Burkholderia cepacia* : est -résistante avec 50 % Cefazoline (CZ), Colistine (CL), et Amoxycilline (AMX), et au Cefoxitine (CX).
- ❁ *Pseudomonas fluorescens/putida* : est -résistante avec 25% au Colistine (CL).
- ❁ *Aerococcus viridans* : est -résistante avec 20% au Chloromphenicol (C).
- ❁ *Staphylococcus hominis* : est -résistante avec 11.11% au Penicilline. G (P).
- ❁ *Staphylococcus xylosus* : est sensible à 100%

♣ Discussion :

En vue des moyens disponibles au laboratoire, nous nous sommes arrivés à identifier plusieurs espèces bactériennes appartenant à la famille des Entérobactéries et les bacilles à Gram négatif non fermentaires, des staphylocoques et des bacilles Gram positif qui peuvent présenter un intérêt médical et voir même être potentiellement pathogènes.

La majorité appartient à la famille des Entérobactéries, nous avons aussi isolé *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens/putida*, *Burkholderia cepacia*, et *Staphylococcus Streptococcus*.

Les *pseudomonas* sont des germes robustes qui poussent vite, ils sont donc difficiles à éradiquer dans les endroits contaminés, c'est-à-dire les chambres d'hôpital, les salles d'opération, et certains équipements médicaux comme les appareils d'assistance respiratoire. (*Moselio et al., 1993*)

Staphylococcus xylosus est mentionnée comme une espèce dominante dans les ateliers de fabrication. Certaines souches de *S. xylosus* sont capables de coloniser les surfaces en formant des biofilms. (*Gregor et al., 2008*)

D'autre part la contamination du réseau intra-hospitalier est survenue surtout suite à l'accumulation des bactéries provenant des patients et des personnels soignants dans les siphons, ces derniers constituent ainsi un réservoir puissant pour une contamination massive de l'eau du robinet par voie rétrograde. La multiplicité des réservoirs de contamination contribue à l'évolution de la qualité de l'eau à l'intérieure des réseaux de distribution des établissements de santé, alors l'eau qui transite dans les conduites présente des flores microbiennes extrêmement diversifiées.

Ces résultats nous ont permis de déduire que le réseau d'eau intra-hospitalier est continuellement exposé à un flux entrant de microorganismes provenant de l'usine de traitement en cas d'insuffisance de traitement, d'incidents (réparation, cassure) ou d'entretien inadéquat du réseau, Les ballons d'accumulation qui contiennent des tranches d'eau à différentes températures, Les plaques de tartre déposées sur les parois des réseaux, robinets, poignets dans les tuyaux, charge organique de l'eau entrante, Nature, âge et état des matériaux (Plomb, Cuivre), vitesse de circulation faible. Cette contamination est entretenue et amplifiée

par le développement de biofilm qui constitue donc un réservoir primaire pour une contamination permanente du système.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques par la méthode de Kirby-Bauer (diffusion sur Milieu solide) a révélé que 60 % des souches isolées sont résistante, nommée la résistance acquise qui due à l'acquisition d'un mécanisme de résistance pour une souche d'une espèce habituellement sensible.

Conclusion

Dans les établissements de santé la qualité de l'eau de robinet est susceptible de se dégrader à tout moment entre l'usine de traitement et les points d'usages au niveau des services hospitaliers, plusieurs causes sont à l'origine de cette dégradation tels que : la concentration en chlore libre, le développement de biofilm, la stagnation de l'eau ; l'état de l'entretien des bache à eau, des réservoirs et des canalisation, la température ainsi que la turbidité, la présence de différents bactéries identifiées dans l'eau des établissements de santé ne sont pas admissible, on raison de son caractère pathogène opportuniste qui représente une menace en particulier aux individus immunodéficients, de sa résistance à nombreux antibiotiques et de la difficulté à éliminer la plupart de ces bactéries lorsque elles colonisent des réseaux ou d'autres installations.

Notre contribution dans la recherche et le dénombrement des germes dans l'eau de robinet prélevé des différents services ciblés au niveau des deux centres hospitaliers de la ville de Guelma à révélé la présence de bactéries dans tous les échantillons d'eaux analysés et en quantité variable, d'un établissement à l'autre et au sein d'un même établissement, en fonctions des services, des patients(sains, colonisés, infectés), des soins et des techniques pratiquées, ainsi les bactéries étant présentes dans le réseau sous forme de biofilm, la quantité échantillonnée dans un prélèvement à l'autre, en fonction du prélèvement à l'autre, en fonction du détachement ou non d'une partie du biofilm au moment du prélèvements.

Notons que les caractéristiques physico-chimiques peuvent influencer la qualité de l'eau à l'intérieur des réseaux et selon nos résultats nous avons remarqué dans la majorité des échantillons analysés l'élévation de la turbidité accompagné la diminution de la concentration en chlore libre, conduisant ainsi à l'augmentation du nombre d'unités formants colonies par 10ml (UFC/100ml). La chute du taux de chlore traduit donc leur consommation par les matières organiques.

L'étude de la sensibilité des souches collectées aux antibiotiques à montré la présence des souches résistances vis-à-vis de quelque antibiotiques majeurs ces souches résistantes qui pourraient faire une résistance acquise.

Résumé

Le réseau d'eau de robinet en milieu hospitalier peut être un réservoir de bactéries pathogènes susceptibles de provoquer des infections nosocomiales chez des patients à risque en particulier les patients immunodéprimés à cause de bactéries qui ont la capacité de produire un biofilm à l'intérieur des canalisations lui confère une résistance aux désinfectants.

Afin de déterminer la qualité de l'eau de deux établissements de santé qui sont l'EPH Ibn Zohr, et l'EPH Al Hakim Okbi de la wilaya de Guelma, nous avons réalisés pendant les mois de Mars et Avril le suivie de leur qualité microbiologique.

