

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قالمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie

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

Département: D'écologie et génie de l'environnement

Thème : Contamination bactérienne des claviers des ordinateurs après leurs utilisations par les étudiants

Présenté par :

•BEZZAZI Youssouf

•MILOUDI Ahmed

Devant la commission composée de :

Mme. GRARA Nedjoude	Président	Université de Guelma
Pr. HOUHAMDI Moussa	Encadreur	Université de Guelma
Mme. BOUDRAA Wahiba	Co-encadreur	Université de Guelma
Dr. ROUABHIA Kamel	Examineur	Université de Guelma
Dr. ADRAR Nassim	Membre	Université de Guelma
Mme. KHELAF Messaouda	Membre	Université de Guelma
Mme. KHENAKA Karima	Membre	Université de Guelma

Juin 2017

Résumé :

Les claviers des ordinateurs sont des lieux favorables pour la multiplication et le développement des microorganismes tel que les bactéries, les champignons et les virus. Ces microorganismes peuvent causer des infections respiratoires, cutanées, gastroentériques pour les utilisateurs de ces équipements.

Notre étude s'est basée sur l'identification et le dénombrement des bactéries provenant de la salle d'informatique de l'Université 8 Mai 1945 de Guelma, en analysant les prélèvements provenant de 16 postes de travail (claviers)

*Les résultats que nous avons obtenus montrent la présence d'un grand nombre de bactéries telles *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio Fluviatis*, *Providencia alcalifaciens*, *Pantoea spp.*, *Enterobacter sakazaki*, *Pseudomonas luteola*, *brevundimonas visicularis*, *Acinetobacter baumannii*, *Listeria grayi*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivaris*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Micrococcus spp*, *Staphylococcus aureus*. Ces derniers exigent une prise de conscience vis-à-vis de leur risque, d'où la nécessité d'un système efficace de lutte et de prévention.*

Les mots clés : Maladies infectieuses, clavier, isolement, identification, bactéries pathogènes.

Summary :

Computer keyboards are favorable environments for the multiplication and development of microorganisms such as bacteria, fungi and viruses; These microorganisms can cause respiratory, skin, gastroenteritis infections for users of these devices

Our study has been identified and counted bacteria from the computer room of the University of Guelma, analyzing the samples from the 16 workstations (keyboards)

*The results obtained show the presence of the following germs: *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluviatis*, *Providencia alcalifaciens*, *Pantoea spp*, *Enterobacter Sakazaki*, *Pseudomonas Luteola*, *Brevundimonas visicularis*, *Acinetobacter baumannii*, *Listeria grayi*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivaris*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Micrococcus spp.*, *Staphylococcus Aureus*, and the latter require an awareness of their risk, hence the need for an effective system of control and prevention.*

Keywords: *infectious diseases, keyboard, isolation, identification, pathogenic bacteria.*

ملخص:

لوحة مفاتيح الحاسوب هي بيئات مواتية لانتشار وتطور الكائنات الدقيقة مثل البكتيريا والفطريات و الفيروسات هذه الكائنات الدقيقة يمكن أن تسبب التهابات الجهاز التنفسي إما والجلد و التهاب المعدة والأمعاء لمستخدمي هذه المعدات

وكانت دراستنا موضوعا لتحديد وتعداد البكتيريا من حجرة الإعلام الآلي من جامعة قالمة، وتحليل عينات من 16 محطة عمل (لوحة مفاتيح)

وأظهرت النتائج وجود الجراثيم التالية :

Aeromonas hydrophila, Vibrio Fluviatis, Providencia alcalifaciens, Pantoea spp, Enterobacter Sakazaki, Pseudomonas Luteola, Brevundimonas visicularis, Acinetobacter baumannii, Listeria grayi, Enterococcus faecalis, Streptococcus salivaris, Staphylococcus saprophyticus, Micrococcus spp, Staphylococcus aureus

.وأنها تحتاج إلى قرار موجهها للوعي بالمخاطر، وبالتالي الحاجة إلى وجود نظام فعال للرقابة والوقاية منه.

كلمات البحث: الأمراض المعدية، لوحة المفاتيح، العزل، تحديد، البكتيريا المسببة للأمراض.

Remerciements

Nous remercions Allah, Dieu le Miséricordieux qui nous a éclairé la voie de la science et de la connaissance et par sa grâce on a réussi à achever ce travail.

*Nous exprimons nos profonds remerciements à Madame **Grara**, Maître assistante au Département de biologie, d'avoir bien accepté présider ce jury.*

*Nous tenons à remercier Monsieur **Rouabhia**, Maître assistant au Département de biologie pour avoir exprimé son entière disponibilité à participer à ce jury et examiner ce mémoire.*

*Nos remerciements vont à Monsieur **Houhamdi**, Professeur au département de biologie Pour nous avoir fait l'honneur d'accepter de diriger ce travail, pour ses précieux conseils, son enseignement et sa gentillesse qu'on a pu apprécier pendant notre parcours. Veuillez trouver ici le témoignage de nos plus profonds respects et de nos plus vives reconnaissances.*

*Nos reconnaissances, nos vives gratitudees et nos sincères remerciements vont aussi à Madame **Boudraa**, Doctorante au département de Biologie de nous avoir dirigé tout au long de la réalisation de ce travail. Ses orientations, sa disponibilité et son œil critique nous a été très précieux pour structurer et améliorer ce travail.*

*Nous exprimons nos profonds remerciements à Monsieur **Adrar**, Madame **Khelaf**, Madame **Khanaka**, nos chères enseignants au Département de biologie, pour avoir exprimé leurs entière disponibilité à participer à ce jury et examiner ce mémoire.*

*Sans oublier Mme. **Leila** . pour sa précieuse aide pour la réalisation de ce travail.*

Enfin, nous exprimons nos vives et profonde reconnaissance à tous ceux qui de près ou de loin se sont associés pour l'élaboration de ce travail en particulier les enseignants et les étudiants du département de biologie.

Dédicace

• *Je dédie ce travail*

*A ma mère qui m'a éclairée mon chemin et
qui m'a encouragée et soutenue
toute au long de mes études*

A mon père pour sa rigueur et son soutien ;

A mon frère : Abdelhak,

*A mes sœurs : Samia , Mebaraka ,Nadjet,
Imene et Ahlem*

A toute ma famille sans exception

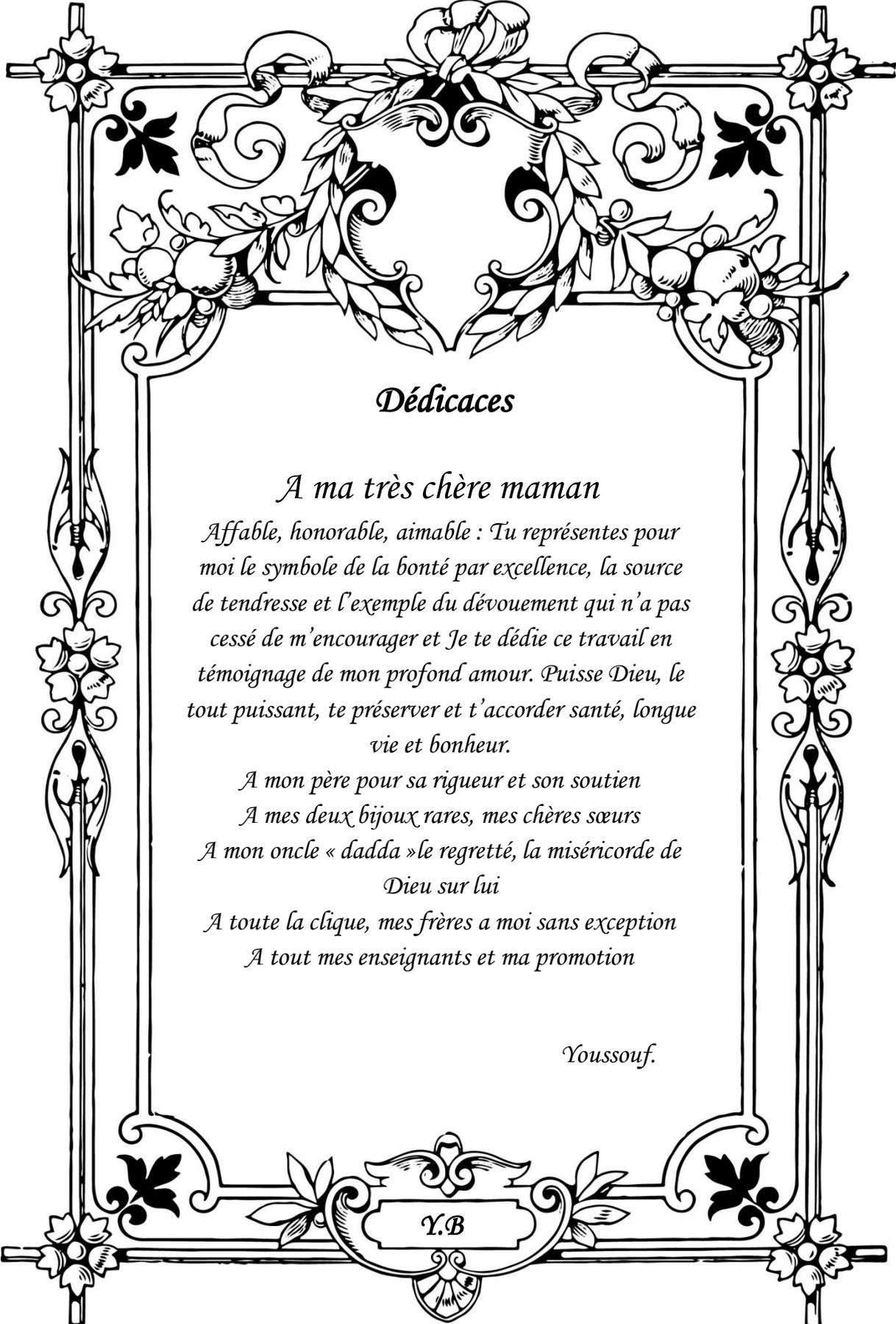
A mon binôme : Youssouf

A tout mes amis sans exception

*A ma promotion et à tout ce qui
connaisse Ahmed*

Ahmed





Dédicaces

A ma très chère maman

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon père pour sa rigueur et son soutien

A mes deux bijoux rares, mes chères sœurs

A mon oncle « dada » le regretté, la miséricorde de Dieu sur lui

A toute la clique, mes frères a moi sans exception

A tout mes enseignants et ma promotion

Youssouf.

Y.B

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction

Chapitre 01 : Installation d'une contamination bactérienne

1- Notion de contamination	01
2- La contamination croisée	01
3- Les claviers et Souris d'ordinateurs en tant que Fomites	01
4- Les principales causes d'une contamination d'un clavier	02
5- Localisation des microorganismes dans l'environnement d'une salle d'informatique.	02
5-1- Dans l'air.....	03
5-2- Dans les surfaces inertes	03
5-2-1- Sur les outils bureautiques.....	04
5-2-2- Sur les matériels informatiques.....	05
6- Les principaux microorganismes provenant d'une salle informatique	06
6-1- Les bactéries.....	06
6-1-1- <i>Legionella</i>	07
6-1-2- Les Entérobactéries.....	08
6-1-3- <i>Staphylococcus aureus</i>	09
6-2 -Les champignons.....	10
6-3- Les virus	11

Chapitre 02: Risques microbiologiques liées à l'utilisation des claviers d'ordinateurs

1-Risques infectieux liées à l'usage des claviers d'ordinateur.....	12
2- Les maladies infectieuses liées à l'utilisation des claviers d'ordinateur	12
2-1- Définition et évolution des maladies infectieuses	12
2-2- Principales maladies liées à l'usage des claviers et leur mode de transmission	13
2-2-1-Voie respiratoire.....	14
2-2-1-1 La légionellose.....	14
2-2-1-2 Le rhume.....	15
2-2-1-3 La grippe.....	16
2-2-2-Voies digestives.....	17
2-2-2-1 Les gastroentérites aiguës et diarrhées.....	18
2-2-3-Voie cutanée et oculaire.....	18
2-2-3-1- Les dermatoses	19
2-2-3-2 -L'otite externe	19
2-2-3-3- La conjonctivite	19
3-Méthodes préventives pour réduire la contamination.....	20
3-1-Prévention de la propagation de virus de la toux et la grippe	21
3-2-Nettoyage du poste de travail	24
3-2-1-Le nettoyage de la table de travail.....	25
3-2-2-Le nettoyage d'un clavier.....	25
3-2-3-Les produits de Green Clean	25
3-2-4-Cyber clean	26
3-2-5-Les claviers Cleankeys	26
3-2-6-Le clavier en argent	27
3-2-7-Le clavier au cuivre	27

6-3-3-2-Recherche et dénombrement des streptocoques : méthode générale par ensemencement en milieu liquide.....	51
6-3-3-3-Recherche et dénombrement des germes revivifiables.....	54

Chapitre 04 : Résultats et discussion

1-Résultats d'identification	55
1-1-Résultats de l'enrichissement de prélèvement des claviers	55
1-2- Résultats d'isolement.....	55
1-2-1-Aspect macroscopique des colonies après l'isolement.....	55
1-2-2-Examen microscopique.....	59
1-2-3-Résultats d'isolement des champignons sur milieu Sabouraud.....	61
1-3-Résultats de test TSI	61
1-4-Résultats de test coagulase.....	62
1-5-Résultats de la galerie API 20 E	64
1-6-Résultats de la galerie API NE	65
1-7-Résultats de la galerie API Strep	66
1-8-Résultats de la galerie API Staph	67
2-Résultats de la recherche et démembrement des microorganismes	69
2-1-Les coliformes totaux	70
2-1-1- Sur milieux liquide	71
2-2- Streptocoque fécaux	72
2-3- Dénombrement Sur milieux solide.....	73

Discussion

Conclusion

Résumé

Références bibliographiques

Annexes

Liste des tableaux

Tab.1. Survie de quelques bactéries sur différents milieux.....	2
Tab.2. Densité des germes sur quelques surfaces.....	5
Tab.3. Les principales bactéries responsables de gastroentérites.....	18
Tab.4. Quelques précautions pour lavage des mains correctement.....	24
Tab.5. Conseils pour le nettoyer les lieux de travail.....	25
Tab.6. Matériel utilisé dans notre travail.....	28
Tab.7. Présentation des postes de prélèvement.....	29
Tab.8. Lecture du test ONPG.....	42
Tab.9. Les principaux staphylocoques isolés en microbiologie.....	45
Tab.10. Les principaux streptocoques du groupe D isolées.....	49
Tab.11. Résultat de lecture macroscopique.....	56
Tab.12. Aspect microscopique des colonies.....	57
Tab.13. Résultats des tests d'oxydase et de catalase et d'ONPG.....	59
Tab.14. Résultat d'isolement des champignons.....	61
Tab.15. Résultats du test TSI.....	62
Tab.16. Résultats du test coagulase.....	63
Tab.17. Résultat de la Galeries API 20E	64
Tab.18. Résultat de la Galeries API NE	65
Tab.19. Résultat de la Galeries API Strepto.....	66
Tab.20. Résultat de la Galeries API Staph.....	67
Tab.21. Répartition des espèces selon les postes	68
Tab.22. Dénombrement sur milieu solide	73

Liste des figures

Fig.1. Mode de contamination aérienne.....	15
Fig.2. Représentation graphique de ce Sondage.....	21
Fig.3. Lavage des mains.....	22
Fig.4. Nettoyage de poste de travail.....	22
Fig.5. Désinfection des mains par produit antibactérien.....	23
Fig.6. produit de nettoyage Green Clean.....	26
Fig.7. Le clavier CleanKeys.....	27
Fig.8. Schéma représentatif du protocole du travail.....	31
Fig.9. Les points analysés dans la salle d'informatique.....	32
Fig.10. Test de catalase (+).....	37
Fig.11. Test d'oxydase(+).....	37
Fig.12. La galerie API 20E	39
Fig.13. Recherche et dénombrement des coliformes totaux.....	45
Fig.14. Test de coagulase.....	48
Fig.15. Recherche et dénombrement des streptocoques.....	53
Fig.16. Résultat de l'enrichissement.....	55
Fig.17. Aspect des Bacilles courte Gram (-).....	57
Fig.18. Aspect des Bacilles Gram (-).....	57
Fig.19. Aspect des Bacilles courte Gram (-).....	57
Fig.20. Aspect des Bacilles courte Gram (-).....	57
Fig.21. Aspect des Cocci en amas Gram (+).....	58
Fig.22. Aspect des monocoques et diplocoque Gram (+).....	58
Fig.23. Aspect des coccobacilles Gram (-).....	58
Fig.24. Aspect des bacilles Gram (-).....	58
Fig.25. Résultat oxydase (+)et (-).....	60
Fig.26. Résultat (+)du test catalase.....	60
Fig.27. Résultats du test ONPG.....	60

Fig.28. Observation macroscopique des champignons.....	61
Fig.29. Résultats du test TSI.....	62
Fig.30. Résultats du test coagulase.....	63
Fig.31. Résultats des profils biochimiques des entérobactéries.....	64
Fig.32. Résultats des profils biochimiques des API 20NE.....	65
Fig.33. Résultats des profils biochimiques des API Strep.....	66
Fig.34. Résultat de la Galerie API Staph.....	67
Fig.35. Répartition des espèces en fonction des postes.....	69
Fig.36. Nombre des coliformes en fonction des postes.....	70
Fig.37. Résultats de dénombrements des streptocoques.....	71
Fig.38. Résultats de dénombrement des coliformes.....	72
Fig.39. Résultats de dénombrement des streptocoques fécaux.....	72
Fig.40. Résultats de Dénombrement sur milieu solide.....	73

Introduction

Les découvertes scientifiques sont devenues si familières que nous utilisons des outils, des appareils sans penser vraiment à nous prémunir de moyens de protection adéquats contre les risques de contaminations microbiennes (**Leleu, 2011**)

Nul n'est à l'abri, quelque soit son statut immunitaire de contracter une infection dans un environnement public fermé, même si le risque varie d'un lieu à un autre (**Bariller.1998**).

Les salles d'informatiques et les cybercafés sont des lieux publics fréquentés par de nombreuses personnes de différentes tranches d'âges, de sexes, de conditions et de milieux variés, dont la plupart sont de jeunes lyciens et universitaires (**BâAbdoul, 2003**).

Ces environnements sont bien évidemment les plus exposés aux risques d'infection créés par la présence des conditions favorisant la prolifération et la diffusion de microorganismes pathogènes (les virus, les bactéries, les parasites et les champignons) (**Boulanger, 2007**)

A cet effet, les maladies infectieuses qui peuvent être liées à la manipulation des claviers constituent un sérieux problème de santé. Les personnes les plus exposés sont les femmes enceintes, les personnes âgées et les individus dont le système immunitaire est faible (**Dettenkofer et al, 2011**).

L'importance de ce problème nous a incité à nous intéresser d'avantage et d'en effectuer une étude afin de connaître et donner une vue claire de l'impact bactériologique provenant des surfaces contaminées sur la santé humaine

Cette étude est subdivisée en deux parties interdépendantes :

-Une partie bibliographique traitant des généralités sur la contamination croisée, les microorganismes localisés dans les milieux publics et quelques méthodes préventives pour réduire la contamination

-Une partie expérimentale où nous avons isolé et dénombré différents échantillons prélevés à partir des claviers des ordinateurs dans la salle d'informatique de la bibliothèque de l'Université de 8 Mai 1945 de Guelma.

Chapitre I

Installation d'une contamination bactérienne



1-Notion de biocontamination

La contamination biologique ou biocontamination correspond à la présence d'un élément biologique indésirable (bactérie, champignon, virus, toxine) dans un produit, ou dans l'environnement du produit (eau, air, surfaces). Les contaminants biologiques peuvent être des microorganismes mais également les toxines que certains d'entre eux synthétisent (**Garry,1998**).

2-La contamination croisée

La contamination croisée peut être définie comme «le passage de bactéries, de microorganismes ou d'autres substances nocives indirectement d'un patient à l'autre par inadéquat ou des équipements, procédures ou produits non stériles ». Afin de prévenir les incidences de contamination croisée dans le milieu de la santé, il est important d'examiner le concept de La chaîne d'infection. selon les Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Le modèle traditionnel de la triade épidémiologique démontre que les maladies infectieuses résultent Interaction de l'agent, de l'hôte et de l'environnement. plus précisément, la transmission se produit lorsque l'agent quitte son réservoir ou son hôte par un portail de sortie, est transporté par un mode de transmission, et entre par un portail d'entrée approprié pour infecter un sujet susceptible hôte. cette séquence est appelée chaîne d'infection (**Kelly, 2014**).

3- Les claviers et souris des ordinateur en tant que fomites

"Fomite" est le nom anglais pour "vecteur passif de transmission". on appelle vecteur passif de transmission tout objet contaminé par un agent infectieux (ex. : bactérie, virus), susceptible d'entraîner la contamination d'un sujet par simple contact avec l'objet. L'agent peut "atterrir" sur l'objet de différentes façons : éternuement, postillons, contact manuel, mâchonnement... Selon la nature de l'agent infectieux et de l'objet, le microbe y survivra plus ou moins longtemps (ex. : les virus grippaux peuvent survivre jusqu'à 12 heures sur un vêtement). Pour donner un exemple classique de "fomites", les jouets des crèches et autres maternelles sont souvent des sources de contagion (**Pierrick , 2014**).

L'un des fomites les plus omniprésents dans le milieu de la santé est le clavier **Enemuor en 2012** a cherché à isoler et à identifier les microorganismes associés aux Claviers informatiques et aux souris dans les centres informatiques et cybercafé situés dans l'état de Kogi Université, Anyigba, Nigeria et ses environs. Des échantillons ont été recueillis auprès de cinq cybercafés et centres informatiques. Les échantillons ont été prélevés sur trois claviers informatiques et Souris dans chaque cybercafé et centres informatiques. Les échantillons collectés ont été inoculés dans plusieurs milieux de cultures suivant les méthodes standard. Les isolats obtenus ont été examinés et identifiés par morphologie coloniale, coloration de Gram et caractéristiques biochimiques. plusieurs espèces bactériennes et fongiques ont été isolées de ces échantillons .

Ces microorganismes ont un grand potentiel pathogène et donc leur présence sur de telles surfaces (claviers informatiques et souris) peuvent être des réservoirs supplémentaires pour la transmission de microorganismes et devenir des vecteurs de transmission croisée d'infections bactériennes et fongiques (**Kelly, 2014**).

4- Les principales causes d'une contamination d'un clavier

Certains claviers d'ordinateurs abritent des bactéries qui présentent un risque élevé de rendre malade leur utilisateur. La saleté et les bactéries peuvent s'incruster partout autour de notre bureau (dans notre clavier, à la surface de notre souris, sur l'écran... etc.) ; mais la présence de ces derniers sur les claviers d'ordinateur peut causer des intoxications alimentaires (**Carlier, 1986**).

Les principales causes d'une contamination sont :

- le fait de déjeuner à son bureau : les gens mangent leur casse-croûte ou leur repas tout en étant sur l'ordinateur ; miettes de nourriture, boissons répandues et poussière qui se déposent dans les petites crevasses (entre les touches d'un clavier d'ordinateur) et forment un terrain propice pour les microbes. Donc les restes alimentaires sont propices au développement de millions de bactéries (**Jones, 1994**).

- Une mauvaise hygiène personnelle, comme de ne pas se laver les mains après être allé aux toilettes peut aussi être une cause.

- La plupart des services de nettoyage de bureaux ne touchent pas aux ordinateurs ni aux claviers de peur de les endommager. Leur nettoyage est laissé aux employés, et nombreux sont ceux qui négligent de le faire. La malpropreté des postes de travail peut donc représenter un danger pour la santé publique [90]

5- Localisation des microorganismes dans l'environnement des salles informatiques

Le terme environnement public et spécifiquement celui des salles d'informatiques regroupe habituellement l'air, les surfaces (mur, sol, plafond), les matériels informatiques (clavier, souris, l'écran d'ordinateur, l'imprimante, photocopieuse), et les outils bureautiques (table de travail, les chaises, les armoires et le climatiseur).

endroits, ces derniers peuvent devenir un réservoir idéal à la survie et à la prolifération de plusieurs genres des microorganismes (bactéries, virus, champignons). et lorsque les conditions sont favorables (humidité, température, nourriture) ces microorganismes peuvent survivre longtemps (**Klinger et al., 2005**).

Les besoins de développement des bactéries sont étroitement liés aux réservoirs humains et environnementaux. Ils nécessitent des sources : d'énergie, de carbone, et d'azote afin de combler leurs besoins nutritionnels, la majorité des bactéries sont tolérantes à la présence ou l'absence d'oxygène libre dans leur environnement, même si quelques-uns ne le sont pas. Les niveaux de température et d'humidité jouent aussi un rôle énorme dans la survie des bactéries (**Singleton, 1999**).

Tab 1 : Le survie de quelques bactéries sur différents milieux(Klinger *et al* ,2005)

Les bactéries	Les milieux
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	poussière : 90 – 120 jours ; tapis : 70 jours expectoration : 6 – 8 mois (lieu frais et obscur)
<i>Staphylococcus aureus</i>	verre : 46 heures ; pièce de monnaie : 7 jours ; peau : 30 mn – 38 jours
<i>Escherichia coli</i> entérotoxigène	poussière : 4 – 27 jours ; matières fécales : 84 jours ;doigt : 45 mn ; sol : 84 jours
<i>Shigella spp.</i>	chemise malade : 8 jours ; matières fécales : 11 jours
<i>Enterobacter spp.</i> <i>Legionelle</i>	réservoirs d'eau des oxygénateurs, nébuliseurs, incubateurs, climatiseur
<i>Klebsiella spp.</i>	verre : 4 heures, poussière : plusieurs jours

5.1-Localisation des microorganismes dans l'air :

L'air d'une salle d'informatique présente un danger potentiel de contamination microbienne, Il intervient donc comme un transporteur (vecteur) des germes causant ainsi de nombreuses maladies.

Les germes présents dans l'air des lieux publics en particulier les salles d'informatique se répartissent en deux groupes :

-Les microorganismes de l'air extérieurs : c'est la flore saprophyte de l'environnement les microorganismes provenant de l'intérieur des cybercafés souvent d'origine humaine c'est la flore commensale humaine (**Bergeron, 2009**).

5.2-Localisation des microorganismes sur les surfaces inertes :

L'adhérence des bactéries aux surfaces inertes est un processus initial clé de nombreuses contaminations microbiennes qui peuvent avoir des conséquences éventuellement à la base de la survenue d'infections.

L'adhérence à des surfaces abiotiques aux propriétés différentes (verre, polypropylène et polystyrène, minérale, plastique, bois...etc.) de souches bactériennes appartenant à différentes espèces de coliformes (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris*, *Providencia stuartii* et *Morganella morganii*) (**Larpen, 1992**).

La survie et éventuellement la multiplication des bactéries est conditionnée par la nature, l'importance de la colonisation environnementale et la capacité de l'environnement à devenir un réservoir dans lequel le micro-organisme persiste et éventuellement une source à partir de laquelle celui-ci va être transmis (**Leleu ,1984**).

Cette survie dans l'environnement, favorisée par la formation de biofilms au niveau des surfaces, varie selon les bactéries et la nature des surfaces contaminées. *Staphylococcus aureus* et *Acinetobacter baumannii* sont les espèces parmi les plus résistantes à la dessiccation et peuvent survivre plusieurs semaines sur des surfaces sèches [52], devant *Pseudomonas aeruginosa*, certaines entérobactéries comme *Serratia marcescens* et les entérocoques qui peuvent survivre plus d'une semaine (**Neely et al .,2002**).

Escherichia coli est une entérobactérie beaucoup moins résistante à la dessiccation. La survie particulièrement longue, atteignant plus de 6 mois est décrite, dans des conditions d'humidité et en présence de matières organiques (**Klinger et al.,2005**).

Les biofilms est une communauté hétérogène de bactéries agrégées en microcolonies, entourées par une matrice adhérentes à une surface inerte ou biologique. On retrouve sur la plupart de surfaces animales, végétales (tissus... etc.) et minérales (tels que les métaux, les plastiques... etc.) (**Kramer, 2006**).

Contrairement aux idées reçues, les biofilms sont le mode de vie normal des bactéries. Le problème majeur avec cette forme de vie est qu'elle confère une résistance importante à différents stress : UV, toxicité de métaux, dessiccation, déplétion en nutriment et surtout aux antibiotiques (**Cristian, 2011**).

Dans l'environnement humain , en particulier dans les salles informatiques les biofilms peuvent se développer très facilement car ils fournissent un environnement humide et chaud pour le biofilm à prospérer. En générale on peut conclure que les biofilms étant à l'origine de nombreux problèmes de santé publique. (**Jawad et al, 1996**).

5-2-1- Sur les outils bureautiques:

Les outils bureautiques en particulier la table de travail et les chaises sont donc touchés par de nombreuses personnes pendant la journée, ce qui entraîne la contamination par diverses bactéries [71].

Bien souvent, les gens mangent leur repas sur la table de travail tout en utilisant l'ordinateur, donc les miettes de nourriture, les boissons répandues et la poussière se déposent sur la table est forme alors un terrain idéal pour les microbes (**Jones ,1995**).

Une nouvelle étude indique que les chaises de bureaux sont les endroits les plus sales que le clavier d'ordinateurs, ces derniers sont les endroits que les bactéries préfèrent. Dans le rembourrage de nos chaises, nous êtres humains leur procurons un

milieu propice à leur développement. Celles -ci apprécient tout particulièrement la chaleur dégagée et l'humidité ambiante [86]

5-2-2- sur les matériels informatiques :

Les germes sont partout et en particulier sur tous les objets technologiques. Ainsi tous les appareils qu'on touche avec les mains sont des nids à bactérie. [75]

Le partage des claviers et souris d'ordinateur peut causer des problèmes sanitaires, car ces derniers sont des transmetteurs de germes et de bactéries. Etant donné qu'un grand nombre de personnes utilisent l'ordinateur et ses accessoires, ces derniers sont susceptibles d'être contaminés par ces germes.

Au lieu de s'intéresser aux infections nosocomiales, ces derniers temps, on dirige nos efforts plus sur la propagation des germes de matériel informatique qui devient aujourd'hui un problème grave [89]

Le clavier

Le clavier d'ordinateur est un des principaux foyers de bactéries et autres germes qui se nichent à la surface et entre les touches et sont très difficiles à déloger [83]

selon une enquête scientifique britannique, ce dernier est un point d'entrée privilégié pour les bactéries et peut abriter plus de bactéries dangereuses pour la santé que la moyenne des sièges de toilettes. Il a été découvert que sur un clavier il y aurait 400 fois plus de bactéries que sur le siège des toilettes (Charles, 2008).

Selon cette étude, menée par le Pr. Charles Gerba, au palmarès des nids à microbes nous trouvons dans l'ordre décroissant les éléments suivants: (Tableau N°02)

Tableau 02 : La densité des germes sur quelques surfaces (Charles, 2008)

Surfaces étudiées	Germes par centimètre carré
Table de travail (bureau)	20 961
Clavier d'ordinateur	3 295
Souris d'ordinateur	1 676
Fax	301
Photocopieuse	69
Cuvette de toilettes	49

Le clavier héberge plus de 3000 microbes par centimètre carré alors que les sièges de toilette n'en abritent que 49, Les résultats de cette étude ont permis de constater qu'un clavier d'ordinateur peut contenir des bactéries en nombre assez important pour constituer un risque pour la santé (Charles , 2008).

6-les principaux microorganismes provenant d'une salle informatique :

L'environnement des salles d'informatiques est largement contaminé par des micro-organismes d'origine humaine ou spécifiquement environnementaux . Cette contamination varie qualitativement et quantitativement dans le temps, d'un endroit à un autre et, au sein d'un même endroit, en fonction des gens qui manipule les claviers d'ordinateurs dans les salles, leurs propriétés, et aussi leurs santé (sain ou malade)[75]

Les microorganismes présents dans l' environnement des salles informatiques sont extrêmement variés (bactéries, levures, champignons filamenteux, virus et parasites) et peuvent appartenir aussi bien aux espèces opportunistes qui ne manifestent leur virulence que sur un organisme dont les défenses immunitaires sont affaiblies, qu'aux espèces habituellement pathogènes pour l'homme (Cristian , 2011).

En générale on peut conclure que l'environnement des salles informatiques est considéré comme un réservoir de microorganismes, parmi ces derniers :

6.1-Les bactéries :

6.1.1-Legionella:

- **Description :**

Les Legionelles sont des petits bacilles à Gram négatif mobile ou immobile polymorphes, filamenteux souvent immobiles aérobies strictes .Il existe à ce jour plusieurs espèces et sérogroupes tel que *Legionella pneumophila*.

- **Habitat :**

C'est une bactérie ubiquiste (largement répandue dans la nature), non commensale, à développement intracellulaire facultatif. *In vitro*, c'est une bactérie exigeante : elle ne pousse que sur des milieux spéciaux et lentement (3-4 jours et jusqu'à 10 jours). C'est une bactérie hydrotellurique (eau et sol). *Legionella* vit dans les eaux douces (lacs, rivières, eaux stagnantes...), mais aussi la terre humide et les composts. Elle se multiplie dans des protozoaires libres (amibes) de l'environnement avec lesquels elle vit en symbiose. Les températures optimales de multiplication sont entre 25 et 45°C.

- **Réservoirs artificiels :**

- Systèmes de climatisation « humides » : d'humidificateur, fontaine fraîche.

- **Mode de contamination :**

La transmission des infections à *legionelles* se fait par voie aérienne par inhalation c'est la seule voie de contamination démontrée à ce jour. Les *legionelles* infestent les macrophages alvéolaires. On a signalé qu'il n'y a pas de contamination interhumaine, et pas de transmission manuportée (**Cristian, 2011**).

6.1.2- Les entérobactéries:

Les entérobactéries sont dominées par l'espèce *Escherichia coli* responsable d'infections urinaires et bactériémies nosocomiales, mais parmi les bactéries constituant cette famille, on retrouve aussi les genres *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, qui appartiennent normalement à la flore digestive habituelle et peuvent contaminer l'eau ou les surfaces (**Bauer et al., 1990**).

6.1.2.1- *Escherichia coli* :

- **Description :**

C'est l'espèce dominante de la flore aérobie, du digestif. *E. coli* ou colibacille est habituellement une bactérie commensale, représente 80 % de la flore intestinale aérobie de l'adulte, elle se répond dans la nature: sol et eau, et on peut la retrouver également au niveau de diverses muqueuses de l'homme et des animaux ; et elle est présente à raison de 10^7 à 10^9 bactéries/gramme de selles .

E. coli possède tous les caractères communs aux *Enterobacteriaceae*. Cette espèce est le plus souvent mobile, Gram négatif, aérobie, en forme de bâtonnets, non sporulées, cytochrome oxydase négative, capable de croître en présence de sels biliaires ou d'autres agents antibactériens similaires, fermentant le lactose à 44°C avec production de gaz et produisant de l'indole à 44°C (**Cristian, 2011**).

- **Habitat :**

E. coli est une espèce commensale du tube digestif de l'homme et des animaux. La présence de *E. coli* sur les surfaces est le témoin d'une contamination fécale récente (**Kramer, 2006**).

- **Pouvoir pathogène:**

L'espèce *E. coli* est responsable de :

-Infections extra- intestinales :

- ✓ Infections urinaires:

La majorité des infections urinaires est due à *E. coli* ; l'anatomie du bas appareil urinaire féminin permet facilement aux souches de *E. coli* de la flore fécale d'atteindre la vessie par voie ascendante. De plus certaines souches de *E. coli* sont dotées à leur surface de structures, les *andésines*, qui leur permettent d'adhérer spécifiquement aux épithéliums de l'appareil urinaire.

- ✓ Infections abdominales: Ce sont des cholécystites péritonites ou salpingites.

- ✓ Infections méningites: Les méningites néonatales sont souvent graves.

- ✓ Les bactériémies: Consécutives a une infection localisée peuvent évoluer vers un choc septique.

-Infections intestinales:

Les diarrhées infectieuses a *E. coli* peuvent revêtir des formes différentes en fonction des facteurs de virulence (Marie *et al.*, 2002).

6.1.2.2 *Salmonelles*

- **Description :**

Les salmonelles sont des bactéries entériques en forme de bâtonnets, anaérobies facultatives, à Gram négatif, mobiles pour la plupart avec des flagelles péritriches, qui produisent du sulfure d'hydrogène. La nomenclature des *salmonelles* est particulièrement complexe. La notion d'espèce est peu employée pour le genre *Salmonella* et on réfère plutôt au sérotype. Ce genre contient plus de 2 000 sérotypes différents (Orth *et al.*, 2006).

- **Habitat :**

Les *Salmonella* ou salmonelles, sont très largement répondues dans la nature et leur réservoir s'étend à tout le règne animal. On les trouve dans le tube digestif des malades et des porteurs sains, chez l'homme et chez l'animal qui contaminent le milieu extérieur par leurs excréments. Les *Salmonelles* peuvent survivre plusieurs semaines en milieu sec et plusieurs mois dans l'eau (Noskin *et al.*, 1995).

- **Mode de contamination**

La transmission des infections à *Salmonella* se fait principalement par l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés, mais se qui concerne les cybercafés les principale mode de transmission sont les mains sales (Dryden , 1994).

- **Pouvoir pathogène :**

Les salmonelloses peuvent revêtir trois aspects :

- Les formes septicémiques:

Ce sont les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes dues a *Salmonella typhi*, *salmonella paratyphi A*, *B* et rarement *C*. Ce sont des septicémies à point de départ lymphatique. (Anonyme)

- Les salmonelloses purement digestives:

Les toxi-infections alimentaires à *Salmonella* se manifestent par des diarrhées, de la fièvre et des vomissements, les premiers signes surviennent 8 a 10 heures après l'ingestion de l'aliment contaminé. Les entérites à *salmonella* s'observent principalement chez le jeune enfant. Des épidémies peuvent survenir dans des collectivités de nourrissons.

- Les formes extradiigestives:

Se sont principalement des infections Pleuropulmonaires, Ostéo-articulaire, neuroméningée, abcès de la rate.

6.1.2.3-*Shigella*:

Les *Shigella* sont des bactéries intestinales rencontrées seulement chez l'homme. Celui-ci les élimine par ses selles et les disperse dans le milieu extérieur (sol, eau) où elles ne survivent pas longtemps. La contamination se fait par voie digestive, la transmission interhumaine s'opère facilement, elle peut être directe, par les mains, ou indirecte par l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminés (**Dryden, 1994**).

- Pouvoir pathogène :

Les *Shigella* provoquent des ulcérations de la muqueuse intestinale et une réaction inflammatoire. Les moins rares sont les infections urinaires. On observe par fois des formes bactériémiques, des arthrites et des méningites (**Jawad et al., 1996**).

6.1.2.4-*Citrobacter*:

Citrobacter est une bactérie aérobie, Gram -négative, appartenant aux entérobactéries, touchant le tractus gastro- intestinal, l'arbre urinaire, les poumons, les plaies, les tissus mous, l'os et les méninges. La présence de *Citrobacter* dans le sang est fréquemment associée à des bactériémies poly -microbiennes chez des patients avec une pathologie sous-jacente. (**Ferron, 1984**)

6.1.3-*Staphylococcus aureus* :

Bien que *Staphylocoque* contamine largement les surfaces, l'air et l'eau, l'homme en est le principal réservoir, qu'il soit malade et porteur de lésions, ou bien porteur sain (30 à 50 % de la population) surtout au niveau des fosses nasales, ses annexes...etc (**Dryden, 1994**).

- **Description :**

Le microorganisme *Staphylococcus aureus* est une bactérie de la famille des Micrococcaceae de forme sphérique (coque), de 0,8 µm à 1,0 µm de diamètre. Ces coques à Gram positif se présentent généralement en grappes, par paires ou en cellules individuelles compte tenu de l'âge de la culture. C'est une bactérie non mobile, asporulée et aérobie facultatif possédant une catalase (**Carlier, 1986**).

- **Habitat :**

Les *staphylocoques* trouvés dans les surfaces proviennent principalement de la peau, de la bouche, du nez et de la gorge des personnes et occasionnellement d'une pollution fécale. Les *staphylocoques* pathogènes (*S. aureus*) produisent plusieurs types d'enzymes qui participent à l'invasion d'un hôte (**Dryden, 1994**).

- **Pouvoir pathogène**

S. aureus est un microorganisme pathogène dont on connaît au moins deux types de manifestations cliniques chez l'homme. Les *staphylocoques* sont d'abord souvent mis en cause dans les cas de toxi-infections alimentaires où il y a production d'une entérotoxine thermorésistante responsable de gastro-entérites. Ils sont également responsables d'infections rhinopharyngées et cutanées qui sont de loin prédominantes par rapport aux infections gastro-intestinales (**Avril et al., 1992**).

Acinetobacter:

Ce sont des bactéries Gram négatives, non sporulées, parfois capsulées, immobile, aérobies. Ils sont ubiquistes et se trouvent dans tous les milieux (eau, sol, peau, poussières...) Ils sont capables de développer le film bactérien. Leur transmission se fait par contact avec les mains (**Azel, 1984**).

2 -Les champignons

Parmi les autres micro-organismes impliqués dans les infections à partir des cybercafés, les levures et surtout les champignons filamenteux environnementaux (*Aspergillus* spp.) sont très bien adaptés à la survie et la multiplication dans cet environnement (**Dryden, 1994**).

2.1-Aspergillus :

Aspergillus sp représente une faible proportion des champignons filamenteux (moisissures), deux cent espèces sont connues et seule une trentaine est pathogène pour l'homme ; les plus représentées : *aspergillus fumigatus* et *A.flavus* ils sont ubiquitaires (végétaux, sol, l'air, poussières ...). Leur mode de contamination est aéroportée (**Costerton et al., 1999**).

- **Les effets des moisissures sur la santé :**

Lorsque les conditions propices à la croissance des moisissures sont présentes dans une habitation ou un édifice public et qu'elles ne sont pas contrôlées, les moisissures peuvent proliférer, coloniser divers substrats et se retrouver éventuellement dans l'air ambiant. En effet, les spores des moisissures croissant en surface des matériaux sont facilement aérosolisables. De plus, des fragments de mycélium, des particules de matériaux contaminés ou de la poussière contenant des particules fongiques déposées, peuvent également être aéroportés. L'exposition aux particules fongiques (spores, fragments) ou aux métabolites fongiques pourra donc se faire par inhalation ou, dans une moindre mesure, par contact physique (exposition cutanée) ou plus rarement encore, par ingestion. Les effets des moisissures sur la santé des occupants seront fonction du type et de l'importance de l'exposition, de la nature de l'agent en cause et de la susceptibilité des individus exposés (état de santé, âge, etc.). (**Moustardier, 1972**).