Les analyses physico-chimiques nous a montrés que l'eau de robinet de ses services hospitaliers sont dans les normes.

Les résultats des analyses bactériologiques nous exposent une contamination fécale des différents réseaux d'eaux avec une charge bactérienne plus élevé et qui dépasse énormément les normes dans les différents centres hospitaliers et surtout dans l'EPH de Ibn Zohr notée par une forte pollution bactériologique signalée par la présence d'un degré élevé en germes totaux, coliformes totaux, coliformes fécaux et en streptocoques fécaux. Par ailleurs, les tests d'identification, aux quels l'ensemble des souches étaient soumises, ont permis d'identifier les genres suivants: *Escherichia*, *Enterobacter* *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *leuconostoc*, et *Aeoromonas*, *Streptococcus*, qui peuvent être responsables de maladies graves. Ces tests nous permettent aussi d'estimer la proportion de bactéries Gram positif et négatif (70 % de bactéries Gram négatif et 30% de bactéries Gram positif).

Enfin, L'étude de sensibilité aux antibiotiques nous montre que 60 % des espèces isolées ont fait une résistance acquise particulièrement à l'Amoxiciline (AMX), Cefazoline (CZ), Colistine (CL), et Céfoxitine (CX) mais sont sensibles à Chloramphénicol (C), Fosfomycine (FO), et Gentamicine (GEN).

Mots clés: eau de robinet, milieu hospitalier, dénombrement, évaluation du risque infectieux, biofilm, bactéries pathogènes, résistance acquise, antibiotique.

Summary

In the hospital's environment, the tap water system could be a source of dangerous infection due to microbial contamination particularly for immunocompromised patients because of bacteria which have the ability to produce a biofilm within the piping confers resistance to disinfectants.

To determine the quality of water of two health establishments which are : EHP Ibn Zohr and EHP Al Hakim Okbi in the wilaya of Guelma, we have realized during the months of March and April followed by the microbiological quality.

The physico-chemical analyzes showed us that the tap water of these hospital services are in the standards.

The results of bacteriological analyzes expose us fecal contamination of different water systems with a higher bacterial load, which greatly exceeds the standards in different hospitals and especially in the EPH Ibn Zohr denoted by high bacterial pollution reported by the presence of high levels of total bacteria, total coliforms, faecal coliforms and faecal streptococci. Further more, identification tests, which all strains were submitted, have identified the following genera: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Micrococcus* *Aeromonas*, *Streptococcus* which may be responsible for serious diseases. These tests also allow us to estimate the proportion of Gram positive and negative bacteria (70% Gram-negative bacteria and 30% of Gram-positif bacteria).

Finally, the study of antibiotic susceptibility shows that 60% of isolated species have acquired resistance particularly amoxicillin (AMX), Cefazolin (CZ), colistin (CL), and Cefoxitin (CX) but are sensitive to chloramphenicol (C) Fosfomycin (FO) and Gentamicin (GEN).

Keywords: tap water, hospital, counting, evaluation of the risk of infection, biofilm, pathogenic bacteria, acquired resistance, antibiotic.

الملخص

إن شبكة مياه الصنبور داخل المحيط الإستشفائي يمكن أن تكون منبعاً لعدوى خطيرة خاصة للمرضى ذوي الجهاز المناعي الضعيف و هذا راجع إلى تلوثها البكتيري بسبب البكتيريا التي لديها القدرة على إنتاج بيوفيلم داخل الأنابيب و الذي يمنحها المقاومة للمطهرات.

لتحديد نوعية المياه في المؤسسات الإستشفائية الأتية : ”مستشفى ابن زهر” و”مستشفى الحكيم عقبي” بولاية قالمة، حققنا خلال شهري مارس وأفريل المتابعة النوعية الميكروبيولوجية لهذه المياه.

أظهرت لنا التحاليل الفيزيائية والكيميائية أن مياه الصنبور لهذه المؤسسات الإستشفائية في المعايير.

نتائج التحاليل البكتيرية تعرض لنا تلوث برازي لمختلف مياه الصنبور و بنسبة عالية و التي تجاوزت المعايير في مختلف المصالح الإستشفائية خاصة مستشفى ابن زهر التي تدل على تلوث البكتيري بنسبة عالية أفادت عن وجود مستويات عالية من مجموع البكتيريا، ومجموع القولونيات، بكتيريا القولون البرازية والعقديات البرازية. وبالإضافة إلى ذلك، اختبارات تحديد الهوية التي قدمت مختلف السلالات، وحددت أجناسها و التي قد تكون مسؤولة عن أمراض خطيرة هذه الاختبارات تسمح لنا أيضا بتقدير نسبة البكتيريا ذات Gram الموجبة والسالبة (70% البكتيريا Gram سالب و 30% من البكتيريا Gram موجب)

وأخيرا، تبين دراسة القابلية للمضادات الحيوية أن 60% من الأنواع المعزولة اكتسبت المقاومة خاصة ل : أموكسيسيلين (AMX)، سيفازولين (CZ)، كوليستين (CL)، سيفوكسيتين (CX) ولكن حساسة ل الكلورامفينيكول (C) فوسفوميسين (FO) والجنتاميسين (GEN).

الكلمات المفتاحية :

مياه الصنبور، المحيط الإستشفائي، تعداد، تقييم مخاطر العدوى. بيوفيلم، البكتيريا المسببة للأمراض، مضاد حيوي، المقاومة المكتسبة.

Bibliographie

Ait Hamlet S., (1998). Contribution à l'étude de la qualité de huites Oueds de la wilaya d'El Taref: aspects microbiologiques et écologiques. Mémoire de Magister en microbiologie appliquée. Université d'Annaba. Algérie. p150

Amino A. et Chaussied M., (1983). Manuel des analyses chimiques en milieu marin. *C.N.E.X.O.FRANCE*. 395p.