2.2-Candida :

Le Candida est un champignon de forme ovale ou circulaire, il est souvent représenté comme une boule plate ramifiée ou comme de petits bourgeons. Il est présent dans l'appareil digestif, sur l'épiderme et peut provoquer des maladies à ces endroits dans le cas d'un affaiblissement de l'organisme (**Leleu, 1984**).

3-Les Virus :

Les infections virales peuvent être à l'origine d'infection à transmission direct (les infections respiratoires, les infections de l'œil , etc....).Les virus responsables d'infection à partir des cybercafés sont nombreux et appartiennent à des familles virales distinctes Comme exemple les rotavirus qui sont capables de survivre plusieurs jours sur les mains et 1 à 10 jours ou plus sur les surfaces sèches et non poreuses dans un environnement faiblement humide (<50%) (**Dryden, 1994**).

Chapitre II

Risque microbiologique liée à l'usage des claviers d'ordinateurs



Chapitre III

Matériels et méthodes



Matériel et méthodes

I- Matériel :

Le matériel et les réactifs utilisés dans la partie expérimentale sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau N°06: Matériel utilisé dans notre travail.

Appareillages	les milieux de culture	Les réactifs et les colorons utilisés	Autres matériels
-Autoclave. -Etuve. -Réfrigérateur.	-Gélose nutritive. -Gélose Hektoen. -Gélose Chapman. -Gélose Mac Conkey. -Gélose SS. -Milieu TSI. - Milieu Sabouraud -Bouillon BCPL -Bouillon Schubert -Bouillon Roth -Bouillon Litsky Eva	-L'alcool a 95° -Fuchsine. -Huile de cèdre. -Lugol. -Réactifs de Kovacs. -Réactif de TDA. -Rouge de méthylène -Violet de Gentiane. -Voges-Proskauer (VPI,VPII) -Peroxyde d'hydrogène -Disque d'oxydase -Disque ONPG -Serum humain(O+) -Disques d'antibiotique (Gentamicine + Chloramphénicol)	- Etiquettes. -Anse de platine. -Bec bunsen. -Boîte de pétri steriles -Ecouillons. -Micro pipette. Tubes à hémolyse -Système API20E. -Système API20NE -Système API Staph. Verrerie : -Lames et lamelles. -Pipettes Pasteur. -Tubes à essai sterile

II -Méthodes :

1-Cadre d'étude :

L'objectif de notre travail est l'isolement et l'identification des bactéries provenant lors de l'utilisation des claviers d'ordinateurs de la bibliothèque de l'Université 8 Mai 1945 de Guelma ainsi que leur dénombrement afin de vérifier le niveau d'hygiène dans ces endroits qui peuvent être la cause de la propagation de plusieurs maladies infectieuses. Nos analyses ont été effectuées au niveau du laboratoire de microbiologie de l'Université de 8 Mai 1954 de Guelma.

2-Échantillonnage et méthode de prélèvement

2-1-Échantillonnage

De nombreuses méthodes de mesures de la contamination des surfaces sont aujourd'hui Proposées. Parmi ces dernières, nous pouvant citer la technique de chiffonnage, la technique de recouvrement des surfaces par gélose, la technique d'écouvillonnage, la technique de scotch test...etc. Dans notre étude , nous avons choisi la méthode d'écouvillonnage car elle est simple , très pratique et s'applique à toutes les types de surfaces (planes et /ou non planes). Cette technique nous permet de prélever les parties les plus difficiles comme l'espace entre les touches d'un clavier.

Les échantillons ont été prélevés à partir des claviers des ordinateurs de la salle d'informatique au niveau des endroits déterminés selon le tableau suivant :

Tableau N° 07 : Présentation des posts de prélèvement.

Prélèvement	Date et heure de prélèvement	Numéro de prélèvement	mode de prélèvement
La Salle de consultation N°1 de la faculté "SNV-STU "	05/03/2017 (09 :05)	P 01	Écouvillonnage sur clavier
	05/03/2017 (09 :08)	P 02	Écouvillonnage sur clavier
	05/03/2017 (09 :11)	P 03	Écouvillonnage sur clavier
	05/03/2017 (09 :13)	P 04	Écouvillonnage sur clavier
	05/03/2017 (09 :14)	P 05	Écouvillonnage sur clavier

Le hall de réception gauche de la faculté « SNV-STU »	05/03/2017 (09 :18)	P 06	Écouvillonnage sur clavier
	05/03/2017 (09 :22)	P 07	Écouvillonnage sur clavier
	05/03/2017 (09 :25)	P 08	Écouvillonnage sur clavier
Le hall de réception droite de la faculté des langues étrangères	05/03/2017 (09 :27)	P 09	Écouvillonnage sur clavier
	05/03/2017 (09 :30)	P 10	Écouvillonnage sur clavier
	05/03/2017 (09 :33)	P 11	Écouvillonnage sur clavier
	05/03/2017 (09 :36)	P 12	Écouvillonnage sur clavier
La salle de consultation N°2 des départements de français, d'anglais et d'arabe	05/03/2017 (09 :40)	P 13	Écouvillonnage sur clavier
	05/03/2017 (09 :43)	P 14	Écouvillonnage sur clavier
	05/03/2017 (09 :45)	P 15	Écouvillonnage sur clavier
	05/03/2017 (09 :47)	P 16	Écouvillonnage sur clavier

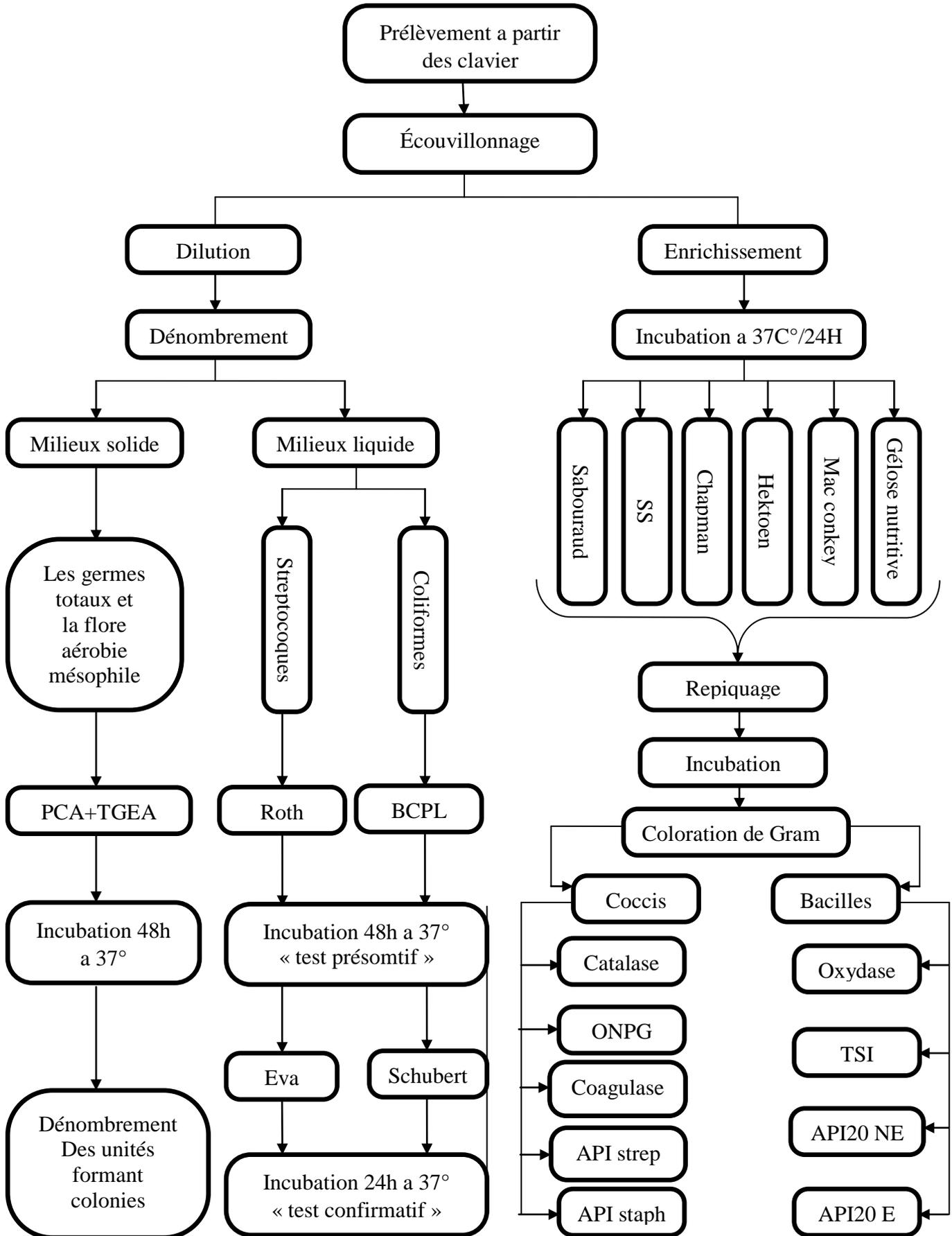


Figure N°8 : Schéma représentatif du protocole du travail



Figure N°9 : Les points analysés dans la salle d'informatique (photos personnelles)

2.2-Prélèvement des surfaces (clavier)

Les prélèvements ont été réalisés à l'aide des écouvillons stériles et humidifiés avec une eau distillée stérile que l'on frottait directement sur les surfaces à analyser après manipulation par les étudiants (Figure N° :9)

Remarque : Les prélèvements ont été étiquetés (date, et site de prélèvement).

3-Enrichissement

Enrichir, c'est augmenter la représentation (proportion) d'un sous-groupe de micro-organismes dans un ensemble plus vaste. La présence de certaines bactéries à pouvoir pathogène spécifique dans un prélèvement, a une signification pathologique indiscutable, même si elles sont peu représentées. C'est le cas par exemple des *Salmonella*, des biotypes entéropathogènes, de *Yersinia enterocolitica*, des vibrions cholériques ou encore des *Listeria* ou des Enterocoques. Quelques fois, leur proportion peut être minime par rapport à celle de la flore commensale et leur présence ne peut être révélée par un isolement (sélectif). L'absence de colonies suspectes sur l'isolement sélectif ne suffit pas pour affirmer l'absence de ces bactéries dans le prélèvement. C'est pourquoi un enrichissement est mis en route en même temps que l'isolement (Guillaume,2004).

Un milieu d'enrichissement réunit deux caractéristiques :

- Il contient des molécules à action sélective inhibant totalement ou partiellement la culture des micro-organismes non recherchés ou utilise une température d'incubation particulière, ou encore une atmosphère particulière ;
- Il est liquide (bouillon) afin que son action sélective s'exerce sur une population importante et homogène (**Guillaume, 2004**).

Le Bouillon nutritif est un milieu largement utilisé pour la culture des micro-organismes peu exigeants. Il est recommandée dans de nombreuses méthodes standardisées d'analyses des aliments, des laitages, de l'eau et d'autres produits (**Eaton et al., 1995**)

Après avoir effectuer les différents prélèvements, les écouvillons sont introduits dans des tubes de Bouillon nutritif. Les tubes sont ensuite acheminés au laboratoire dans un délai qui n'a pas dépassé trois heures ou ils ont incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures.

4-Isolement :

Un isolement consiste à disperser des micro-organismes à la surface d'un milieu gélosé en boîte de Pétri : cela permet d'obtenir des colonies bien distinctes. La méthode la plus utilisée est la méthode des quadrants : à partir d'un point de dépôt, les bactéries sont étalées sur les 4 quadrants successifs de la gélose [90].

A partir des milieux d'enrichissement nous avonsensemencé plusieurs milieux de culture gélosés afin d'isoler le maximum des bactéries présentes sur les surfaces analysées. L'ensemencement a été effectuée par des stries transversales sur des boîtes de Pétri contenant les géloses suivants :

Gélose Nutritive

Une gélose nutritive est un milieu gélosé qui permet la culture de toutes les espèces bactériennes, Ce milieu est dit non sélectif car il ne permet pas de sélectionner une souche bactérienne précise. Ce milieu permet donc à toutes les souches bactériennes de pouvoir pousser, à condition qu'elles soient non exigeantes, autrement dit que les souches peuvent pousser sur un milieu minimum, qui n'apporte que les éléments essentiels à leur développement (**Guillaume, 2004**).

Cette gélose est utilisée dans le cadre de la microbiologie pour la culture d'une grande variété de microorganismes (*Salmonella*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Yersinia*, *Shigella*...etc.). L'utilisation de ce milieu doit conduire à l'obtention de colonies bien isolées (Larpen, 1997)

Gélose Hektoen : est un milieu sélectif permettant l'isolement et la différenciation des entérobactéries pathogènes. En présence de thiosulfate de sodium, les microorganismes producteurs de sulfure d'hydrogène réduisent le citrate ferrique ammoniacal et se manifestent par un noircissement dû à l'apparition des sulfures de fer au centre des colonies (Guillaume, 2004).

Gélose Chapman : est un milieu sélectif pour l'isolement et la numération des staphylocoques. Il permet également de différencier les espèces fermentant le mannitol de celles qui ne le fermentent pas. S'il y a fermentation, cela induit une acidification qui entraîne une coloration jaune du milieu en présence du rouge de phénol (indicateur de pH). La sélectivité de ce milieu est basée sur la présence des chlorures de sodium qui inhibe la plupart des bactéries à Gram (+) et à Gram (-)(Guillaume, 2004).

Gélose SS: est un milieu solide, sélectif pour l'isolement des *Salmonella* et des *Shigella*. Il inhibe totalement la croissance des bactéries à Gram positif et partiellement celle de nombreux coliformes et *Proteus* (Guillaume, 2004).

Gélose Mac Conkey: est une gélose utilisée pour l'isolement des Entérobactéries, ainsi que la différenciation entre les bactéries qui fermentent le lactose (Lac+) et celle qui ne le fermentent pas (Lac⁻). Ce milieu est caractérisé par :

-La fermentation du lactose en acide est révélée en présence de rouge neutre par la formation de colonies roses ou rouges.

- Les microorganismes lactose-négatif présentent des colonies incolores (joseph, 2003)

Gélose Sabouraud : La gélose Sabouraud constitue un milieu classique pour la culture, l'isolement et l'identification des levures et des moisissures saprophytes ou pathogènes. Elle est recommandée essentiellement pour l'isolement des moisissures dans les prélèvements peu chargés en bactéries, les contrôles de stérilité des produits pharmaceutiques, cosmétiques ou alimentaires, la culture des moisissures en vue de

réaliser leur identification. Dans le cas de prélèvements fortement contaminés, il est préférable d'utiliser la gélose Sabouraud + chloramphénicol (**Guillaume, 2004**).

5-Purification

La purification consiste à effectuer des repiquages successifs sur gelose nutritive, Chapman, Hektoen, Mac Konkey jusqu'à l'obtention de colonies pures bien distinctes et homogènes. La purification des souches sur milieu gélosé se fait par la méthode des stries (**Nehal, 2007**).

Chaque type de colonies va subir un réisolement dans le but d'obtenir à partir des souches présentes des colonies nettement distinctes, non contaminées autrement dit les cultures pures. La purification est effectuée sur des boites ou tubes contenant les milieux Chapman, GN, ou Muller Hinton. La technique consiste à prélever quelques colonies à partir des géloses utilisées, à l'aide d'une anse de platine préalablement flambée et refroidie, qu'on dispose à la surface de la gélose et on ensemence par la méthode des stries. Les boites de Pétri et les tubes sont mis en incubation durant 37°C pendant 24 à 48 heures (**Bousseboua, 2003**)

6- Identification :

6.1- Aspect macroscopique :

L'identification des germes débute par sur l'observation de l'aspect macroscopique des colonies obtenues à partir des différents milieux d'isolement. Cette observation servira de moyen d'orientation pour une identification plus approfondie (**Bousseboua, 2003**)

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation. l'aspect des colonies dépend du milieu utilisé de la durée et de la température de l'incubation. Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir de colonies bien isolées : les colonies sont d'autant plus petites qu'elles sont rapprochées. la colonie peut apparaître à la surface du milieu de culture pour les germes aérobies, ou être en profondeur pour les germes anaérobies .

6.1.1. La taille

Elle peut être mesurée à l'aide d'une règle graduée pour les grandes colonies. Il est possible aussi d'utiliser le microscope au grossissement le plus faible pour mesurer la taille des petites colonies en utilisant de micromètres oculaires.

6.1.2 La forme

- Allure de contours : lisse, dentelés, déchiquetés, irréguliers
- Relief : surface bombée, demi-bombée, plate.
- Centre : parfois surélevé, parfois ombiliqué (en creux)

6.1.3 L'aspect de la surface : La surface d'une colonie bactérienne peut être lisse, rugueuse, renvoyer la lumière de façon à leur donner un reflet métallique ou un aspect irisé.

6.1.4 La consistance : Au moment du prélèvement, il est possible d'apprécier si les colonies sont grasses, crémeuses (on obtient facilement des suspensions homogènes), sèches ou encore muqueuses (on obtient difficilement des suspensions homogènes).

6.1.5 La couleur et/ou pigment : Plusieurs colonies n'ont pas une couleur bien définie (blanc, gris). Par contre, certaines bactéries produisent un pigment insoluble qui donnent un aspect bien caractéristique à la colonie (rose, jaune, rouge ...), tandis que d'autres produisent un pigment soluble qui diffuse et colore le milieu (**Avril, 2007**).

6.2- Aspect microscopique :

A partir des colonies suspectes sur les différents milieux gélosés, on réalise un examen après coloration, selon les étapes suivantes

-Examen microscopique après coloration de Gram

L'examen microscopique après une coloration de Gram nécessite au départ une préparation d'un frotti, une colonie bien isolée d'une culture en milieu solide sera prélevée et mise en suspension dans une goutte d'eau distillée stérile. L'observation se fait à l'objectif (X100), Cette coloration permet de différencier les bactéries selon deux critères :

- Leur forme (bacille, cocci, ... etc.),
- Leur affinité pour les colorants, en Gram positif et Gram négatif.

Elle se déroule en plusieurs étapes qui se succèdent et consiste à:

- 1- Fixer de frottis.
- 2- Recouvrir le frottis de la solution de cristal violet. Laisser agir 1 minute.
- 3- Rejeter le colorant. Laver à l'eau.
- 4- Recouvrir la préparation de Lugol. Laisser agir 1 minute.
- 5- Rejeter le Lugol. Laver à l'eau.

- 6- Décolorer à l'alcool 95°.
- 7- Rincer à l'eau courante.
- 8- Recouvrir la lame de la solution de Fuchsine diluée. Laisser agir quelques secondes et rejeter la Fuchsine.
- 9- Laver abondamment à l'eau, égouttée, sécher entre deux feuilles de papier buvard très propres (**Dégrément, 1998**).

Résultats: Après ce traitement, les bactéries Gram positif sont bien colorées en violet, et les bactéries Gram négatif sont colorées en rose (**Boukrouma, 2008; Carbonnelle, 1988 ; Mamadou, 2005 ; Prescott et al., 2003**).

6.3- Études des caractères biochimiques :

6.3.1-Bacilles a Gram(-) :

6.3.1.1-Les Entérobactéries

A-Test de catalase : C'est une enzyme qui décompose l'eau oxygénée 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. Le dégagement de bulles gazeuses signe la présence de l'enzyme (**Fig. 10**) (**Carbonnelle, 1988**).



Fig. 10. Test de catalase (+)

B-Test d'oxydase : La recherche de l'oxydase s'effectue avec des disques prêts à l'emploi . Déposer le disque sur une lame porte-objet, l'humidifier avec deux gouttes d'eau distillée stérile et écraser la colonie testée sur le disque. Une **réaction positive** se traduit par un **virage rapide du réactif de l'incolore au violet**. (**Fig. 11**) (**Carbonnelle, 1988; Labres, 2004**).

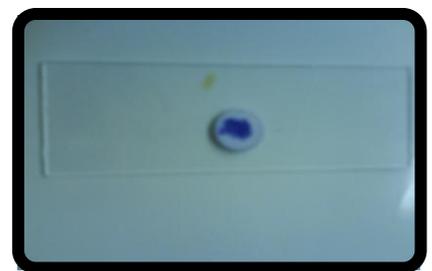


Fig. 11. Test d'oxydase(+)

C-Utilisation de TSI (Triple Sugar Iron Agar) :

Le but de ce test est de mettre en évidence cinq caractères :

- Fermentation du Glucose
- Fermentation du Lactose
- Fermentation du Saccharose
- Production de Gaz
- Production d'hydrogène sulfureux (H₂S). (**Lebres, 2004**).

Le milieu de TSI est un milieu gélosé contenant du glucose, du lactose, du saccharose, de la peptone, un sel de fer et un indicateur de pH, le rouge de phénol. Ce milieu est reparti en tubes à essai sous forme semi-inclinée avec un haut culot et une petite tranche. Il est ensemencé par piqûre profonde du culot au fil droit et par ensemencement en stries de la tranche. Après une période de 24 h à 37°C le milieu est examiné.

Dans le culot, l'anaérobiose relative favorise l'utilisation du glucose qui entraîne une acidification et virage au jaune de l'indicateur. Sur la tranche, l'aérobiose favorise l'utilisation du lactose qui entraîne le virage au jaune de l'indicateur. L'acidification due au glucose, qui est en faible quantité, est neutralisée rapidement à ce niveau par l'alcalinisation provenant de la dégradation des peptones. L'acidification de la tranche indique donc bien l'utilisation du lactose. L'apparition des bulles dans le culot traduit la production du gaz, et d'un noircissement dû à la formation du sulfure de fer traduit celle de H₂S. Ce milieu sert aussi à la pratique des réactions à la β-galactosidase et la LDC (lysine décarboxylase). Ce milieu permet de différencier les *Salmonella* et *Shigella* [lactose(-), saccharose (-)] de la plupart des autres (**Boudraa, 2011**).

D-La galerie API 20 E

La galerie API 20 E est un système pour l'identification des Entérobactéries et autres bacilles Gram négatif, en utilisant 20 tests biochimiques standardisés et miniaturisés, ainsi qu'une base de données (**Fig. 12**).

Principe : La galerie API 20 E comporte 20 micro-tubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Mode opératoire : L'opération s'effectue selon les étapes suivantes :

- 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.
- Remplir tubes et cupules des tests : CIT, VP, GEL, avec la suspension bactérienne.
- Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests.
- Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leurs cupules avec l'huile de paraffine.
- Refermer la boîte d'incubation, coder et placer à 37 °C pendant 18-24 heures.

(Il est important de veiller à ne pas créer de bulles lors de l'inoculation qui pourraient fausser le résultat)

Lecture : Noter sur la fiche de résultat toutes réactions spontanées. Si le glucose est positif et/ou si 3 tests ou plus sont positifs : révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs.

- Test VP : ajouter une goutte de réactif VP1 et VP2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose franche ou rouge indique une réaction positive.
- Test TDA : ajouter une goutte de réactif TDA. Une couleur marron foncée indique une réaction positive..
- Test IND : ajouter une goutte de réactif de Kowacks. Un anneau rouge obtenu en 2 minutes indique une réaction positive.

La lecture de ces réactions se fait selon le profil numérique à l'aide du catalogue analytique API 20E (**Fig. 12**). (Aouissi *et al.*, 2007 ;Merzoug, 2009 ;Rouaiguia, 2010).



Fig. 12. La galerie API 20 E.

6.3.1.2-Identification des bacilles a Gram (-) non fermentaires

Les bacilles à Gram négatif non fermentaires sont des bactéries aérobies strictes qui se développent habituellement sur milieu ordinaire et qui sont caractérisées par un mode de production énergétique ne faisant pas intervenir la fermentation (**Richard et al., 1995**)

Environ 15 % de tous les bacilles Gram négatif se développant en aérobiose, isolés dans les laboratoires de bactériologie médicale, sont des non fermentaires. Deux espèces: *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter* représentent jusqu'à 75 % de ces isollements. Ces germes sont pour la plupart des pathogènes opportunistes dont l'habitat naturel est le milieu extérieur (**Gassama et al., 1999**)

Les bacilles à Gram négatif non fermentaires sont à l'heure actuelle mieux classées grâce à de nombreuses études génétiques ADN-ADN ou ARN-ADN, Nous pouvons distinguer un certain nombre de genres telque : *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Brevundimonas*, *Sphingomonas*, *Acinetobacter* (**Schuster, 2001**).

L'identification de ces bactéries bénéficie depuis de nombreuses années déjà de l'existence de plusieurs méthodes:

- Galerie classique avec un nombre limité de caractères
- Galleries API qui sont très performantes.

A-La galerie API 20NE : API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non enterobactéries et non fastidieux (ex. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc.) combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation, et une base de données. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le Tableau d'Identification **en annexe** .

• **Principe :** La galerie API 20 NE comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant 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. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification [91]

- Mode opératoire

- Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85 % Medium (2 ml) ou utiliser un tube contenant 2 ml de solution saline à 0.85 %, sans additif.
- A l'aide d'une pipette pasteur, prélever 1 à 4 colonies de morphologie identique, par aspirations ou par touches successives. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
- Réaliser une suspension d'opacité égale à 0,5 deMcFarland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.
- Remplir les tubes (et non les cupules) des tests NO₃ à PNPG avec la suspension précédente en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement. 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.
- Ouvrir une ampoule d'API AUX Medium comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" et y transférer environ 200 µl de la suspension précédente. Homogénéiser avec la pipette en évitant la formation de bulles.
- Remplir tubes et cupules des tests GLU à PAC en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave. Des cupules incomplètement remplies ou trop remplies peuvent entraîner des résultats incorrects.
- Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) pour former un ménisque convexe.
- Refermer la boîte d'incubation et incuber à 29°C ± 2°C pendant 24 heures (± 2 heures).

- Lecture de la galerie :

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture.
- Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG).
- La révélation des deux tests NO₃ et TRP doit se faire en mettant les tests d'assimilation à l'abri d'une contamination par l'air ; pour cela, placer le couvercle de la boîte d'incubation au dessus de ces tests, pendant la période de révélation des tests NO₃ et TRP.

B –Test ONPG :

Ce test est réalisé lors de l'identification de très nombreuses bactéries (Gram + et Gram -). La β -galactosidase est une enzyme qui intervient dans le métabolisme du lactose, ou son utilisation du lactose par la bactérie requiert deux enzymes :

- La lactose perméase qui permet au lactose de pénétrer dans la bactérie
- La β -galactosidase qui catalyse l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose.

La recherche de la β -galactosidase présente d'intérêt que pour les bactéries lactose (-). En effet, toutes les bactéries lactose (+) sont β -galactosidase (+). La recherche de l'enzyme est donc inutile. On utilise un substrat synthétique: l'ortho-nitro-phényl-galactoside (= ONPG) incolore, de structure proche du lactose et capable de pénétrer dans la bactérie sans perméase, Si la bactérie possède la β -galactosidase, on obtient du galactose et de l'ortho-nitro-phénol (= ONP) de couleur jaune



• Mode opératoire :

- Réaliser une suspension épaisse de souche testées en eau distillée dans un tube a essaie
- Ajouter avec une pince flambée mais refroidie un disque imprégné d'ONPG.
- Incuber à 37°C.
- Lire après 30 minutes

Tableau N°8 : Lecture du test ONPG

observation	interprétation	conclusion
 <p>Coloration jaune</p>	La bactérie a hydrolysé l'ONPG en ONP (produit coloré jaune)	La bactérie possède la β -galactosidase elle est dite ONPG (+)
 <p>Incolore</p>	Il n'y a pas d'ONP dans le milieu, la bactérie n'a pas hydrolysé l'ONPG	La bactérie ne possède pas la β -galactosidase elle est dite ONPG (-)

6.3.1.3-Recherche et dénombrement des coliformes totaux, fécaux avec identification de *Escherichia coli* en milieu liquide :

La recherche et le dénombrement des coliformes et l'identification de *E coli* ont été effectués par la méthode de nombre le plus probable (NPP) appelée aussi la colimétrie. Cette technique présente des avantages par rapport à la technique de dénombrement sur plaque :

- Elle permet d'analyser des quantités importantes d'eau.
- Elle est plus favorable à la multiplication des microorganismes fragiles que la culture sur support solide (Rejsek, 2002).

➤ Mode opératoire

La recherche et le dénombrement des bactéries coliformes, coliformes thermotolérants et de *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 fécaux et thermotolérant et de *Escherichia coli* à partir des tubes positifs du test de présomption. (Chaouch, 2007; Labres et al., 2008).

• Test de présomption

Il effectué en utilisant le bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol simple concentration (BCPL S/C). Tous les tubes sont munis de cloches de Durham pour déceler le dégagement éventuel de gaz dans le milieu. (Mouffok, 2001; Lebres , 2008).

Après avoir bien homogénéisé l'échantillon afin d'obtenir une répartition homogène des microorganismes, nous avons réalisé trois dilutions décimales successives ($10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$) avec trois répétitions par dilution. Les dilutions sont toujours effectuées dans des conditions aseptiques.

- Prélever 1ml d'eau à analyser à l'aide d'une pipette pasteur stérile et la porte dans le premier tube de la série contenant 9ml de BCPL, pour obtenir la dilution 10^{-1} (Fig. 13).
- Nous prélevons 1ml de la dilution 10^{-1} précédente et l'ajouter à un tube contenant 9ml de BCPL, pour obtenir la dilution 10^{-2} .

- Transférer 1ml de la dilution 10^{-2} dans un tube contenant 9ml de BCPL, pour obtenir la dilution 10^{-3} .
- Refaire la technique pour les 2 autres séries.
- Chasser le gaz présent éventuellement dans les cloches de Durham et bien mélanger le milieu et l'inoculum.
- L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures (**Lebres, 2002; Rouaiguia, 2009**).

- **Lecture**

Sont considérés positifs les tubes présentant à la fois :

- Un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu au jaune (ce qui constitue le témoin de la fermentation du lactose présent dans le milieu).
- La production de gaz traduite par le soulèvement de la cloche de Durham introduit dans le milieu (au moins 1/10 de la cloche devra être vide) (**Tandia, 2007**).

Ces deux caractères étant témoins de la fermentation du lactose dans les conditions opératoires décrites. (**Fig. 13**). Noter le nombre de tubes positifs dans chaque série. et se reporter aux tables NPP (**Annexe**) pour obtenir le nombre de coliformes totaux présents dans 1ml (**Mouffok, 2001**).

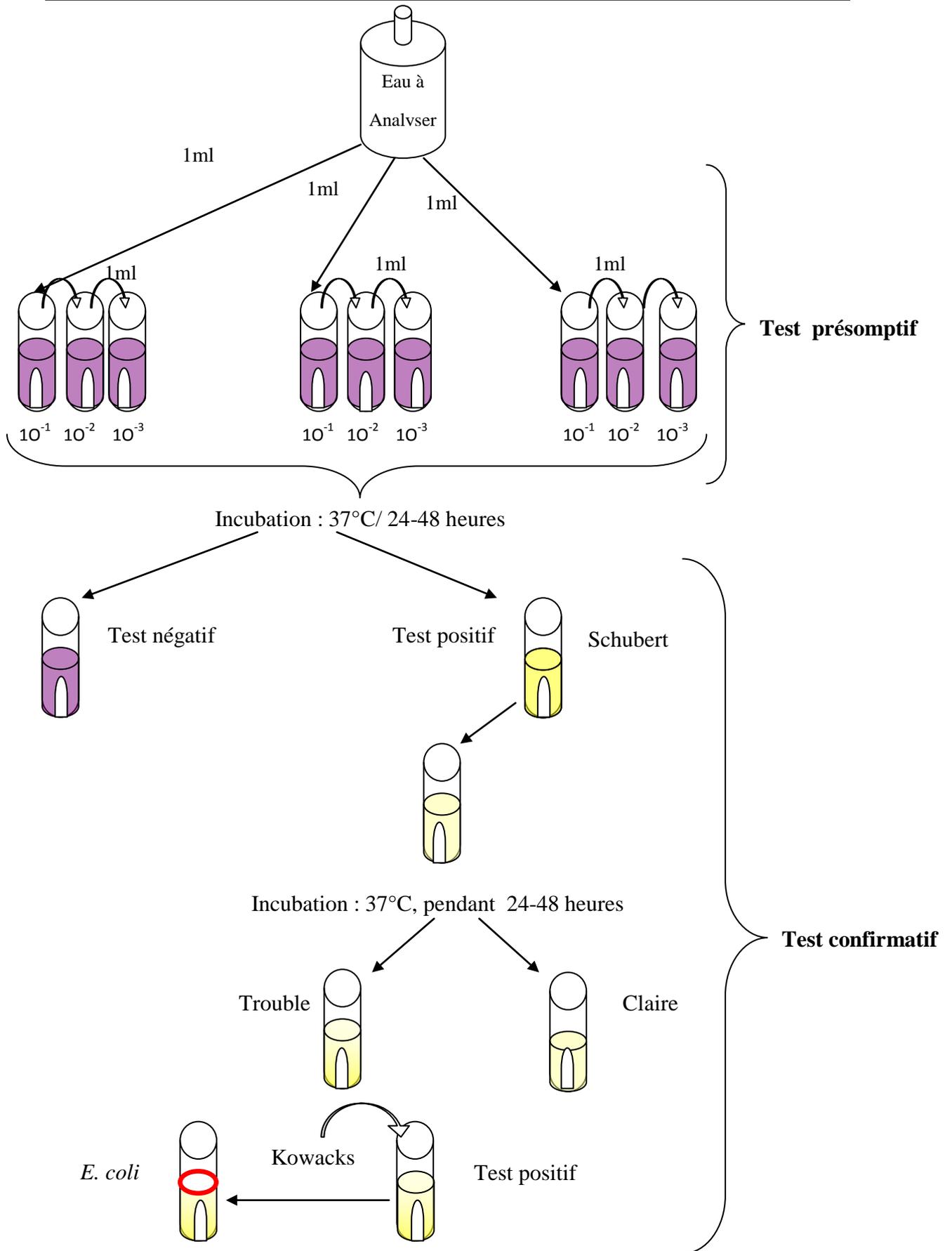


Fig. 13. Recherche et dénombrement des coliformes totaux, fécaux en milieu liquide. (NPP)

• **Test de confirmation**

Le test de confirmation est basé sur la recherche de Coliformes thermo-tolérants parmi lesquels on redoute surtout la présence de *Escherichia coli*, Les coliformes thermo-tolérant ont les mêmes propriétés de fermentation que les coliformes mais à 44°C, *Escherichia coli* est un coliforme thermo-tolérant qui entre autre :

- produit de l'indole à partir du tryptophane à 44°C,
- donne un résultat positif à l'essai au rouge de méthyl,
- ne produit pas de l'acétyl méthyl carbinol,
- n'utilise pas le citrate comme source unique de carbone.

Les tubes de BCPL trouvés positifs lors du dénombrement des Coliformes totaux feront l'objet d'un repiquage dans tube contenant le milieu Schubert (milieu indole mannitol) muni d'une cloche de Durham.

- Chasser le gaz présent éventuellement dans les cloches de Durham et bien mélanger le milieu et l'inoculum.

- L'incubation se fait cette fois-ci au bain marie à 44°C pendant 24 heures.

• **Lecture**

Sont considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois :

- un dégagement gazeux,
- un anneau rouge en surface, témoin de la production d'indole (anneau rouge en surface) par *Escherichia coli* après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de Kowacs.

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table du NPP (**Annexe 2**) en tenant compte du fait que *Escherichia coli* est à la fois producteur de gaz et d'indole à 44°C, pendant 24heures (**Fig. 13**) (**Labres et al., 2008**).

Remarque :

Etant donné que les coliformes fécaux font partie des coliformes totaux, il est pratiquement impossible de trouver plus de coliformes fécaux que de coliformes totaux. Les résultats sont exprimés en germes par 1ml d'eau analysé (**Labres et al., 2008**).

6.3.2-Recherche des staphylocoques

On entend par staphylocoques à coagulase positive, les bactéries qui se présentent sous forme de cocci à Gram positive, sphériques, isolées ou regroupées formant ainsi des grappes de raisin, ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs, possédant l'enzyme catalase et la coagulase. Ils sont capables de se développer en 24 à 48 heures à $36 \pm 2^\circ\text{C}$ sur un milieu sélectif Chapman au mannitol qui contient un inhibiteur : fortes concentrations en chlorure de sodium (75g/l) (Pechère et al., 1982 ; Carbonnelle, 1988 ; Labres et al., 2008).

Le milieu de Chapman est caractérisé par sa forte concentration en chlorure de sodium ce qui permet un isolement sélectif des staphylocoques. La fermentation du mannitol est indiquée par le virage au jaune de l'indicateur coloré, « le rouge de phénol», autour des colonies (Rodier, 2009).

Après la période d'incubation spécifiée, les Staphylocoques à coagulase positive ou plus particulièrement *Staphylococcus aureus*, apparaissent sous forme de petites colonies lisses légèrement bombées à contours réguliers et pigmentées en jaune (fermentation du mannitol) ou en blanc (Ait Kaci et al, 2008 ; Rodier , 2009).

Le tableau suivant résume quelques caractères biochimiques de différentes espèces de staphylocoques

Tab. 9. Les principaux staphylocoques isolés en microbiologie. (Sayad, 2008).

Staphylocoque	<i>aureus</i>	<i>intermedius</i>	<i>saprophyticus</i>	<i>epidermitis</i>
Catalase	+	+	+	+
Coagulase	+	+	-	-
Mannitol en anaérobie	+	-	-	+

6.3.2.1-Test de coagulase

Le test mettant en évidence l'aptitude des bactéries à coaguler le plasma est le principal test caractérisant *S. aureus*, Le test de détection consiste à incuber pendant 4 heures à 37°C un mélange de plasma oxalaté de l'homme et de la souche à tester, de préférence à partir d'une culture en gélose Chapman.

L'apparition d'un caillot est observée en inclinant le tube à 90°C. Le test de la coagulase, il existe de très rares souches de *S. aureus* non sécrétrices de coagulase. (Fig. 14). (Rouaiguia ,2010).

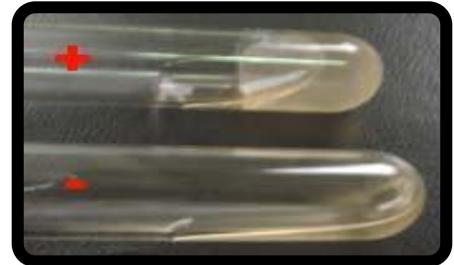


Fig. 14. Test de coagulase.

6.3.2.2-La galerie API staph

L'API 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. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le Tableau d'Identification [91].

- **Principe :** 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 lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

- **Mode opératoire**

- Préparer une suspension bactérienne homogène dans une ampoule d'API Staph Medium d'opacité égale à 0,5 de McFarland, Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures). Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

- A l'aide d'une pipette remplir les tubes de la galerie avec API Staph Medium ensemencé.

-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 : Après incubation, lire les réactions conformément au tableau de lecture en ajoutant 1 goutte de chacun des réactifs suivants :

-Test VP : VP 1 et VP 2.

Attendre 10 minutes. Une couleur rose franche ou violette indique une réaction positive. Une couleur rose pâle ou rose claire obtenue après 10 minutes doit être considérée négative.

- Test NIT : NIT 1 et NIT 2.

Attendre 10 minutes. Une coloration rouge indique une réaction positive.

- Test PAL : ZYM A et ZYM B (*).

Attendre 10 minutes. Une coloration violette indique une réaction positive.

La lecture de ces réactions se fait selon le profil numérique à l'aide du catalogue analytique API Staph [91]

6.3.3-Recherche et dénombrement des Streptocoques

La famille des Streptococcaceae comprend sept genres. Parmi eux, *Streptococcus* et *Enterococcus* regroupent la plupart des espèces responsables d'infections humaines. Les caractéristiques communes à toutes ces espèces sont : cocci à Gram positif, non sporulés, immobiles, dépourvus de catalase et d'oxydase, ne réduisant pas les nitrates et résistants aux aminosides (**Decoster, 2008**).

Les streptocoques du groupe D

Ce groupe est caractérisé par la présence de l'antigène D, qui n'est pas un polyside mais qui est constitué par l'acide teichoïque de la paroi. Cet antigène D est également présent chez les entérocoques mais des études génétiques ont conduit à séparer le genre *Enterococcus* des streptocoques. Dans le groupe D des streptocoques, il reste *S. bovis*, *S. equinus* et *S. alactolyticus*, qui sont des commensaux du tube digestif de l'homme et des animaux. *S. bovis* est l'espèce la plus fréquemment isolée chez l'homme, Elle est responsable d'infections localisées, de septicémies et d'endocardites (**Decoster, 2008**).

Tableau 10 : Les principaux streptocoques du groupe D isolés en microbiologie.

	<i>Enterococcus</i>			<i>Streptococcus (D)</i>	
	<i>faecalis</i>	<i>faecium</i>	<i>durans</i>	<i>bovis</i>	<i>equinus</i>
NACL(6.5)	+	+	+	-	-
Mannitol	+	+	-	+	-
Raffinose	-	-	-	+	-
Sorbitol	+	-	-	-	-
Culture a45°	+	+	+	+	+

6.3.3.1-La galerie API Strep :

L'API 20 Strep est un système standardisé associant 20 tests biochimiques qui présentent un grand pouvoir discriminant. 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. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le Tableau d'Identification (**Annexe**)[91]

- **Principe :** La galerie API 20 Strep comporte 20 microtubes contenant les substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activités enzymatiques ou de fermentation de sucres. Les tests enzymatiques sont inoculés avec une suspension dense, réalisée à partir d'une culture pure, qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests de fermentation sont inoculés avec un milieu enrichi (contenant un indicateur de pH) qui réhydrate les sucres. La fermentation des carbohydrates entraîne une acidification se traduisant par un virage spontané de l'indicateur coloré. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

Mode opératoire : Ouvrir une ampoule d'API Suspension Medium (2 ml) ou utiliser un tube contenant 2 ml d'eau distillée sans additif. A l'aide d'un écouvillon, prélever toute la culture préalablement préparée. Réaliser une suspension très dense : opacité supérieure à 4 de McFarland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

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 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.

Lecture de la galerie : Après 4 heures d'incubation :

Ajouter les réactifs :

-test VP : 1 goutte de VP 1 et VP 2.