Amos M. A, (2003). Le danger *Yersinia enterocolitica*. Mémoire de Doctorat. École Nationale Vétérinaire d'Alfort. La faculté de médecine de Creteil. France.121 p.

Annie et Guyader, (1999). Recommandations pour les contrôles d'environnement dans les établissements de santé , C.CLIN-Ouest Octobre 1999.

Avril J.L, Fauchere J.L, (2007). Cours de bactériologie DCM 1, Faculté de médecine de nantes, p : 36.

anonyme, (2009). Système d'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux , 07468K - fr - 2009/11 .

anonyme, (2011). Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale, médecine humaine et vétérinaire, Document édité avec la collaboration de l'OMS ,6eme édition ..

Aouissi A., (2009) .*Microbiologie et physico-chimie de l'eau des puis et des sources de la région de Guelma (Nord-Est de l'Algérie)*. Mémoire de Magister. Université 8 Mai 1945 de Guelma.132p.

Bachelot R., (2003). Légionellose compléments d'information au plan gouvernemental de prévention des légionellose, les services du MEDD (DPPR) avec ceux ministère chargé de la santé (DGS) ; page : 02.

Becker, A et Lebas, M, L'eau à l'hôpital 1988; 475-506.

- Bellini, C. et Federli I, (2008).** « *Clostridium difficile* : Aspects Cliniques et Mesures pratiques des isolements » [archive] CHUV, Suisse, 2008.
- Berche P., Gaillard J.L. et Simouet M. (1988).** Bactériologie, les bactéries des infections humaines. Flammarion Médecine Sciences. France. 660 p.
- Boring, J.R., Martin W.T. et Elliott L.M. (1971).** Isolation of *Salmonella typhimurium* from municipal water, Riverside, California, 1965. Am. J. Epidemiol., 93 : 49-54.
- Bouchaala L., (2010).** Contribution à l'étude de la qualité microbiologique et physicochimique de l'eau de l'Oued-Zénati(Guelma).Mémoire de Magister.Université 8 Mai 1945 de Guelma.135.
- Boukrouma N., (2008).** Contribution à l'étude de la qualité microbiologique de l'eau d'un écosystème aquatique artificiel: cas de la retenue collinaire d'Ain Fakroune (W. d'Oum El-Bouaghi). Mémoire de Magister. Université 8 mai 1945, Guelma. 64p
- Boulangier S, Deschamps F ; (2007).** Les 100 principales maladies professionnelles et environnementales, Ellipses Edition Marketing S.A, Paris, page : 117.
- Bourdon J.L. et Marchal N. (1981).** Technique bactériologique. *DOIN*.335p.
- Bourgeois C. M. et Leveau J. Y., (1980).** Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaire. T3. *Apria*, 331p.
- Camille D., (2003).** Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux. Réglementation, prélèvements, analyses. *Tec et Doc* 156 p.
- Carbannelle D et al., (1988).** Bactériologie médicale techniques usuelles. Méd. Mal. Inf. France. 251 p.
- Cardinaels J., (2014).** Maladies professionnelles : pathologies et causes. Wolters Kluwer Belguin SAWterloo Office Park.61P
- Castex J. et Dab w.,(2005).** L'eau dans les établissements de santé.
- Catrine Q., (1998),** contrôle microbiologie en hygiène hospitalier conseils pratique.

Cavallo J. D., Fabre R., (2004). *Pseudomonas aeruginosa*. In Maîtrise des infections nosocomiales de A à Z. Editions Health – CO. Paris. France. p766.

Centre national de référence des *Escherichia coli* et *Shigella* (CNR), 2003. Les shigelloses en France. France. 7 p.

Chaouch , (2007). *Identification et quantification des déchets solides encombrant les plages d'Annaba: aspect physico-chimique et bactériologique des eaux*. Mémoire de Magister. Université Badji-Mokhtar Annaba. 105p.

Chiguer M, (2013) La qualité microbiologique des eaux a l'hôpital ibn sina de rabat, Université Mohammed V –Souissi Faculte De Medecine Et De Pharmacie – Rabat

CIRCULAIRE DGS/VS4 N°97-413 du 30 mai 1997, relative à la microbiologie des eaux destinées à la consommation humaine et au risque parasitaire pour les personnes immunodéprimées.

Circulaire Dgs/Sd7a/Sd5c-Dhos/E4 N°2002-243., (1997). (Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire) n°20-22, 1997.

Cohen N., Karib H., (2007). *Vibrio* spp. Dans les produits de la pêche : Risques et prévention. Les technologies de laboratoire. N° 3. 7 p.

Colbourne J.S., Smith M.G., (1983). Source of legionella pneumophila infection in a hospital hot water system.2nd international symposium on legionella. Atlanta, june 19-23,1983.

Crestani B., Fournier M., Mal H., (2009). Traité de pneumologie 87, quai Panhard et Levasor 75013. Paris.p 469

Das A.S., Mazumder D.N., Pal D. et Chattopadhyay U.K., (1996) A study of nosocomial diarrhea in Calcutta. Ind. J. of Gastroenterol, 1996, 15, 12 – 13.

Dellarras C., (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Lavoisier, 2007 : Tec & Doc. Paris. 463 p.

Délaras C. (2008) .surveillance sanitaire Et Microbiologique des eaux : Règlements-Prélèvements-Analyses.*TEC & DOC*.269p.

Denis F., et al., (2007). Bactériologie médicale : Techniques usuelles. Elsevier Masson. 594 p.

Ewing W. H., Edwards P. R., (1986). Edwards and Ewing's identification of *Enterobacteriaceae*. Elsevier Publishing. 4th edition. New York. 1262 p.