-test HIP : 2 gouttes de NIN.

-tests PYRA, DGAL, β GUR, β GAL, PAL, LAP : 1 goutte de ZYM A et ZYM B (*).

• Attendre 10 minutes, puis lire toutes les réactions en se référant au tableau de lecture

6.3.3.2-Recherche et dénombrement des Streptocoques: méthode générale par ensemencement en milieu liquide :

Cette méthode de référence, consiste en la recherche et le dénombrement des entérocoques intestinaux ou streptocoques du groupe « D » de la classification de Lancefield, nommés aussi streptocoques fécaux dans les eaux (**Merzoug, 2009**).

➤ Mode opératoire

Tout comme la méthode de recherche des coliformes en milieu liquide, celle de 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 » (**Chaouch, 2007**).

• **Teste de présomption**

La recherche se fait en bouillon Roth S/C (bouillon à l'azide de sodium simple concentration) (**Mouffok, 2001; Bricha et al., 2007**). A partir de l'eau à analyser, porter aseptiquement 1 ml dans un tube contenant 9 ml de milieu Rothe S/C pour obtenir la dilution 10^{-1} .

- Prélever 1 ml de tube précédent 10^{-1} et mettre dans le second tube Rothe pour avoir la dilution 10^{-2} .

- Transférer 1 ml de la dilution 10^{-2} dans un tube contenant 9 ml de milieu Rothe S/C, pour obtenir la dilution 10^{-3} .

- Refaire la technique pour les 2 autres séries, L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures (**Boukrouma, 2008; Rouaiguia, 2010**).

- **Lecture** : Sont considérés comme positifs les tubes présentant un trouble microbien.

• **Teste de confirmation :**

Le test de confirmation est basé sur la confirmation des Streptocoques fécaux éventuellement présents dans le test de présomption. La présence des streptocoques se traduit par un trouble plus ou moins important et la formation d'une pastille violette au fond du tube (**Roux, 2003**).

• Les tubes de Rothe trouvés positifs feront donc l'objet d'un repiquage dans tube contenant le milieu Eva Litsky (bouillon à l'éthyle violet et aide de sodium), L'incubation se fait cette fois-ci à 37°C, pendant 24 heures (**Fig. 15**).

• **Lecture :**

Sont considérés positifs, les tubes présentant à la fois :

- Un trouble microbien
- Une pastille violette (blanchâtre) au fond des tubes (**Roux, 2003**).

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table du NPP (**Annexe**) (**Lebres, 2006**).

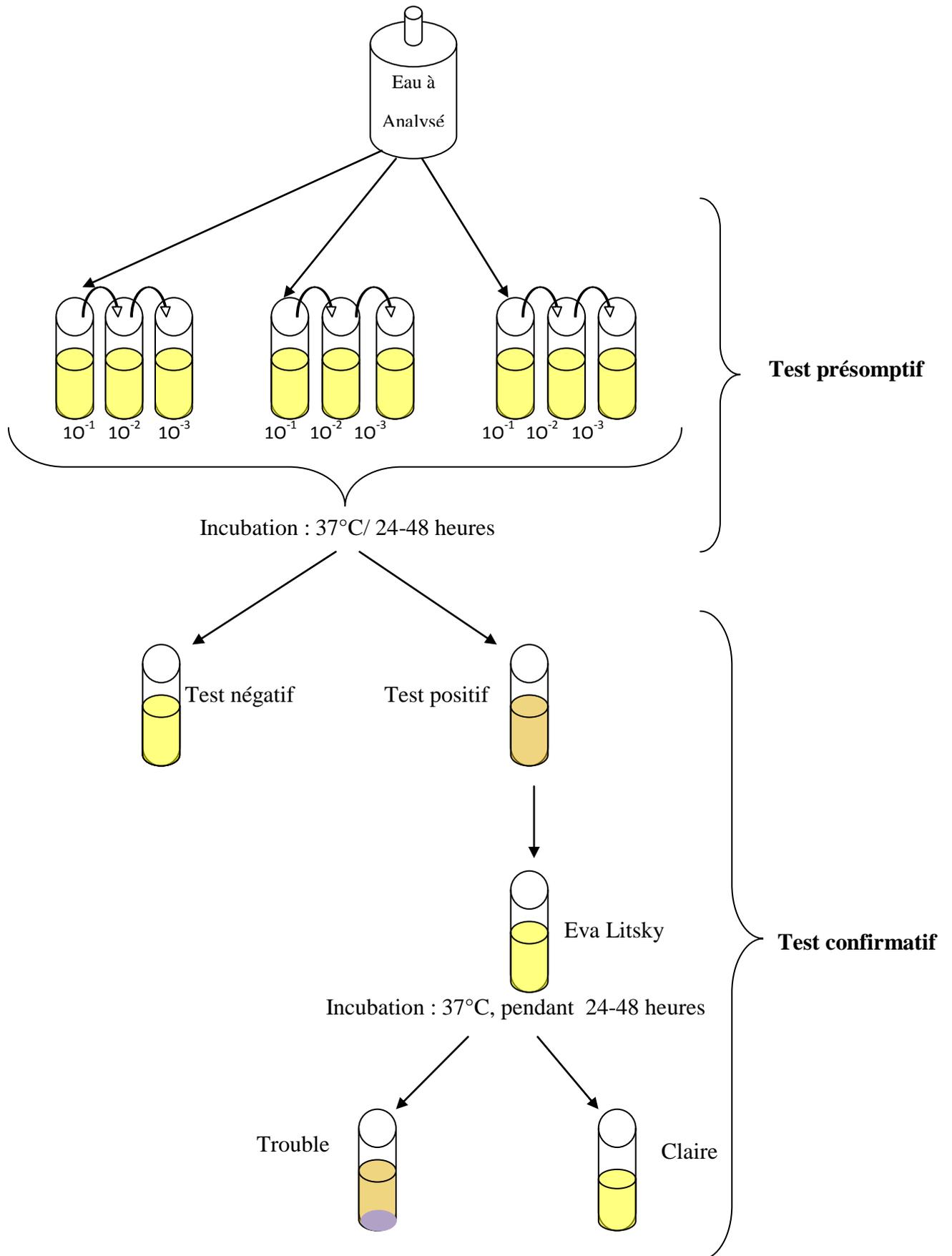


Fig. 15. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux en milieu liquide.

6.3.3.3-Recherche et dénombrement des germes revivifiable :

La recherche et le dénombrement des germes revivifiables se réalisent à deux températures différentes afin de cibler à la fois les microorganismes à tendance psychrophiles soit à 22°C et ceux mésophiles soit 37°C (**Rejsek, 2002**).

Mode opératoire : A partir de l'eau à analyser (solution mère), porter aseptiquement 1 ml en double dans le fond de deux boîtes de Pétri vides, numérotées et préparées à cet usage comme l'indique la (Fig. 15). Compléter en suite avec environ 15 à 20 ml de gélose TGEA fondue, maintenue à 45°C. Agiter doucement par un mouvement circulaire et de va-et-vient en forme "8" pour assurer un mélange homogène de l'eau et de la gélose, sans faire de bulles d'air et sans mouiller les bords de la boîte. Le milieu doit être coulé 10 minutes au plus tard après reproduction de l'eau à analyser. Laisser solidifier sur la paillassse, puis rajouter une deuxième couche d'environ 5 ml de la même gélose, Retourner les boîtes et incuber le premier lot à 37°C pendant 48 heures et le second à 22°C pendant 72 heures avec:

- Une première lecture à 24 heures
- Une deuxième lecture à 48 heures
- Et une troisième lecture à 72 heures

-Lecture :

Les germes revivifiables se présentent dans les deux cas sous formes de colonies lenticulaires poussant en masse.

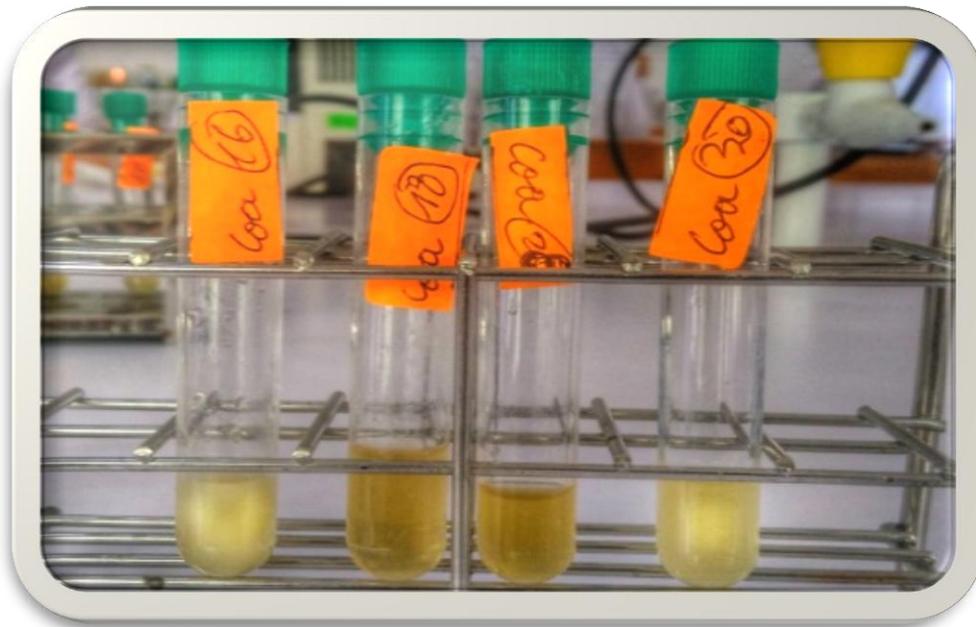
-Dénombrement :

Il s'agit de dénombrer toutes les colonies, en tenant compte des deux remarques suivantes :

1. Dénombrer les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies.
2. Les résultats sont exprimés en nombre de micro-organismes revivifiables par ml d'eau à analyser à 22°C et 37°C (**Rodier, 2009**).

Chapitre IV

résultats et discussion



1 Résultats d'identification

1-1 Résultats de l'enrichissement des prélèvements du clavier:

Les résultats de l'enrichissement apparaissent après une culture de 24 heures, ou on a constaté un trouble au niveau de tous les tubes qui signifié une croissance bactérienne (activité biologique).



Figure N°16: Résultat de l'enrichissement.

2- Résultats d'isolement :

2-1-Aspect macroscopique des colonies après l'isolement :

Lorsque nous ensemençons une bactérie sur une gélose, elle n'est pas visible. Toutefois, elle se divise à un rythme assez important pour former une colonie, qui est visible à l'œil nu. Chacune de ces colonies est formée par des millions bactéries identiques, Cette colonie possède des caractéristiques propres à l'espèce bactérienne.

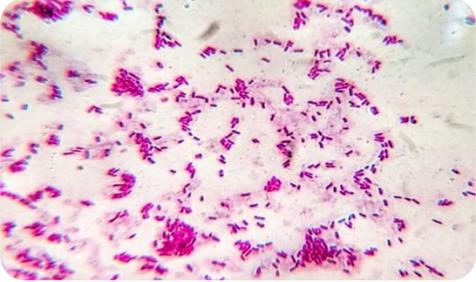
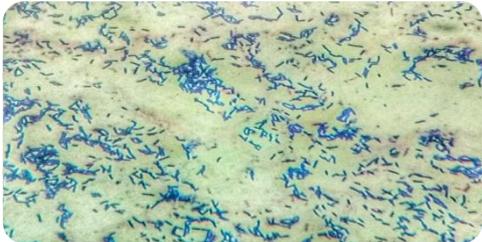
Après un temps d'incubation de 24 heures à 37°C, l'examen macroscopique des colonies poussées sur les milieux utilisés (Gélose Nutritive, Chapman, Hektoen, Gélose Salmonelle-Shigelle, Mac-Conkey) est résumé dans le tableau suivant :

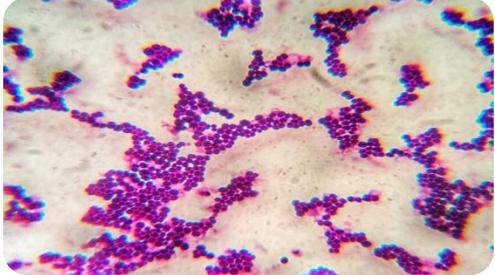
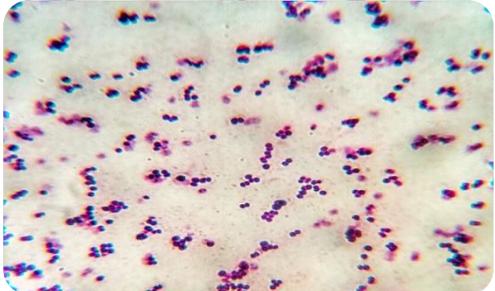
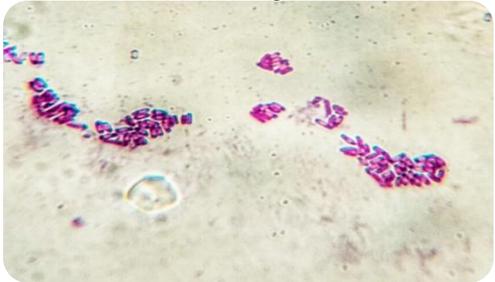
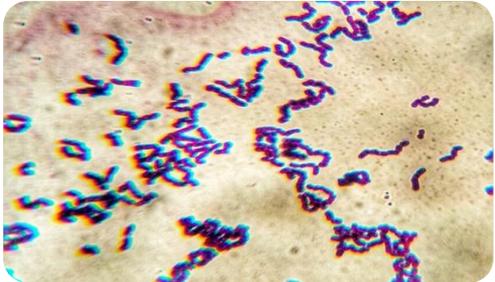
Tableau 11 : résultat de lecture macroscopique poste n° 1, 2, 6, 8, 11

Milieu de culture	Couleur et aspects des colonies	La taille	La forme
Gélose Nutritive 	Colonies blanche cotonneuse	Grande	Irrégulière bombée
	Colonies jaunes muqueuses	petite	Régulières arrondies
MacConkey 	colonies marron rugueuses	moyennes	Irrégulière bombés arrondies
Chapman 	colonies jaune avec virage de couleur	Moyennes petites	Régulières bombé arrondies
	colonies blanches lisses	moyennes	Régulières bombé arrondies
Gélose SS 	Culture négative	Culture négative	Culture négative
Gélose Hectoén 	Colonies rouge brique avec virage de couleur au tour des colonies	petites	Régulières bombé arrondies

2-2-Examen microscopique :

Tableau12 : Aspect microscopique des colonies.

Culture	Aspect macroscopique des colonies	Observation microscopique des colonies
<p>Gélose nutritive (GN)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Irrégulière, lisse, plate, jaune, 1 mm de diamètre. - Bambée, lisse, brillante, à contour régulier, transparente, 1 mm de Diamètre - Irrégulière, bombée, opaque, jaune, 2 mm de diamètre. 	<p>- Bacilles isolés, Gram négatif (Fig. 26).</p>  <p>Fig. 17. Aspect des Bacilles courte Gram (-)</p>  <p>Fig. 18. Aspect des Bacilles Gram (-)</p>
<p>Mac-Conkey</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Rose claire, bombée, lisse, brillante circulaire, 1 mm de diamètre. - Rose élevée, lisse brillante, circulaire, 1mm à 2 mm de diamètre 	<p>- Bacille isolés, Gram négatif (Fig. 28).</p>  <p>Fig. 19. Aspect des Bacilles Gram (-)</p>  <p>Fig. 20. Aspect des Bacilles Gram (-)</p>

<p>Chapman</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Petite, opaque, lisse, bombée, à contour régulier, de couleur blanche - Bombée, lisse, à contour régulier, jaunâtre avec virage de couleur du milieu entourant les colonies au jaune brillant. - Bombée, lisse, à contour régulier, blanche avec virage de couleur du milieu entourant les colonies au jaune brillant. 	<ul style="list-style-type: none"> - Cocci groupées en amas, Gram positif - Cocci groupé en monocoque ou diplocoque, Gram positif.  <p>Fig. 21. Aspect des Cocci en amas Gram (+)</p>  <p>Fig. 22. Aspect des monocoques et diplocoque Gram (+)</p>
<p>Héctoèn</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Petites colonie a contours régulier, soit pigmenté en: <ul style="list-style-type: none"> -vert ou bleu vert pour les germes lactose négatif. - jaunes quand le lactose est positif (milieu jaune) (Fig. 33). 	<ul style="list-style-type: none"> - Bacilles isolés, Gram négatif. - Coccobacilles, Gram négatif  <p>Fig. 23. Aspect des coccobacilles Gram (-)</p>  <p>Fig. 24. Aspect des bacilles Gram (-)</p>
<p>SS</p>	<p>Culture négative</p>	<p>-</p>

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. Du point de vue microscopique, l'examen cytologique nous a révélé que les Bâtonnets Gram (-) sont plus représentés par rapport aux cocci Gram (+). Les résultats de l'état frais et de la coloration de Gram et les testes catalase et oxydase et ONPG sont résumés dans les tableaux suivants :

Tableau 13 : résultats des tests d'oxydase et de catalase et d'ONPG

Code	Poste	milieu	Coloration de Gram	oxydase	catalase	ONPG
1	P1	GN	Bacilles court Gram -	-	-	-
2	P1	Chapman	Bacille incurvée Gram+	-	+	+
3	P2	Chapman	Cocci Gram + regroupés en grappe de raisin et en amas	-	+	-
4	P3	Chapman	Cocci Gram + regroupés en grappe de raisin et en amas	-	+	-
5	P3	Chapman	Bacilles Gram -, isolé et en amas	-	+	/
6	P3	GN	Bacille Gram+, isolé	+	-	+
7	P4	GN	Cocci Gram + regroupés en grappe de raisin et en amas	-	+	+
8	P4	Hectoen	Coccobacilles Gram -	+	-	-
9	P4	MacConkey	Coccobacilles Gram -	-	+	+
10	P4	MacConkey	Cocci, mococoque Gram+	+	+	-
11	P5	GN	Bacille Gram+, isolé et en amas	-	+	-
12	P5	Chapman	Cocci Gram +	-	+	/
13	P5	Chapman	Cocci Gram + regroupés en en grappe de raisin et en amas	-	+	+
14	P6	Chapman	Cocci Gram + ,diploccoques en chainettes	-	+	/
15	P7	GN	Cocci Gram +	+	+	+
16	P7	Chapman	Cocci Gram +	-	+	/
17	P8	Hectoen	Bacilles Gram -	-	+	+
18	P10	Chapman	Cocci Gram +	-	-	-
19	P10	MacConkey	Bacilles Gram -	-	+	+
20	P10	Hectoen	Bacilles Gram -	-	-	+
21	P11	Chapman	Bacilles Gram +	-	+	-

22	P12	Chapman	Cocci Gram +	-	-	+
23	P12	Macconkey	Cocci Gram +	-	+	-
24	P14	GN	Cocci Gram +	-	+	+
25	P14	Macconkey	Bacilles Gram -	+	-	+
26	P14	Chapman	Cocci Gram + regroupés en grappe de raisin et en amas	-	+	-
27	P15	Macconkey	Cocci Gram + en chaînette	-	+	-
28	P16	GN	Cocci Gram + regroupés en grappe de raisin et en amas	-	-	+
29	P16	Hectoen	Cocci Gram + , en chaînette	-	+	+
30	P16	Chapman	Cocci Gram + regroupés en grappe de raisin et en amas	+	-	+

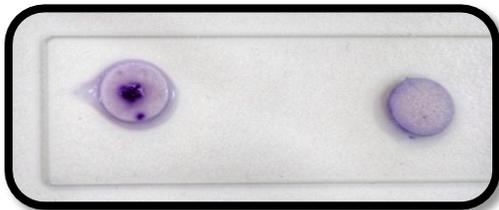


Fig25 :resultat oxydase (+)et (-)



Fig26 :resultat (+)du test catalase



Fig27 :resultats du test ONPG

2.3-Résultats d'isolement des champignons sur le milieu Sabouraud

Tableau 14 :resultat d'isolement des champignons

Poste d'isolement	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
Présence ou absence des champignons	-	+	+	+	+	-	+	+
Poste d'isolement	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16
Présence ou absence des champignons	+	+	+	+	+	+	-	+

l'examen d'isolement sur la gélose sabouraud avec les disques d'antibiotiques (Gentamicine et chloramphénicol) nous a révélé que les champignons sont présents sur la majorité des postes