Federighi M., (2005). Bactériologie alimentaire- Compendium d'hygiène des aliments. 2^{ème} édition : Economica. Paris. 292 p.

Gauthier F., (2002), Biofilms et qualité biologique de l'eau potable au cours de sa distribution , Mémoire de DESS en Qualité et Gestion de l'eau ,Université de Picardie

Gauthier V., et Rosin C , (1996),Characterization of the loose deposits in drinking water distributionsystems ,In Proceedings of the A W W A Water Quality Technology Conference American ater Works Association ,Boston,Mass.

Gregor B.L.Jemec,Jean Revuz,James J.Leyden, (2008),Hidradénite suppurée,Springer-Verlag France,Paris,2008 .

Grosjean J. et al., (2009). Bactériologie et virologie pratique. De boeck. Bruxelles. Belgique. 288 p.

Guiraud J. P., (1998). Microbiologie alimentaire. Dunod. Paris. France. 651 p.

Hakmi A., (2002). *Traitement des eaux " analyse de l'eau de source bousfer ORAN*, Mémoire de magister. Université des sciences et de la technologie Oran.71p.

Harvey R.A. et al., (2007). Microbiology. 2nd edition. Lippincott Williams & Wilkins. 432 p

Hygis N., (1998),Hygiène hospitalière .

ISO 6222 1999.

ISO 9308-1.

ISO 7899-2.

Janda J.M., Abbott S.L., (1988). The Enterobacteria. Lippincott-Raven, 1st edition Philadelphia. Etats Unis. 425 p.

Jean C, Milliam D,(2005),L'eau dans les établissements de santé .

Jean N. et Guy L., (2001). Microbiologie technique :1-Dictionnaire des techniques, 3^e éd -Bordeaux : CRDP d'Aquitaine

Lebres E., (2002). Cours national d'hygiène et de microbiologie des aliments « Microbiologie des eaux, des boissons et des produits de la mer ». Institut Pasteur d'Algérie. 34 p.

Lebres E., (2006). Manuel des travaux pratique : analyse des eaux, *Institut Pasteur d'Algérie*.60p.

Labres E., Mouffok F. (2008). Les cours national d'hygiène et de microbiologie des eaux de boisson. Manuel des travaux pratiques des eaux. Institut Pasteur d'Algérie. Algérie.53 p.

Leclerc H., (1994). Microbiologie Des Eaux D'alimentation. TEC & DOC. Paris. France. 495p.

Leclerc H., Festy B. et Lazar P., (1982). Connaissances actuelles de la pathologie hydrique, R.E.S.P, 1982, 30, 3 363-85.

Lesene J., (1998). Hygiène publique, microbiologie et gestion de l'eau, école nationale de la santé publique, Rennes, France, page :7.

Lévi Y, Becquevort P, Tissot O, Barrin C., (2012). Canalisations et qualité de l'eau sanitaire, les propriétés antibactériennes du cuivre ; p02,03,04

Lightfoot N. F., (2002). Analyses microbiologiques des aliments et de l'eau. Directive pour l'assurance qualité. France. 387 p.

Ministere des solidarités, de la sante et de la famille,(2007). Direction Générale de la Santé, Direction de l'Hospitalisation et de l'Organisation des Soins, Guide technique « L'eau dans les établissements de santé ».

Monod T., (1989). Méharées géographiques (N.A.N.I) normes Algérienne et normes international (2002). France loisir. 233 p.

Moustardier G., (1972). Bactériologie médicale ;4^{ème} édition ,librairie Maloine.S.Aéditeur,Paris.

Nauciel C., Vildé J. L., (2005). Bactériologie médicale. Masson. 2^{ème} édition. p257

Norme Marocaine, (2001). La qualité des eaux d'alimentation humaine »

2001, P.6-7-8.

Norme NF T90-431., (2003). Ministère des Solidarités, de la Santé et de la Famille septembre 2003

Oliver J. D., Japer J. B., (1997). *Vibrio* species. in sea food : Food microbiology – fundamentals and frontiers. Washington. 264 p.

Organisation mondiale de la santé(OMS), (1994). Directives de qualité pour l'eau de boisson; volume 1 – recommandations Organisation mondiale de la Santé, 2^e édition, 202 p.

Orth G, Sansonetti P ; (2006). La maitrise des maladies infectieuses ; un défi de santé publique, ambition medicoscientifique, Académie des sciences ; 10, 11.

Patrick R et al, (2009). Medical Microbiology. 6th edition. Mosby Elsevier. Canada. 960 p.

Pechère et al., 1982 Reconnaître, comprendre et traité les infections. 4^{ème} édition. *Edisem ST-Hyacinthe. Québec.* 509p.

Pe PETITHORY J.C., Barraud D., Escallier G., Cochet P. A .propos de l'eau stérile des salles d'opération. Bull.acad.nat.med.,(1984),1-2, 255-261.

Pilet C. et al, (1987). Bactériologie médicale et vétérinaire. Systématique bactérienne. Doin. France. 371 p.