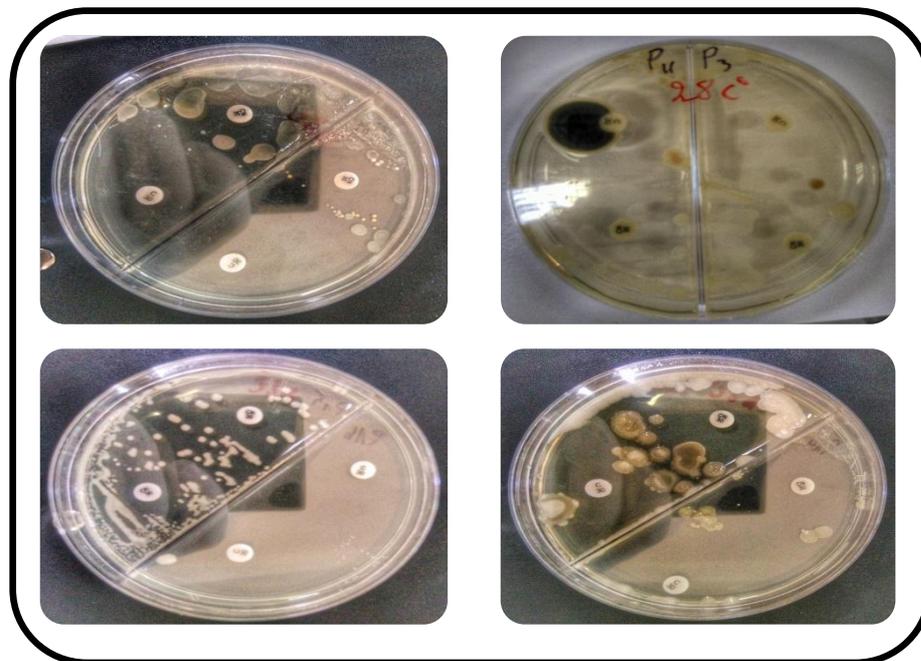


Figure 28 :Observation macroscopique des champignons

2-4-Résultat de test TSI (tri-sugar-iron) :

Milieu pour la différenciation des Entérobactéries basée sur la production de sulfure d'hydrogène et la fermentation du lactose, du saccharose et du D-glucose, l'examen d'isolement sur milieu TSI nous a révélé une seule culture positive avec six colonies noires en surfaces Les résultats de test TSI sont représentés dans le tableau ci-dessus (Tab. 18)

Tableau 15 : résultats du test TSI

Code	Poste	Milieu de culture	Observation
_8	P 4	Hectoen	-
9	P 4	Mac Conkey	6 colonies noires en surface
17	P 8	Hectoen	-
20	P 10	Hectoen	-
25	P 14	Mac Conkey	-
28	P 14	Chapman	-

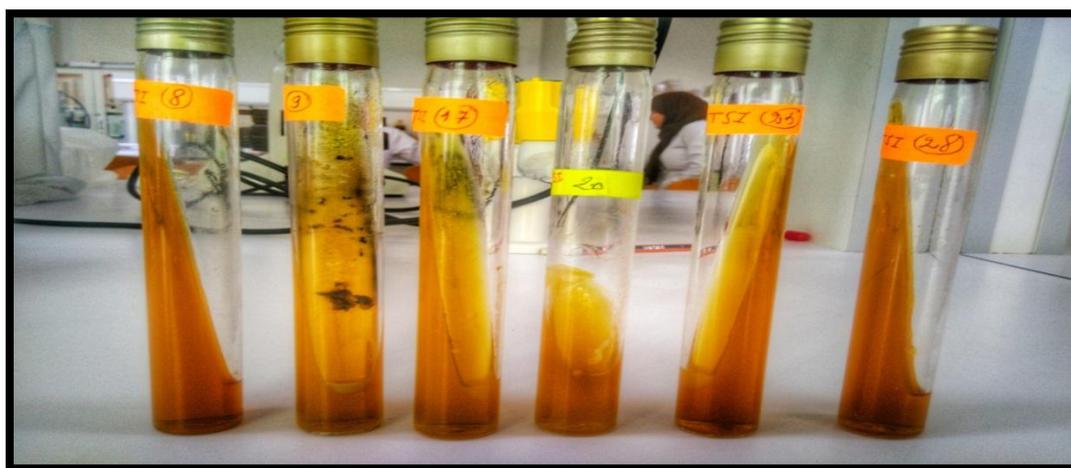


Figure29 :Résultats du test TSI

2.5-Résultat de test Coagulase :

Les staphylocoques à coagulase positive, sont les bactéries qui se présentent sous forme de cocci à Gram positive, sphériques, isolées ou regroupées formant ainsi des grappes de raisin, ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs, possédant l'enzyme catalase et la coagulase, La mise en évidence de la coagulase libre permet la différenciation des espèces du genre *Staphylococcus*. En effet, seule l'espèce *Staphylococcus aureus* peut posséder cette enzyme qui joue un rôle important dans le pouvoir pathogène de la bactérie, les résultats du test coagulase sont représentés dans le Tableau ci-dessus

Tableau16 : Résultats du test coagulase

Code	Poste	Milieu de culture	Observation
2	P 1	Chapman	-
3	P 2	Chapman	-
5	P 3	Chapman	+
7	P 4	GN	-
13	P 5	Chapman	-
16	P 7	Chapman	+
18	P 10	Chapman	-
28	P 14	Chapman	-
30	P 16	Chapman	+

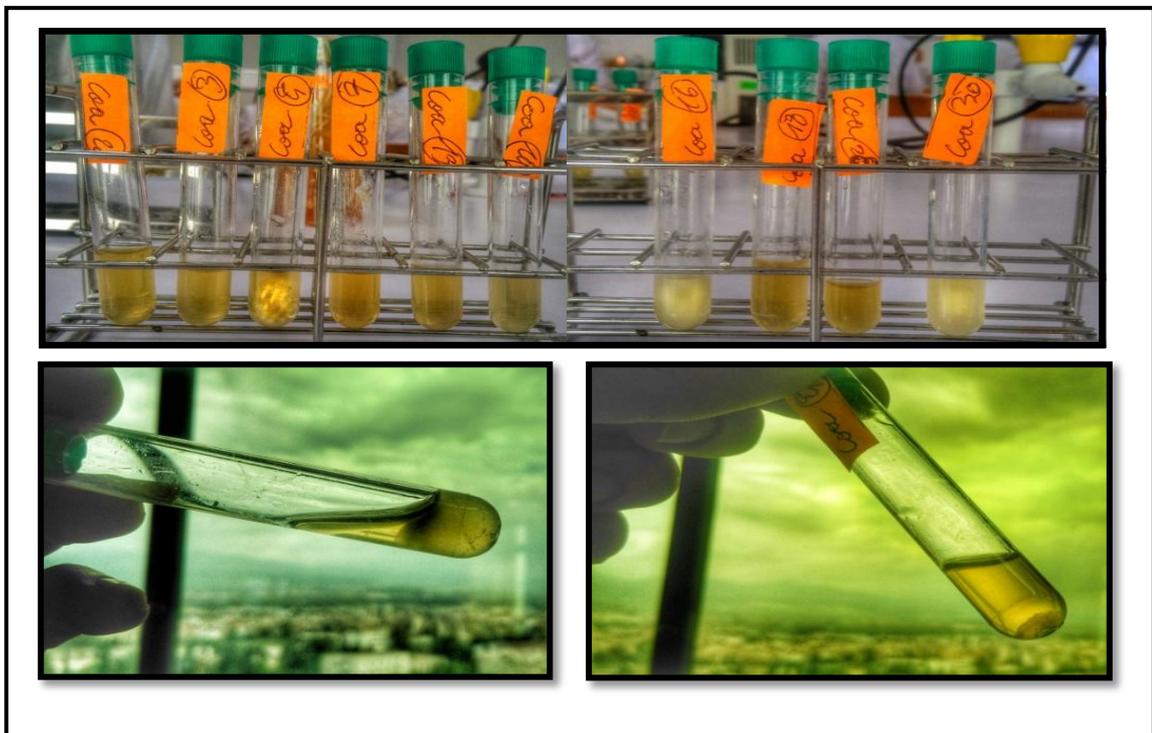


Figure30 :Résultats du test coagulase

2-6 -Résultat de la Galeries API 20E :

L'étude biochimique nous a permis d'identifier 9 espèces bactériennes appartenant à la famille des Enterobacteriaceae avec une présence majoritaire de *Aeromonas hydrophila* gr1, *Serratia odorifera*, Nous avons aussi isolé et identifié deux espèces pathogènes: *Vibrio fluvialis* et *Serratia rubideae*. La présence de ces bactéries avec des concentrations assez importantes est synonyme de risque sanitaire potentiel (principalement des maladies gastro-intestinales). Les résultats sont représentés dans le tableau 17 et dans la figure 31

Tableau17 : Résultat de la Galeries API 20E

Code	Poste	Milieu de purification	Espèces identifiées
1	P1	GN	<i>Aeromonas hydrophila</i> groupe 1 (93%)
8	P4	GN	<i>Pantoea spp</i> (64%)
9	P4	Mac-Conkey	<i>Enterobacter sakazaki</i> (58%)
17	P8	Mac-Conkey	<i>Serratia odorifera</i> 2 (42 %)
19	P10	GN	<i>Citrobacter youngae</i> (37,6 %)
19	P10	Mac-Conkey	<i>Providencia alcalifaciens</i> (53 %)
20	P10	Mac-Conkey	<i>Vibrio fluvialis</i> (97 %)
27	P16	GN	<i>Serratia rubideae</i> (33,4 %)
29	P16	Mac-Conkey	<i>Providencia Stuarti</i> (65 ,1 %)

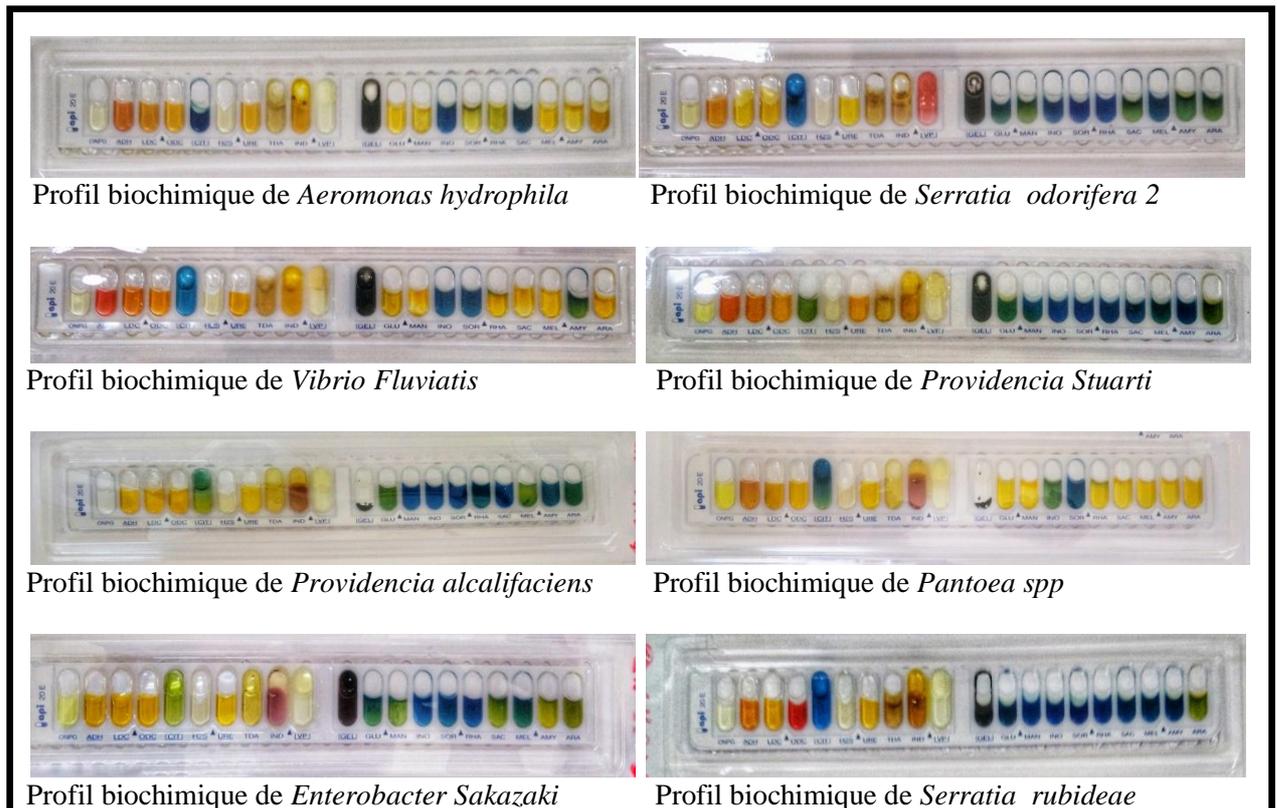


Figure 31 : résultats des profils biochimiques des entérobactéries

2-7 -Résultat de la Galeries API NE :

L'étude biochimique nous a permis d'identifier 9 espèces bactériennes appartenant à la famille des bacille a Gram(-) non fermentaire avec une présence majoritaire de *Pseudomonas Luteola* et *Aeromonas hydrophila* gr2. La présence de ces bactéries avec des concentrations assez importantes est synonyme de contaminations par les aérosols ,Les résultats sont représentés dans le tableau 18 et dans la figure 40

Tableau18 : Résultat de la Galeries API NE

Code	Poste	Milieu de purification	Espèces identifiées
2	P1	Hectoen	<i>Pseudomonas Luteola</i> (53 %)
6	P3	Macconkey	<i>Aeromonas hydrophila</i> gr2 (73 %)
8	P4	Macconkey	<i>Pseudomonas mendocina</i> (61%)
11	P5	Macconkey	<i>Brevundimonas visicularis</i> (68 %)
17	P8	Hectoen	<i>Acinetobacter baumannii</i> (98 ,4 %)
17	P8	Macconkey	<i>Pseudomonas Luteolla</i> (87,7 %)
21	P11	Macconkey	<i>Photobacterium dansella</i> (92,3 %)
25	P14	Hectoen	<i>Pseudomonas stuzeri</i> (99,5 %)
30	P16	Hectoen	<i>Aeromonas caviae</i> (89,7%)

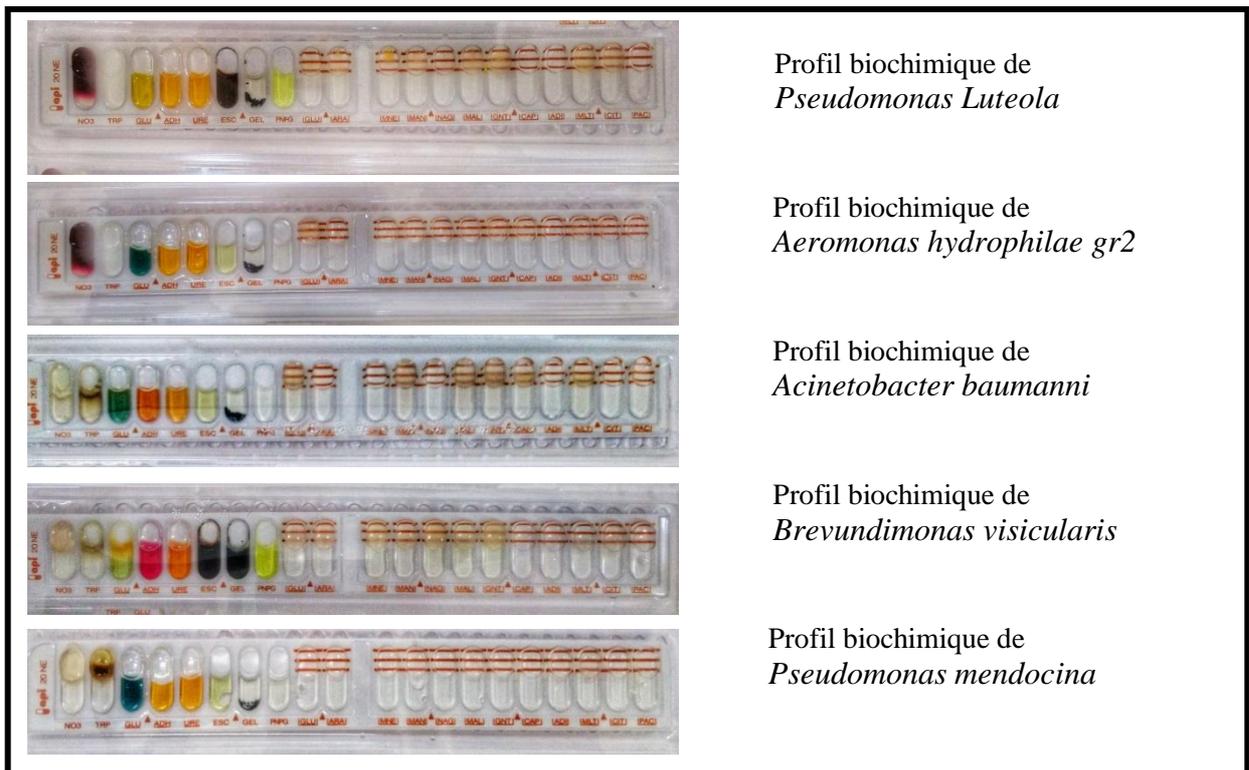


Figure 32 : Résultats des profils biochimiques des API 20NE

2-8 -Résultat de la Galeries API strepto :

L'étude biochimique nous a permis d'identifier 7 espèces bactériennes appartenant à la famille des Streptococcaceae avec une présence majoritaire de *Aerococcus viridans* , *Lactococcus lactis Spp*. Nous avons aussi isolé et identifié une espèce pathogène *Enterococcus faecalis* La présence de cette bactérie avec des concentrations assez importantes est synonyme de contaminations fécale ancienne, Les résultats sont représentés dans le tableau 20 et dans la figure 40

Tableau 19 : Résultat de la Galeries API strepto

Code	Poste	Milieu de purification	Espèces identifiées
5	P3	Mac-Conkey	<i>Listeria grayi</i> (74 %)
10	P4	Mac-Conkey	<i>Streptococcus constellatus</i> (76 %)
14	P6	Mac-Conkey	<i>Lactococcus lactis spp</i> (58,8 %)
15	P7	Mac-Conkey	<i>Aerococcus viridans 1</i> (82 ,4 %)
16	P7	Hectoen	<i>Enterococcus faecalis</i> (54,2 %)
22	P12	Mac-Conkey	<i>Lactococcus lactis spp</i> (47,9 %)
26	P15	Hectoen	<i>Leuconostoc spp</i> (92,3 %)
29	P16	Mac-Conkey	<i>Streptococcus salivaris</i> (82,2 %)
32	P16	Hectoen	<i>Aerococcus viridans 1</i> (99 %)

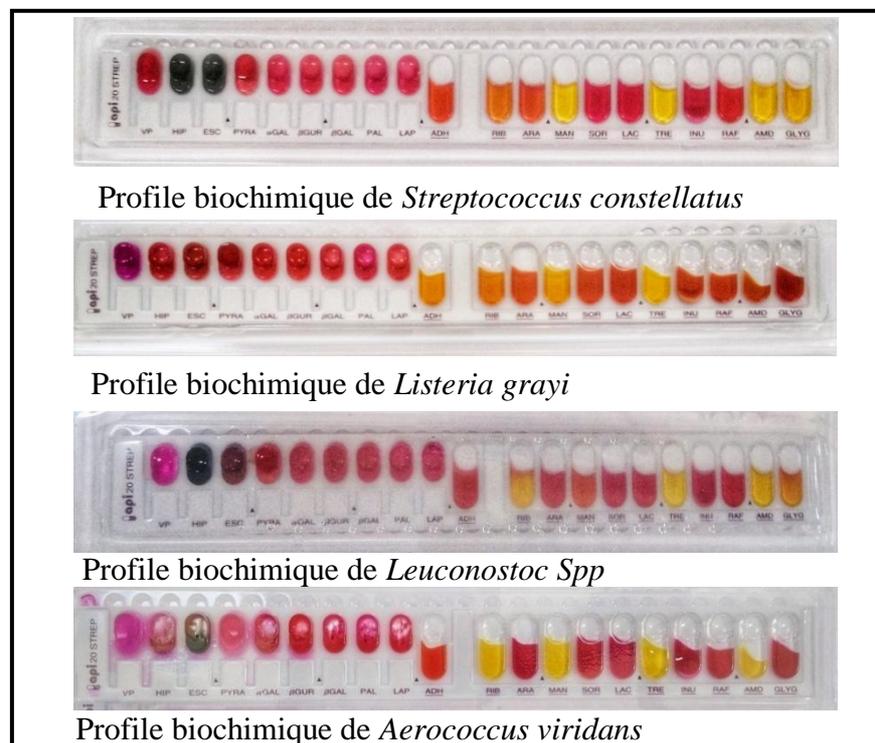


Figure33 : résultats des profils biochimiques des API Strep

2-9 -Résultat de la Galeries API Staph : L'étude biochimique nous a permis d'identifier 8 espèces bactériennes appartenant à la famille des Micrococcaceae avec une présence majoritaire de *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus xylosus*. Nous avons aussi isolé et identifié une espèce pathogène *Staphylococcus aureus* possédant l'enzyme coagulase donc une l'aptitude à coaguler le plasma, Les résultats sont représentés dans le tableau 21 et dans la figure 41

Tableau 20 : Résultat de la Galeries API Staph

Code	Poste	Milieu de purification	Espèces identifiées
3	P3	Chapman	<i>Staphylococcus xylosus</i> (98,8 %)
4	P4	Chapman	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (54,6 %)
7	P6	Chapman	<i>Staphylococcus auricularis</i> (58,8 %)
13	P7	Chapman	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (46,8 %)
14	P7	Chapman	<i>Micrococcus spp</i> (95,2 %)
18	P12	Chapman	<i>Staphylococcus simulans</i> (43,80 %)
22	P15	Chapman	<i>Staphylococcus xylosus</i> (65,6 %)
24	P16	Chapman	<i>Kocuria varians / rosea</i> (99 ,3 %)
28	P14	Chapman	<i>Staphylococcus capitis</i> (47,3%)
29	P16	Chapman	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (52,3 %)
30	P16	Chapman	<i>Staphylococcus aureus</i> (80,7 %)