Prescott L, Harley J, Klein D.(2002).Microbiologie.2^{ème} édition.Caummunauté française de Belgique.p 850

- Rejsek F., (2002).** Analyse des eaux : Aspects réglementaires et techniques. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine (CRDP). Bordeaux. 358 p.
- Robertson W., (1995).** Utilités et limites des indicateurs microbiologiques de la qualité de l'eau potable. Dans : Air intérieur et Eau potable, sous la direction de Pierre Lajoie et Patrick Levallois, Presses de l'Université Laval. Canada. p193.
- Robins-Browne R. M., (1997).** *Yersinia enterocolitica*. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. (Ed.). Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers. American Society for Microbiology. Washington. 215 p.
- RODIER J., (1984).**L'analyse de l'eau : Eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer. Edition Dunod Paris.
- Rodier J., (1996).** Analyse de l'eau, eaux naturelles, eaux résiduaires. 8^{ème} édition, Dunod, Paris 1130p.
- Rodier J., (2009).** L'Analyse de l'eau. 9^{ème} édition. Dunod. Paris. 1579 p.
- Rossignol G., (2007).** Contribution à l'étude de facteurs de virulence d'une souche hospitalière de *Pseudomonas fluorescens* : Activité hémolytique et variation phénotypique. Mémoire de Doctorat en microbiologie. Université de Rouen. 256 p.
- Roussel A., (1982).**L'infection hospitalière à *Legionella pneumophila*. Journées d'hygiène de l'assistance Publique, Hopitaux de paris, 14 et 15 janvier 1982, Kremlin Bicetre.
- Roux., (2003).** TP de microbiologie : Analyses de l'eau. *NOVELLO Célia. IUP SIAL*, Université Paris 12p.
- Sayad L.,(2008).** *Qualité physico-chimique et bactériologique des eaux de l'écosystème lacustre Lac des Oiseaux (Wilaya EL Tarf)* .Mémoire de Magister.Université Badji Mokhtar-Annaba.76p.
- Schmidt R., (1999)** Compartiment des matériaux dans les milieux biologiques.1^{er} édition. Spriger-verlag.Berlin-Heidlberg.p209.
- Singleton P., (2005).** Bactériologie. Dunod. 6^{ème} édition. Paris. France .542p.

Solutions Concentrées Pour Hémodialyse.2008

World Health Organization., (2005). Guidelines for the control of shigellosis, including epidemics due to *Shigella dysenteriae* type 1. 70 p.

Site Web:

[01] : www.hepatoweb.com/anatomobase/images/Amibiase.jpg.(Date de consultation; 21/03/2015)

[02] : [www. maitrise-des-risques-microbiologiques-dans-les-resaux-d'eau-sanitaires.pdf](http://www.maitrise-des-risques-microbiologiques-dans-les-resaux-d'eau-sanitaires.pdf) (Date de consultation : 21/03/2015).

[03] : www.realco.be/biofilm.html(Date de de consultation; (21/03/2015).

[4] <http://laboratoire.jimdo.com/parasitologie/examen-mycologique-des-cheveux-et-de-la-peau/> (Consultée le 06/04/2015)

[5] <http://www.arnobio2.com/> (Consultée le 06/04/2015)

[6]file:///C:/Documents%20and%20Settings/admin/Mes%20documents/Comapareteur%252c+Clare_2%20(1).pdf

Table de Mac Grady

Nombre caractéristique	Nombre de cellules
000	0.0
001	0.3
010	0.3
011	0.6
020	0.6
100	0.4
101	0.7
102	1.1
110	0.7
111	1.1
120	1.1
121	1.5
130	1.6
200	0.9
201	1.4
202	2.0
210	1.5
211	2.0
212	3.0
220	2.0
221	3.0
222	3.5
223	4.0
230	3.0
231	3.5
232	4.0
300	2.5
301	4.0
302	6.5
310	4.5
311	7.5
312	11.5
313	16.0
320	9.5
321	15.0
322	20.0
323	30.0
330	25.0
331	45.0
332	110.0
333	140.0

Milieux utilisés

[M1]- Bouillon lactosé au pourpre de Bromocrésol (BCPL) : pH = 6.7

Peptone	5g
Extrait de viande	3g
Lactose	10g
Cristal violet	0.005g
Pourpre de Bromocrésol	0.025g
Eau distillée	1000ml

[M2]- Gélose Hecktoène : pH = 7.5

Protéose peptone	12g
Extrait de levure	3g
Chlorure de sodium	5g
Thiosulfate de sodium	5g
Sels biliaires	9g
Citrate de fer ammoniacal	1.5g
Salicine	2g
Lactose	12g
Saccharose	12g
Fuchsine acide	0.1g
Bleu de bromothymol	0.065g
Agar	14g
Eau distillée	1000ml

[M3]-Gélose viande foie (VF) : pH = 7.2Gélose de base :

Base viande foie	30g
Glucose	2g
Amidon	2g
Agar	11g
Eau distillée	1000ml

Gélose complète :

Même formule que le milieu de base auquel sont ajoutés :

Sulfite de sodium à 5%	50ml
Alun de fer ammoniacal à 5%	10ml

[M4]- Gélose Salmonella-Shigella (SS) : pH = 7.0

Extrait de viande de bœuf	5g
Polypeptone	5g
Lactose	10g
Sels biliaires	8.5g
Citrate de sodium	10g
Thiosulfate de sodium	8.5g
Citrate ferrique	1g
Gélose	13.5g
Vert brillant	0.00033g
Rouge neutre	0.025g
Eau distillée	1000ml

[M5]- Cétrimide : pH= 7.2

Peptone de gélatine (bovin ou porcin)	20
Chlorure de magnésium	1.4
Sulfate de potassium	10
Cétrimide	0.3
Glycérol	10ml
Agar	13.6

[M6]- Milieu de Chapman mannité : pH = 7.4

Peptone bactériologique	10g
Extrait de viande de bœuf	1g
Chlorure de sodium	75g
Mannitol	10g
Rouge de phénol	0.025g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

[M7]- Gélose GNAB : pH = 8.6.