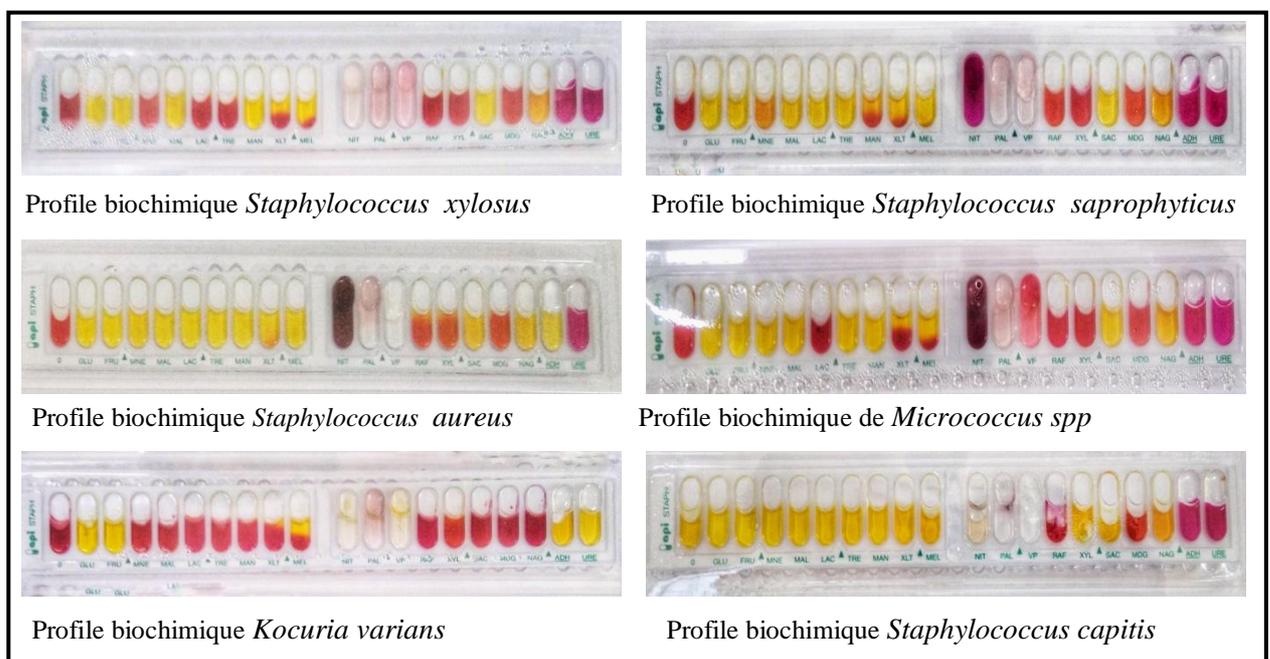


Figure34 Résultat de la Galerie API Staph

Tableau.21 Répartition des espèces selon les postes de travail:

postes Espèces	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16
<i>Serratia odorifera</i> 2								×			×					
<i>Pantoea spp</i>				×			×						×			
<i>Vibrio Fluviatis</i>					×					×	×					
<i>Providencia alcalifaciens</i>										×				×		
<i>Pseudomonas Luteola</i>	×				×			×		×						
<i>Aeromonas hydrophilae</i>			×					×					×			×
<i>Pseudomonas mendocina</i>				×										×		
<i>Brevundimonas visicularis</i>					×											
<i>Aerococcus viridans</i> 1							×					×			×	×
<i>Streptococcus constellatus</i>				×												
<i>Lactococcus lactis Spp lactis</i>						×						×				
<i>Leuconostoc Spp</i>															×	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>				×			×							×		×
<i>Staphylococcus aureus</i>																×
<i>Staphylococcus xylosus</i>			×				×									
<i>Staphylococcus auricularis</i>						×										
<i>Staphylococcus captis</i>														×		
Total de présence d'espèces	1	0	2	4	3	2	4	3	0	3	2	2	2	4	2	4

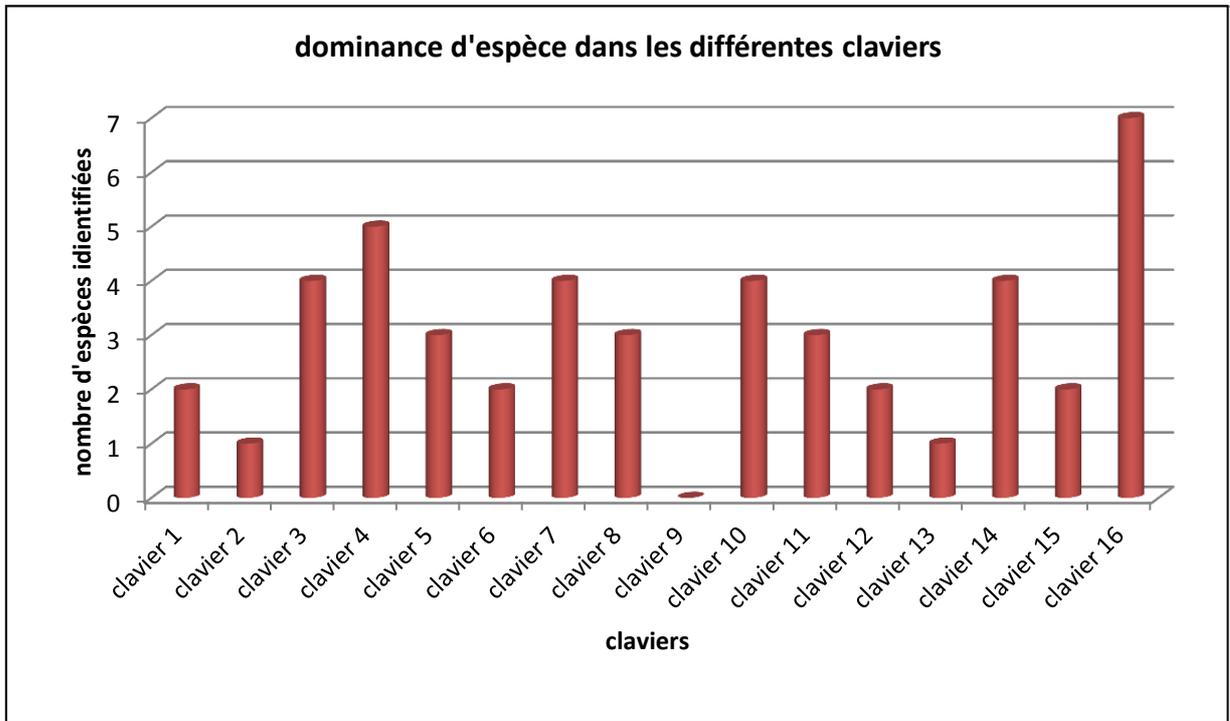


Figure 35 : Répartition des espèces en fonction des postes de prélèvement

On a remarqué que les claviers de la salle d'informatique des départements des langues sont plus contaminés que les postes de la salle d'informatique de la faculté SNVSTU

-On a constaté que le clavier N° 16 c'est le clavier le plus contaminé on comparais avec d'autres claviers

- Les claviers 9 et 2 sont les moins contaminés

- Les claviers du poste 4, 7, 10, 14 sont des claviers très contaminés avec 5 à 6 espèces identifiées

3-Résultats de la recherche et du dénombrement des micro-organismes :

Nous avons effectué pendant notre travail un dénombrement et une recherche systématique des germes indicateurs de pollution qui sont :

- Les micro-organismes coliformes (coliformes totaux).

- Les coliformes fécaux (thermo-tolérant).

- Les streptocoques fécaux.

Les résultats des analyses microbiologiques des prélèvements des claviers que nous avons obtenues sont présentés sous forme des tableaux et des diagrammes exprimant les différentes variations de tous les paramètres étudiés.

3.1 Les coliformes totaux :

3.1.1 Sur milieu liquide

Poste N°4

	DC1	DC2	DC3	SC1	SC2	SC3	SC1	SC2	SC3
BCPL	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Schubert	-	-	-	-	-	-	-	/	/

460 germe /100 ml

Poste N°10

	DC1	DC2	DC3	SC1	SC2	SC3	SC1	SC2	SC3
BCPL	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Schubert	-	-	-	-	-	+	-	+	/

1100 germe /100ml

Poste N°16

	DC1	DC2	DC3	SC1	SC2	SC3	SC1	SC2	SC3
BCPL	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Schubert	-	-	-	-	-	+	/	/	/

240 germe /100ml

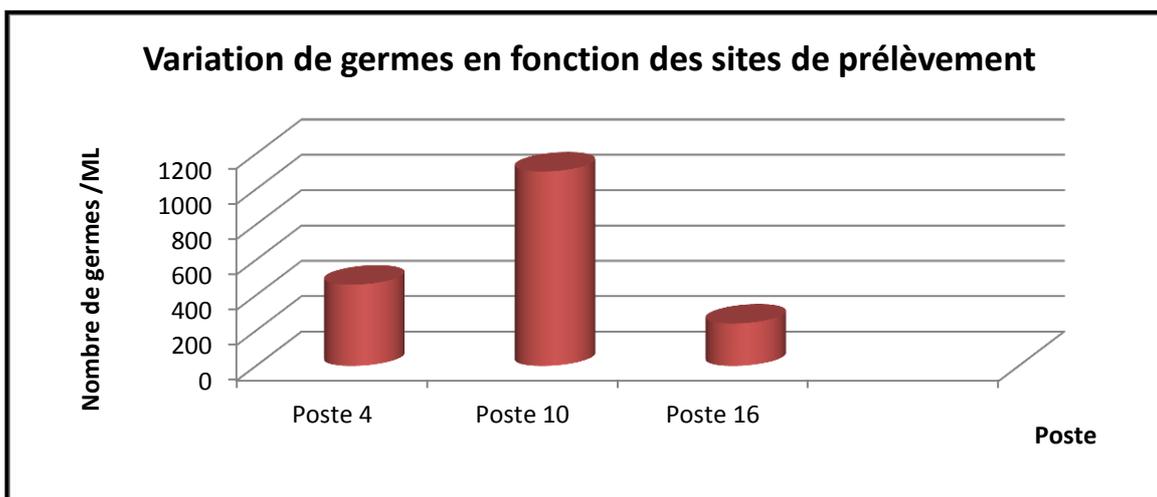


Figure36 :Nombre des coliformes en fonction des postes des prélèvements

On a constaté de cette étude que le clavier du poste N° 10 avec 1100 germes/100ml est le poste le plus contaminé on comparant au autres postes

3.1.2-Les streptocoques fécaux :

Les streptocoques fécaux sont des excellents indicateurs de contaminations récentes par la matière fécale des animaux. Les résultats de dénombrement de ces derniers sont présentés dans les tableaux suivants .

Poste N° 4 : 6 germes/100ml

	DC1	DC2	DC3	SC1	SC2	SC3	SC1	SC2	SC3
ROTH	-	-	-	+	+	-	+	+	-
EVA	/	/	/	+	+	/	+	+	/

Poste N°10 :6germes/100ml

	DC1	DC2	DC3	SC1	SC2	SC3	SC1	SC2	SC3
ROTH	-	-	-	+	-	-	+	+	-
EVA	/	/	/	+	/	/	+	+	/

Poste N°16 :6germes/100ml

	DC1	DC2	DC3	SC1	SC2	SC3	SC1	SC2	SC3
ROTH	-	-	-	+	+	-	+	+	-
EVA	/	/	/	+	+	/	+	+	/

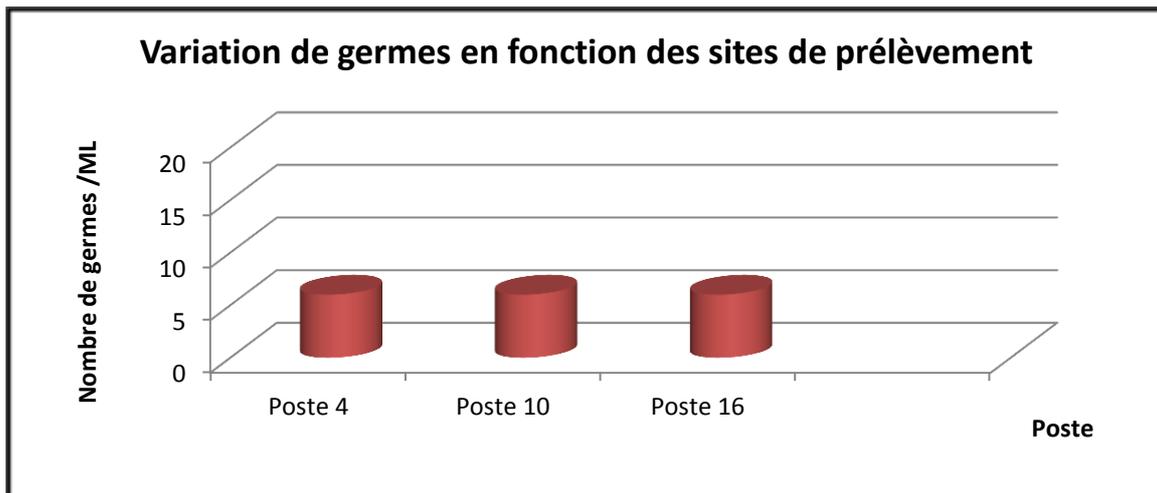


Figure 37 :Résultats de dénombrements des streptocoques

Par rapport aux coliformes, il en ressort que tout les postes analysée présentent une contamination mineure par les streptocoques fécaux avec 6germes/100ml.



Figure 38 :Résultats de dénombrement des coliformes



Figure 39 :Résultats de dénombrement des streptocoques fécaux

3.1.3 Dénombrement sur milieu solide

La concentration de germes totaux fluctue considérablement au niveau des trois postes de prélèvement. Ces variations sont dues au fait que les sites sont exposés à diverses sources de contamination qui diffèrent d'un endroit à un autre, Les résultats sont représentés dans le tableau 25

Tablea22 : Dénombrement sur milieu (TGEA) et (PCA)

Poste	TGEA (ET)	TGEA (IN)	PCA (ET)	PCA (IN)
Poste 4	5 U.F.C	contamination	2 U.F.C	Contamination
Poste 10	8 U.F.C	36 U.F.C	23 U.F.C	136 U.F.C
Poste 16	129 U.F.C	87 U.F.C	>300 U.F.C	43 U.F.C

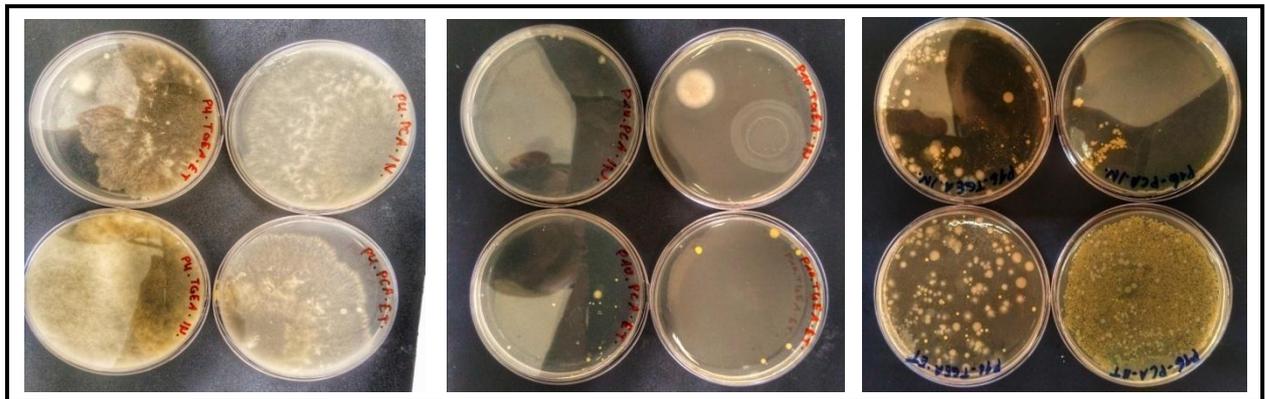


Figure40 : Résultats de Dénombrement sur milieu (TGEA) et (PCA)

Discussion

Les analyses bactériologiques effectuées sur les échantillons prélevés à partir de 16 postes de travail au niveau de la salle d'informatique de l'Université 8 Mai 1945 de Guelma ont permis d'isoler et d'identifier 33 espèces appartenant à 04 familles : Les Enterobacteriaceae (09 espèces), les Micrococcaceae (09 espèces), les Streptococcaceae (07 espèces) et les Pseudomonadaceae (06 espèces). Certaines espèces bactériennes identifiées ont un pouvoir pathogène spécifique tel *Staphylococcus aureus* et d'autres ont un pouvoir pathogène opportuniste (*Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus saprophyticus*).

D'une manière générale, les Staphylocoques sont dominants. Ils sont observés sur la plupart des postes de travail. A noter aussi, d'après nos analyses sur les claviers de la salle d'informatique, nous pouvons constater que ces derniers sont très abondants. Les espèces les plus représentées sont *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* avec la présence de quelques espèces appartenant au genre *Micrococcus*.

La présence de ces espèces peut conduire à des infections cutanées et parfois même à des infections septicémiques redoutables, ce qui constitue un risque sur la santé des utilisateurs.

Aussi, sur les seize claviers analysés et qui sont considérés comme des vecteurs de contamination croisée, nous avons aussi isolés et identifiés de nombreuses autres espèces bactériennes appartenant à la famille des Enterobacteriaceae. Au niveau des postes de la faculté SNV-STU, les plus abondantes sont *Aeromonas hydrophila* groupe 1, *Enterobacter Sakazaki*, *E. coli*, *Providencia alcalifaciens* et *Providencia stuartii*.

Pour les postes de travail des départements des langues, nous avons trouvés *Pantoea* spp., *Serratia odorifera* 2, *Citrobacter youngae*. Il est à signaler que la présence de *Acinetobacter baumannii* se fait remarquée sur les deux postes (2 et 13)

A partir de ces résultats, nous pouvons constater que les germes dominants dans ces lieux de travail sont les Entérobactéries avec la présence de ces espèces dominantes telle *E. coli* qui représente un signe précurseur d'une contamination fécale au niveau de ces lieux. Ceci confirme que les méthodes de nettoyage et de désinfection utilisées restent insuffisantes. Cette situation peut conduire à des risques sanitaires en provoquant des maladies infectieuses.

Par ailleurs, la variation de la microflore au niveau des différents points d'une salle d'informatique dont l'utilisateur est plus ou moins en contact direct, montre que le niveau d'hygiène dans ces endroits et particulièrement chez les utilisateurs est très faible et ceci peut aussi poser différents problèmes de santé.

Des nettoyages rigoureux sont donc essentiels pour maintenir les concentrations de cette microflore à son niveau le plus bas.

Conclusion

Les salles d'informatiques, lieu de recherche du savoir, de connaissance, de détente et d'amélioration du niveau intellectuel de l'individu, peuvent exposer à tout moment leurs utilisateurs à des dangers sanitaires non contrôlables, étant donné que ces derniers viennent de différentes zones de la région et de différents profils.

Le nombre croissant des utilisateurs de ces salles dont souvent la conception n'est soumise à aucune règle d'hygiène ou de sécurité, favorise ainsi la création des nids de microorganismes favorisant leurs développements, d'où la contamination des personnes habituées à ces lieux.

Les maladies susceptibles d'être transmises dans cet environnement, sont notamment les gastroentérites, les maladies pulmonaires et les dermatites.

Les résultats obtenus lors de notre étude, montre que différentes espèces microbiennes prolifèrent au niveau de plusieurs points du matériel informatique utilisé et mis à la disposition du public.

Toutefois, avec une prédominance des Entérobactéries. Les différentes espèces du genre *Staphylococcus* tel *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus saprophyticus* sont très abondants dans ces lieux. Par ailleurs, nous avons aussi isolés d'autres espèces bactériennes telles *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus constellatus* et *Listeria grayi*.

L'importance de cette étude sur la contamination croisée des claviers est de nous permettre de décerner tous les problèmes ayant trait à la naissance, au développement, à la prolifération et à la transmission microbienne et de montrer les risques sanitaires que peuvent encourir les abonnés de ces lieux.

Cependant pour pallier à ce problème, la prévention, la sensibilisation et le respect des règles d'hygiène restent les meilleurs moyens pour maîtriser la qualité microbiologique des lieux car ces endroits restent désormais les endroits les plus fréquentés par la classe intellectuelle du pays.