Peptone	10 g
Extrait de viande	3 g
Chlorure de sodium	5 g
Bile de boeuf	2g
Agar	8.6 g

[M 8]- Gélose de Slanetz et Bartley : pH = 7.0 à 7.2

Tryptose	20g
Extrait de levure	5g
Glucose	2g
Phosphate disodique 2H ₂ O	4g
Azoture de sodium	0,4g
Chlorure de tétrazolium	0.1g
Agar	10g

[M 9]-Gélose lactosée au TTC : pH = 7,2

Peptone	10
Extrait de viande	5
Extrait de levure	6
Lactose	20
Tergitol 7	0.01
TTC	0.0.25
Bleu de bromothymol	0.05
Agar	13

[M10]- Milieu de Roth : pH = 6.8 à 7**Milieu simple concentration :**

Peptone	20g
Glucose	5g
Chlorure de sodium	5g
Phosphate bipotassique	2.7g
Phosphate monopotassique	2.7g
Azothydrate de sodium	0.2g

Milieu double concentration :

Peptone	40g
Glucose	10g
Chlorure de sodium	10g
Phosphate bipotassique	5.4g
Phosphate monopotassique	5.4g
Azothydrate de sodium	0.4g

[M11]- Milieu de Litsky : pH = 6.8 à 7

Peptone	20g
Glucose	5g
Chlorure de sodium	5g
Phosphate bipotassique	2.7g
Phosphate monopotassique	2.7g
Azothydrate de sodium	0.3g
Ethyl-violet	0.0005g

[M12]- Gélose de Mac Conkey : pH = 7.1

Peptone bactériologique	20g
Sels biliaire	1.5g
Chlorure de sodium	5g
Lactose	10g
Rouge de neutre	0.03
Cristal violet	0.001
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

[M13]- Milieu Clark et Lubs : pH = 7.5

Peptone	5g
Phosphate dipotassique	5g
Glucose	5g
Eau distillée	1000ml

[M14]- Eau peptonée exempte d'indole : pH = 7.2

Peptone exempte d'indole	10g
Chlorure de sodium	5g
Eau distillée	1000ml

[M15]- Milieu mannitol mobilité : pH = 7.6 à 7.8

Peptone tryptique de viande	20g
Agar	4g
Mannitol	2g
Rouge de phénol à 1%	4g
Nitrate de potassium (KNO ₃)	1g
Eau distillée	1000ml

[M16]- Milieu de TSI (gélose glucose-lactose-saccharose-H₂S) : pH = 7.4

Peptone	20g
Extrait de levure	3g
Extrait de viande	3g
Chlorure de sodium	5g

Thiosulfate de sodium	0.5g
Lactose	10g
Saccharose	10g
Glucose	1g
Rouge de phénol	q.s
Agar	12g
Eau distillée	1000ml
[M17]- Milieu de simmons : pH = 6.8	
Sulfate de magnésium	0.2g
Phosphate mono ammoniacque	1g
Phosphate dipotassium	1g
Citrate de sodium	2g
Chlorure de sodium	5g
Bleu de bromothymol	0.08g
Agar	15g
Eau distillée	1000g
[M18]- Urée indole : pH = 7.2	
L- tryptophane	3g
Phosphate bipotassium	1g
Phosphate monopotassium	1g
Chlorure de sodium	5g
Urée	20g
Alcool à 95°	10ml
Rouge de phénol	28mg
Eau distillée	1000ml
[M19]- Eau peptonée alcaline (EPA) : pH = 8.6	
Peptone tryptique	30g
NaCl	30g
Eau distillée	1000ml Institut Pasteur, 1978).

Réactifs utilisés

[R1]- Réactif rouge de méthyle (RM) :

Rouge de méthyle	0.5g
Alcool à 60°	100ml

[R2]- Réactif de Vosges Proskauer (VP): pour la recherche de l'acétoine :

VP1:

Hydroxyde de potassium	40g
Eau distillée	100ml

VP2:

Alpha naphthol	6g
Ethanol	100ml

[R3]- Réactif de Kowacks : la mise en évidence de la production d'indole :

Paradiméthylaminobenzaldéhyde	5g
Alcoolamylique	75ml
HCL pur	25ml

[R4]- Réactif de TDA : pour la recherche du tryptophane désaminase

Peptone de fer

3,4g

Eau distillée

100ml (**Institut Pasteur, 1978**).

Tab : Lecture et interprétation des résultats de l'API 20 E

Test	Groupements active	Réactions/ Enzymes	Résultats	
ONPG	Ortho-nitro-phényle-B-D- Galactopyranoside	Beta-galactosidase	Négative	Positive
			incolore	Jaune
ADH	Arginine	Arginine désahydrolase	Jaune	Rouge/orange
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orangé
ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orange
 CIT 	Sodium citrate	Utilisation de citrate	vert	Bleu-ver/orange
H₂S	Thiosulfate de sodium	Production de H ₂ S	incolore	Noir
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orange
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Jaune	Marron
IND	Tryptophane	Production d'indole	incolore	Rose
 VPI 	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	Mlebiose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
AMY	Arabinose	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

Tab : Lecture et interprétation des résultats de l'API 20 NE

TESTS	Composants Actifs	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
NO ₃	potassium nitrate	0,136	réduction des Nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 min	
				incolore	rose-rouge
TRP	L-tryptophane	0,2	formation d'indole (TRyptOphane)	JAMES / immédiat	
				vert pâle / jaune	Rose
GLU	D-glucose	1,92	fermentation (GLUcose)	bleu à vert	jaune
ADH	L-arginine	1,92	Arginine DiHydrolas	jaune	orange / rose / rouge
URE	urée	0,76	UREase	aune	orange / rose / rouge
ESC	esculine citrate de fer	0,56 0,072	hydrolyse (β-glucosidase) (ESCuline)	jaune	gris / marron / noir
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	hydrolyse (protéase) (GELatine)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl- βDgalactopyranoside	0,22	β-galactosidase (Para- NitroPhényl- βDGalactopyranosidase)	incolore	jaune
GLU	D-glucose	1,56	assimilation (GLUcose)	Transparence	Trouble
ARA	L-arabinose	1.4	assimilation (ARAbinose)	Transparence	Trouble
MNE	D-mannose	1.4	assimilation (ManNosE)	Transparence	Trouble
MAN	D-mannitol	1.36	assimilation (MANnitol)	Transparence	Trouble
NAG	N-acétyl-glucosamine	1.26	assimilation (N-Acétyl-Glucosamine)	Transparence	Trouble
MAL	D-maltose	1.4	assimilation (MALtose)	Transparence	Trouble
GNT	potassium gluconate	1.84	assimilation (potassium GlucoNaTe)	Transparence	Trouble
CAP	acide caprique	0.78	assimilation (acide CAPrique)	Transparence	Trouble
ADI	acide adipique	1.12	assimilation (acide ADIrique)	Transparence	Trouble
MLT	acide malique	1.56	assimilation (MaLaTe)	Transparence	Trouble
CIT	trisodium citrate	2.26	assimilation (trisodium CITrate)	Transparence	Trouble
PAC	acide phénylacétique	0.8	assimilation (acide PhénylACétique)	Transparence	Trouble
Ox	(voir notice du test oxydase)	-	cytochrome-oxydase	(voir notice du test oxydase)	

Tab : Lecture est interprétation des résultats de l'API 20 Strep

TESTS	Composants Actifs	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS			
				NEGATIF		POSITIF	
VP	Production pyruvate	1,9	Oroduction d'acetone	VP 1 + Vp 2 / 10 min			
				incolore		rose-rouge	
HIP	Acide hypporique	0,4	Hydrolase	NIN/ Jusqu'à 10 min			
				vert pâle / jaune		Rose	
ESC	esculine citrate de fer	1,16 0,152	hydrolyse (β -glucosidase) (ESCuline)	4h	24h	4h	24h
				Incolore Jaune pale	Incolore Jaune pale Gris clair	Noir Gris	Noir
PYRA	Acide Pyroglutamique-B- Naphtylamide	0,0255	PYRrolidonyl Aramidase	ZYM A+ ZYM B (PYRA à LAP)			
				Incolore ou Orange très pale		Orange	
GAL	6-bromo-2-naphyl-D- galactopyranoside	0,0376	-GALactosidase	Incolore		Violet	
GUR	Acide naphtol- ASBI- glucuronique	0,0537	β -glucoRonidase	Incolore		Bleu	
β -GAL	2-naphtyl-BD- galactopyranoside	0,0306	α - GALactosidase	Incolore ou violet très pale		Violet	
PAL	2-naphtyl phosphate	0,0244	Phosphate alcaline	Incolore ou violet très pale		violet	
LAP	L-leucine-b naphtylamide	0,0256	Leucine Amino Peptidase	Incolore		Orange	
ADH	L-arginine	1,9	Arginine DIHydrolase	Jaune		Rouge	
RIB	D-glucose	1,56	assimilation (GLUcose)	Orange/Rouge		Jaune	
ARA	L-arabinose	1,4	assimilation (ARAbinose)	Orange/Rouge		Jaune	
MAN	D-mannose	1,4	assimilation (ManNosE)	Orange/Rouge		Jaune	
SOR	D-mannitol	1,36	assimilation (MANnitol)	Orange/Rouge		Jaune	
LAC	N-acétyl-glucosamine	1,26	assimilation (N-Acétyl-Glucosamine)	Orange/Rouge		Jaune	
TRE	D-maltose	1,4	assimilation (MALtose)	Orange/Rouge		Jaune	
INU	potassium gluconate	1,84	assimilation (potassium GlucoNaTe)	Orange/Rouge		Jaune	
RAF	acide caprique	0,78	assimilation (acide CAPrique)	Orange/Rouge		Jaune	
AMD	acide adipique	1,12	assimilation (acide ADIpique)	Orange/Rouge		Jaune	
GLYC	Glycogène	1,28	Acidification (Glycogène)	Rouge ou orange		Jaune granc	

Tab : Lecture et interprétation des résultats de l'API 20 Staph.

Tests	Composants Actifs	Qte (Mg/Cup.)	Reactions / Enzymes	Resultat		
0	Aucun		Témoin négatif	Negatif	Positif	
GLU	D-glucose	1,56	Témoin positif (D-GLUcose)	Rouge	Jaune	
FRU	D-fructose	1,4	acidification (D-FRUctose)			
MNE	D-mannose	1,4	acidification (D-ManNosE)			
MAL	D-maltose	1,4	acidification (MALtose)			
LAC	D-lactose (originebovine)	1,4	(acidification (LACtose) acidification (D-TREhalose)			
TRE	D-tréhalose	1,32	acidification (D-MANnitol)			
MAN	D-mannitol	1,36	acidification (XyLiTol)			
XLT	XLT xylitol	1,4	acidification (D-MELibiose)			
MEL	D-mélibiose	1,32				
NIT	nitrate de potassium	0,08	Réduction des NITrates en nitrites			NIT 1 + NIT 2 / 10 min
				incolore-rose pâle	rouge	
PAL	β -naphtyl phosphate	0,0244	Phosphatase ALcaline	ZYM A + ZYM B/ 10 min		
				jaune	violet	
VP	sodium pyruvate	1,904	production d'acétyl méthyl-carbinol (Voges Proskauer)	incolore-rose pâle	violet-rose	
RAF	D-raffinose	1,56	acidification (RAFFinose)	Rouge	Jaune	
XYL	D-xylose		acidification (XYLose)			
SAC	D-saccharose		1,4			acidification (SACcharose)
MDG	méthyl-Dglucopyranoside		1,32			acidification (Méthyl-DGlucopyranoside)
NAG	N-acétyl-glucosamine		1,28			acidification (N-Acétyl-Glucosamine)
			1,28			
<u>ADH</u>	L-arginine	1,904	Arginine DiHydrolase	jaune	orange-rouge	
<u>URE</u>	urée	0,76	UREase	jaune	rouge-violet	

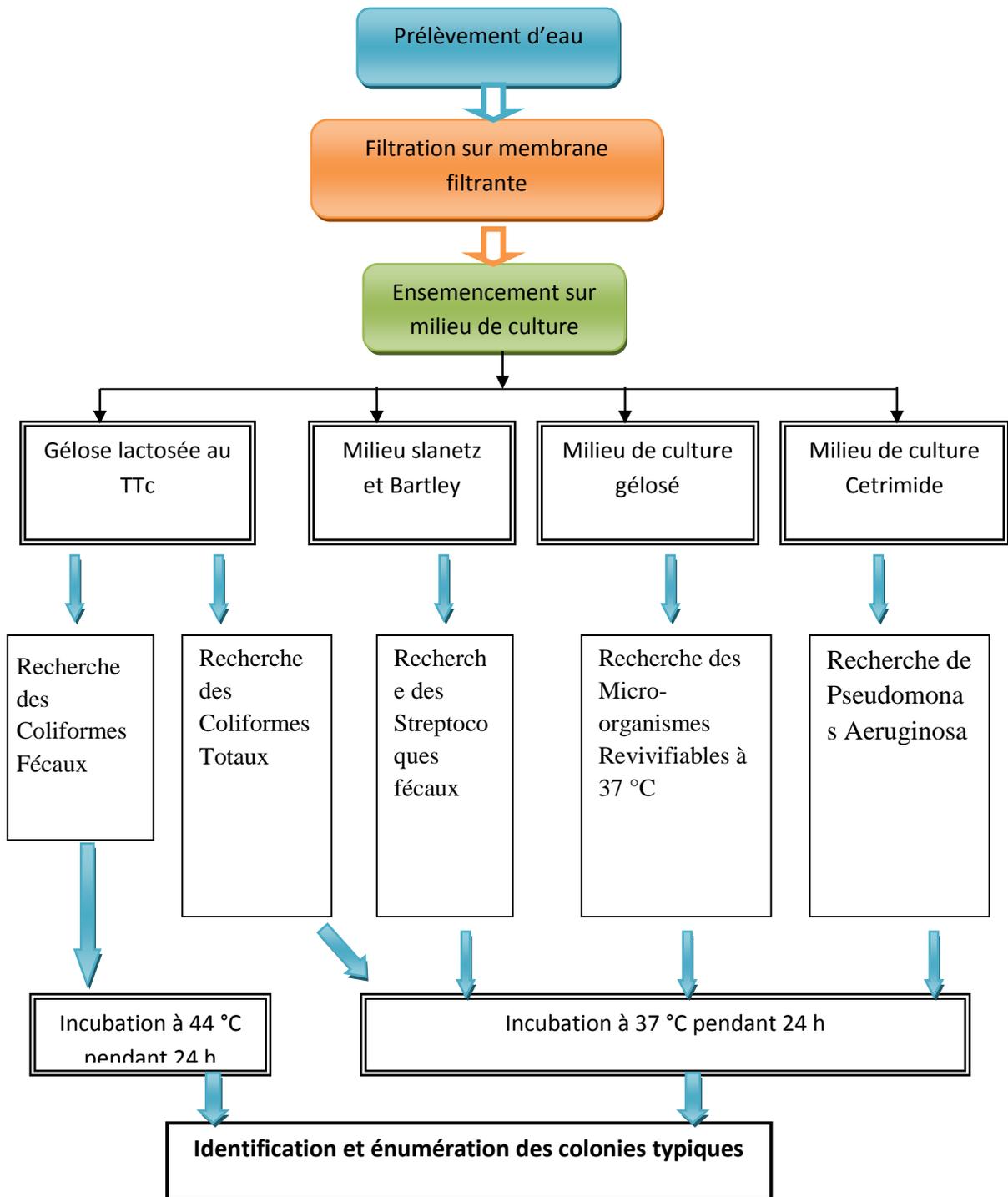


Tableau : les espèces bactériennes isolées dans les différents services hospitaliers.

Famille	Espèces bactériennes identifiées	Centres hospitaliers										
		Ibn-Zohr						El-Hakim Okbi				
		<i>Infectieux</i>	<i>Hémodialyse</i>	<i>Bactériologie</i>	<i>Pneumologie</i>	<i>Cuisine</i>	<i>Anatomo-pathologie</i>	<i>Urgences</i>	<i>Accouchement</i>	<i>Chirurgie Générale</i>	<i>Médecine générale</i>	<i>Ophthalmologie</i>
Enterobacteriaceae	<i>Escherichia coli 1</i>	×		×			×					
	<i>Citrobacter braakii.</i>	×			×							
	<i>Enterobacter chloasae</i>		×	×	×							
	<i>Enterobacter sakazakii</i>		×					×		×		
	<i>Serratia liquefaciens</i>	×	×							×		
pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas fluorescens</i>					×						
	<i>Pseudomonas luteola</i>	×	×	×	×	×	×		×	×		×
Aeromonadaceae	<i>Aeromonas hydrophila</i>	×	×	×		×		×	×	×		
	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	×		×		×	×					
	<i>Aeromonas hydrophila.gr. 2</i>	×		×		×	×					

Micrococcaceae	<i>Aerococcus viridans</i>	×	×		×			×	×			
Leuconostocaceae	<i>Leuconostoc spp</i>	×						×				
Streptococcaceae	<i>Lactococcus lactis spp cremoris</i>								×			
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus hominis</i>	×					×		×			
	<i>Staphylococcus xylosus</i>		×						×			
	<i>Kocuria varians/rosea</i>						×		×			
Burkholderiaceae	<i>Burkholderia cepacia</i>	×		×								
Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>						×					