Référence bibliographiques

- 1) **Astruc J, Beaucaire G, Choutet P, Ragnaud JM** ; (2003). *Maladies infectieuses* : le Popi guide de traitement. 3^{ème} édition, P 324
- 2) **Azel. Feron ;(1984) ; bactériologie medicale.C et R. p 121,127**
- 3) **Avril J.L, Dabernat H, Denis F, Monteil H;** (1992). *Bactériologie clinique*, 2^{ème} édition, Page : 168, 291, 152, 32.
- 4) **Avril J.L, Fauchère J.L** ;(2007). Cours de bactériologie DCEM1, Facuté de médecine de nantes, page : 36.
- 5) Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé;(1999) Manuel d'accréditation des établissements de santé,
- 6) **Ait Kaci S. et Hamdi M.S.,(2008)**. Contribution à l'étude des paramètres physico-chimiques et bactériologiques de l'embouchure de l'oued "Béni-Messous".DEUA en science de la mer. (I.N.S.M.A.L)
- 7) **Aouissi A., Fouzari A. et Meziane N., (2007)**. Qualité bactériologique de l'eau d'Oued Seybouse.Mémoire d'ingénieur. Université 8 mai 1945 Guelma. 57p.
- 8) **Apria** ; (1986), Gestion et maîtrise du nettoyage et de la désinfection dans les I.A.A. RTVA. p 37-39
- 9) **Bachelot R** ;(2003). Legionellose complements d'information au plan gouvernemental de prévention des legionelloses, *les services du MEDD (DPPR) avec ceux du ministère chargé de la santé (DGS)*; page : 02.
- 10) **Bariller. J** ; (1998), Surveillance et validation des opérations de nettoyage et de désinfection. « Nettoyage et désinfection dans les entreprises alimentaires », *Asept éditeur*, Paris, 221-232
- 11) **Boulangier S, Deschamps F** ;(2007).Les 100 principales maladies professionnelles et environnementales , *Ellipses Edition Markéting S.A*, Paris, page : 117.

- 12) **Bousseboua H** ; (2003). Cours de microbiologie générale, ed université mentouri constantine, page : 28.
- 13) **Bâ Abdoul** , (2003) *Internet, Cyber espace et usages en Afrique*, Paris : l'Harmattan, 281p.
- 14) **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.
- 15) **Boudraa W ; Aouissi A., (2011)** Contribution a l'étude de la qualité bacteriologique de l'eau d'Oued seybouse de la ville de Guelma, P 36-40.
- 16) **Bergeron V, Metahni A (2009)** : *la qualité de l'air intérieur* : une préoccupation croissante Annales des falsifications, de l'expertise chimique et toxicologique, p 971
- 17) **Castillo C. B, Bruckner D.A;** (1984) .*Comparative evaluation of the linkenand conventional methods for identification of members of the family Enterobacteriaceae.* page : 745,757
- 18) **Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec** ;(2006). Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus* : Méthode par filtration sur membrane, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, page : 06
- 19) **Carlier V.** (1986), Souillures et contaminations. p 13-18.
- 20) **Castells Manuel,** (1998) *la société en réseau. l'ère de l'information*, Paris, Fayard. p 665.
- 21) **Chaouch R., (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.
- 22) **Chéneau-Loquay Annie.** (2003) « Formes et dynamiques des accès publics à Internet en Afrique de l'Ouest : vers une mondialisation paradoxale ? » Extrait de la déclaration du Sommet mondiale de la société de l'information, Genève 10-12 décembre, p 38.
- 23) Centers for Disease Control and prevention - Healthcare Infection Control Practices Advisory Comittee (HICPAC). Draft guideline for environmental infection control in heathcare facilities.

- 24) **Costerton.J.W, Stewart.P.S, and Greenberg.E.P.**(1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Asept éditeur*, Paris .p16-24
- 25) **Cristian carip** (2011) ; *Microbiologie hygiène* : bases microbiologiques de la diététique. Paris p 61,90
- 26) **Dryden M, S** ;(1994) key Worth N,Stein K : asymptomatic food handler as the source of nosocomial salmonellosis.*J.Hosp.Infect* ;page:195,208.
- 27) **Daniel Stern.** (1999) : High Frequency e-mail at work in the Great Lake region, UN World Food Project, à l'e-mail de David Lush : Internet services via HF radio,
- 28) **Dettenkofer, M., Wentzler, S., Amthor, S., Motschall, E. et Daschner, F.D.,**(2011) Does disinfection of environmental surfaces influence nosocomial infection rates? A systematic review, *American Journal of Infect Control*, Pages 84-89
- 29) **Dégrément, (1998).** Mémento technique de l'eau 8ème édition *TecetDoc*. Paris 986p.
- 30) **Fall Aminata,** (2007) « usages des Nouvelles Technologies de l'Information et de la communication et développement des collectivités locales : le cas de l'internet dans la gestion des compétences transférées au conseil régional de Louga », mémoire de maîtrise de sociologie, p 131.
- 31) **Garry, P** ;(1998) La contamination biologique C.T.S.C.C.V ,Vol 8, N°3-*Alfort cedex*, P 157,160.
- 32) **Guillaume, P.Y ; (2004).** Les milieux de cultures
- 33) **Gabas Jean-Jacques** ; (2004). *société numérique et développement en Afrique. Usages et politiques publiques*, Karthala GEMDEV. Paris, ,379p.
- 34) **Goussault B** ; (1983), Importance du contrôle microbiologique,« Restauration », Informations techniques des services vétérinaires, p 277
- 35) **Hota, B** ;(2005) Contamination, Désinfection, and Cross-Colonization: Are Hospital Surfaces p 111
- 36) **Hall CB, Douglas RG Jr, Geiman JM;** (1980) possible transmission by fomites of respiratory syncytial virus. p 98-102.
- 37) **Hermon. C** ; (1993), Formation du personnel au nettoyage et à la désinfection, AGRüA, «Nettoyage et désinfection: approches intégrées ou externes », *M.C.I. éditeur*, Paris p 73-89

- 38) Institut Pasteur, Production ; (1981). Milieux et réactifs de laboratoire Pasteur.
- 39) **Jacques N** ;(2008). Légionelles et réseaux d'eau chaude sanitaire, Ancien gestionnaire des risques dans les réseaux sanitaires à l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris societe Isagua concept; page : 01.
- 40) **Joffin J, N.** Microbiologie technique, dictionnaire des techniques. p 258
- 41) **Joffin J, N et Leyrol G ; (2001).** Microbiologie Technique 1 : dictionnaire des techniques. 3^{ème} éditions ; CRDP d'Aquitaine ; page : 320
- 42) Journal of the American Medical Informatics Association ; (2002) p 500, 507,508
- 43) **Jones, J., Hoerle, D. et Riekse, R.** Stethoscopes: A Potential Vector of Infection?, Annals of Emergency Medicine, Pages 296-299
- 44) **Joseph P.G;**(2003). *Microbiologie alimentaire*, 3^{ème} édition dunob, paris, p 678.
- 45) **Jawad A, Heritage J, Snelling AM, Gascoyne-Binzi DM, Hawkey PM;**(1996) Influence of relative humidity and suspending menstrua on survival of *Acinetobacter* spp.on dry surfaces. *J Clin Microbiol.*p 34
- 46) **Kelly M, Pyrek ;**(2014) Cross- Contamination Prevention : adressing keyboards as fomites, *infection control today*,p 3,8,17.
- 47) **Klinger.C, Filloux.A, and Lazdunski.A.** (2005). Les biofilms, forteresses bactériennes. p 42-43.
- 48) **Kramer, A., Schebke, I. et Kampf, G.** (2006) How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review, *BMC Infectious Diseases*, p 160
- 49) **Labres et Mouffok F., (2008).** Le cours national d'hygiène et de microbiologie des eaux de boisson. Manuel des travaux pratique des eaux. *Institut Pasteur d'Algérie.* 53p.
- 50) **Larpent J. P.** Microbiologie alimentaire, Technique de laboratoire, édition Lavoisier *TEC-DOC.*p 25

- 51) **Leleu G.**-(2011), Procédure de contrôle du nettoyage et de la désinfection des paillasses et du matériel. Paris, *Tec. & Doc.* p 1- 8.
- 52) **Marie-A, Jean-M, Norman K** ;(2002). les risques à la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur, direction des risques biologiques, environnementaux et occupationnels et laboratoire de santé publique du Québec, page: 4 ,12.
- 53) **Mouffouk F., (2001).** Guide technique d'analyses bactériologiques des eaux de mer, institut Pasteur d'alger.40p.
- 54) **Moustardier G** ; (1972) *Bactériologie médicale* ; 4^{ème} édition, librairie Maloine. S. A. éditeur, Paris.p 683
- 55) **Murray P .V, Baron E.J, Pfaller M. A,Tenover F. C,Yolken R. H;** (1999) . Manal of clinical microbiology, 7th edition, p:214
- 56) **Maser Copy;** (2009-2011): cours S4 medicale. 2^{ème} edition , P6
- 57) **Noskin GA, Stosor V, Cooper I, Peterson LR.;**(1995) Recovery of vancomycin-resistant enterococci on fingertips and environmental surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol*; p 16
- 58) **Neely, A.N. et Sittig, D.F.** Basic Microbiologic and Infection Control Information to Reduce the Potential Transmission of Pathogens to Patients via Computer Hardware,p 13
- 59) **Orth G, Sansonetti P;** (2006). La maîtrise des maladies infectieuses; un défi de santé publique, une ambition médicoscientifi que, Académie des sciences; p : 10 ,11.
- 60) **Oie S, Kamiya A.** (1996); Survival of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on naturally contaminated dry mops. p 145, 09.
- 61) **Prescott H,K** ; (1999).*Microbiologie*, (De boeck université).
- 62) **Pierrick Goldin** ;(2014)., assainir ou désinfecter,Cardiff University School of Pharmacy,
- 63) **Patrick Berche, Jean-Louis Gaillard, Michel Simonet** ;(1989) : *bactériologie* (les bactéries des infections humaines).Medecine-Science-Flammarion, P660
- 64) **Rouaiguia M., (2010).** *Qualité micrbiologique de l'eau de OuedMessida.* Mémoire de master 2. Université 8 mai 1945 Guelma. 78p.
- 65) **Rozier J** ;(1986). Stratégie de l'hygiène. RTVA.P :24-28

- 66) **Singleton P** ; (1999). *Bactériologie* (cours 2^{ème} cycle); DUNOD; 4^{ème} édition, Paris. p 112.
- 67) **Singleton P** ;(2008).*Bactériologie* : pour la médecine, la biologie et les biotechnologies ;6^{ème} édition, Belgique. P 598
- 68) **Steinmueller Edward.**, (2001). *les tics et les possibilités pour les pays en voie de développement de brûler les étapes* , revue international du travail, p 140
- 69) **Tandia C.T., (2007).** Contrôle et suivi de la qualité des eaux usées. Protocole de détermination des paramètres physico-chimiques et bactériologiques.*CREPA*. (3). 1-52.
- 70) **Thioune Ramata Molo. et Sène Khamate**, (2001) Etude panafricaine : *Technologie de l'Information et de la Communication et développement communautaire*. Leçons apprises des projets ACACIA : cas du Sénégal, Dakar, CRDI, p 113
- 71) **Thierry Danigo**, (2006). Clavier tactile Mediclean,
- 72) **Wendt C, Dietze B, Dietz E, Rüden H.** (1997) Survival.of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. J Clin Microbiol; p 35
- 73) **Wilde J, Van R, Pickering L, Eiden J, Yolken R.** (1992) Detection of rotaviruses in the day care environment by reverse transcriptase polymerase chain reaction; p 507, 11.

Sites web :

- 74) www.liberation.fr/.../010125216-vos-claviers-plus-sales-que-vos-toilettes.
(consulter le 30/03/2017)
- 75) www.neroform.ch/fr/neroform-sa/etude-sur-la-charge-bacterienne/. (Consulter le 04/04/2017)
- 76) <https://canadasafetycouncil.org/fr/.../au-travail-des-germes-ici-la-partout> .
(Consulter le 09/04/2017)
- 77) www.alphacommed.com/pdf/ergonoflex/Claviers_souris_medicaux.pdf.
(Consulter le 20/04/2017)
- 78) www.lematin.ch/sante/bacteries-adorent-postes-travail/story/28707685.
(Consulter le 20/04/2017)
- 79) www.leclimat.cd/News/Details/.../15-objets-sales-insoupconnes . (Consulter le 21/04/2017)
- 80) <http://www.phac-aspc.gc.ca/influenza/influenza-undrstnd-fra.php#1>(
Consulter le 21/04/2017)
- 81) <http://www.bioandgeek.com/index.php?page=informatique-tuto-comment-nettoyer-correctement-son-clavier> (Consulter le 25/04/2017)
- 82) <http://agro.sanimarc.com/ViewFile.ashx?FileId=890> (Consulter le 22/04/2017)
- 83) http://gric.univlyon2.fr/gric3/decouverte/document/NotesdeCours/Crs_inf_nos_o_LyonII.htm (Consulter le 22/04/2017)
- 84) <http://www.radio-canada.ca/nouvelles/societe/2008/05/04/001-Clavier-ordi-bacteries.shtml>(Consulter le 23/05/2017)
- 85) <http://www.bluedis.fr/index.php/acclavier>(Consulter le 23/04/2017)
- 86) http://www.sixi.be/Claviers-souris-et-bacteries_a633.html(Consulter le 23/04/2017)
- 87) http://content.myschool.lu/downloads/mysecureit/37_NettoyagePlaceDeTravail.pdf (Consulter le 23/04/2017)
- 88) www.jrscience.wcp.muohio.edu/nsfall02/FinalArticles/Final6HereistheFINALfinal.html (Date de consultation : 01/05/2017)
- 89) <http://ordinateurwince.blogspot.com/2012/10/limportance-des-claviers-et-souris.html>(Consulter le 03/05/2017)

- 90) [www. gric.univ-lyon2.fr /contamination/surfaces/sant_bacteries](http://www.gric.univ-lyon2.fr/contamination/surfaces/sant_bacteries) (Consulter le 03/05/2017)
- 91) http://www.techmicrobio.eu/documentation_fabricants/Biomerieux%20et%20API/Staphylococcus/API%20Staph.pdf(Consulter le 03/05/2017)
- 92) www.infectiologie.com/site/medias/_.../legionelle-SPILF-aout2004.pdf(Consulter le 09/05/2017)
- 93) http://fr.medipedia.be/rhume/au-quotidien/articles_comment-eviter-qu-un-rhume-ne-s-aggrave-ou-ne-se-transmette_162(Consulter le 10/05/2017)
- 94) <http://www.topsante.com/medecine/troubles-ori/grippe/vivre-avec/grippe-combien-de-temps-est-on-contagieux-23709>(Consulter le 10/05/2017)

Annexe :

➤ Les milieux de cultures :

◆ Milieu de Chapman:

Composition:

- Peptone tryptique de caséine10 g.
- Extrait de viande.....1 g.
- Chlorure de sodium.....75 g.
- Mannitol.....10 g.
- Rouge de phénol..... 0.025 g.
- Agar15 g.
- Eau distillée.....1000 ml

Préparation :

Après dissolution tous les ingrédients dans l'eau distillée ajuster le PH à 7.5 et stériliser à 121C° pendant 20 mn.

◆ Gélose nutritive :

Composition:

- extrait de viande de l'œuf 1 g.
- Agar15 g
- peptone5 g.
- chlorure de sodium..... 15 g.
- extrait de levure2 g.

➤ Préparation :

Verser 28 g dans un litre d'eau distillée. Ajuster le PH à 7.4. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

◆ Gélose Hektoen :

- Protasepeptone..... 2 g
 - Extrait de levure.....3 g
 - Chlorure de sodium.....5 g
 - Thiosulfate de sodium.....5 g
 - Sels biliaires 9 g
 - Citrate de ferammoniacale..... 1.5 g
 - Salicine2 g
 - Saccharose12 g
 - Lactose2 g
 - Fuchsine acide.....0.1 g
 - Bleu de brothynol 0.06 g
 - Agar.....1.4 g
 - Eau distillée.....1000 ml
- PH =7.5

◆ **Le milieu de Sabouraud :**

- Glucose.....	20 g
- Peptone.....	10 g
- Agar	15 g
- Eau distillé.....	1000 ml

◆ **Gélose SS:**

Peptone.....	5,0g
Extrait de viande.....	5,0g
Lactose.....	10,0g
Citrate de sodium.....	10,0g
Citrate de fer III.....	1,0g
Sels biliaires.....	8,5g
Vert brillant.....	3,3mg
Rouge neutre.....	25mg
Thiosulfate de sodium.....	8,5g
Agar.....	12,0g

PH:7,3

Préparation:

63g de poudre dissous par ébullition.

Se reporter à la notice en raison de variation de la composition. (Ne pas autoclave).

◆ **Milieu TSI:**

- Agar.....	12 g/L
- Extrait de l'œuf	3 g/L
- Extrait de levure	3 g/L
- Peptone	20 g/L
- Lactose.....	10 g/L
- Saccharose.....	10 g/L
- NaCl.....	5 g/L
- Glucose.....	1 g/L
- Citrate ferrique.....	3 g/L
- Thiosulfate de sodium.....	3 g/L
- Rouge de phénol.....	0,025 g/L
- Eau distillée.....	1000 ml

Ajuster le PH à 7.4

➤ **Réactifs :**

◆ **Réactif TDA :** pour la recherche de tryptophane désaminase :

Perchlorure de fer.....	3.4 g
Eau distillée.....	100 ml

◆ **Réactif IND :** pour la recherche de l'indole :

Paradiméthylaminobenzaldéhyde.....	5.0 g
Alcool isoamylique.....	75 ml
HCL	37 %

◆ **Réactif Kowacks :** pour la recherche de l'indole.

- Paradeethylamino benzaldéhyde.....	5 g
- Alcool amylique.....	75 ml
- HCl pur.....	25 ml

◆ **Rouge de méthyle :**

- Rouge de methyle.....	0,5 g
- Alcool éthylique a 60°	100 ml

Colorants:

◆ **Lugol :** Elle est utilisée sur la coloration de Gram pour fixer le colorant

- Iode.....	1 g.
- Iodure de potassium.....	2 g.
- Eau distillée.....	3 g.

◆ **Violet de gentiane :** Elle est utilisée pour colorer les bactéries.

- Violet de gentiane.....	1 g.
- Ethanol à 90%.....	1 ml.
- Phénol.....	2 g.
- Eau distillée.....	100 ml

◆ **fuchsine de ziehl :**

- Fuchsine basique.....	1 g
- Alcool éthylique.....	100 ml
- Phénol.....	5 g
- Eau distille.....	100 ml

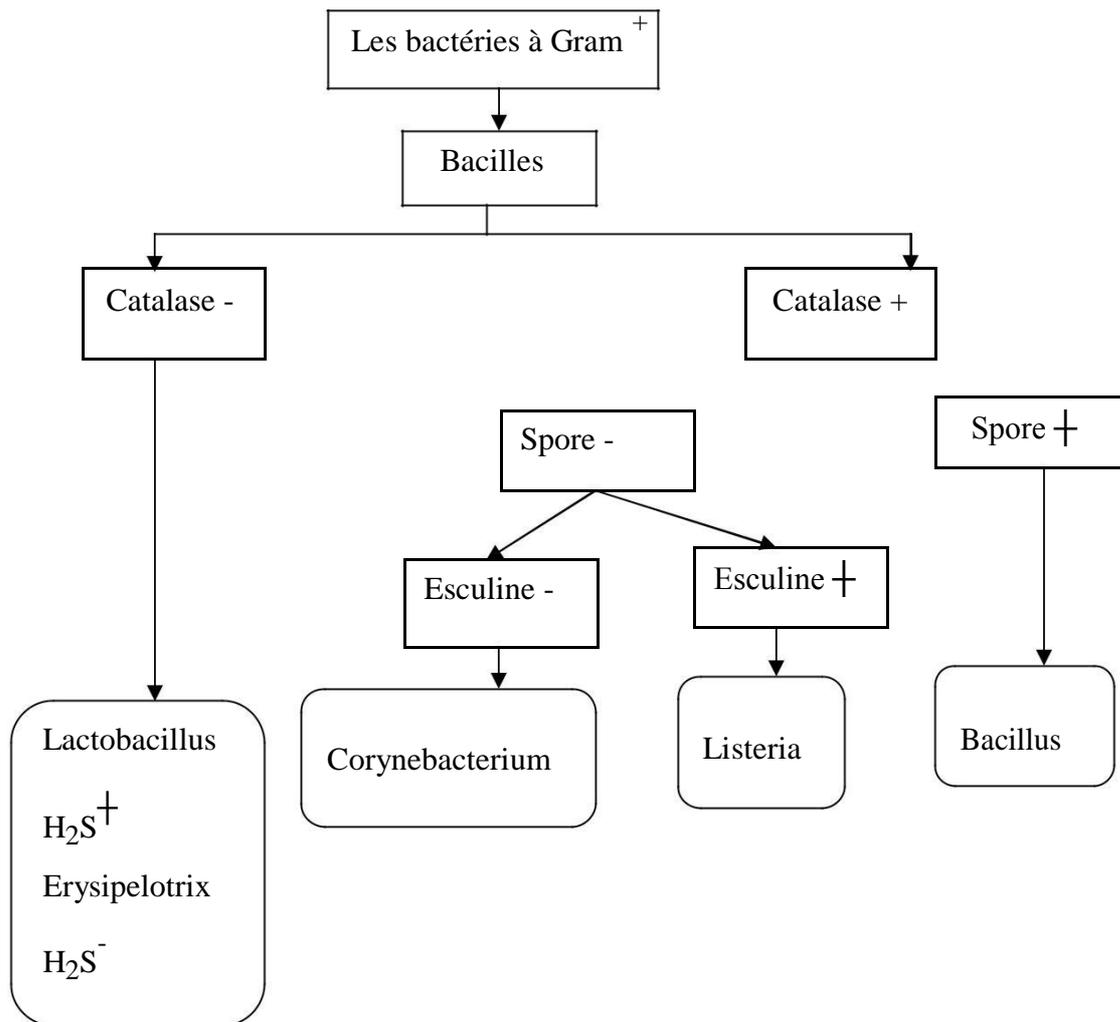


Figure 1 :Schémas de classification des bactéries a Gram(+)

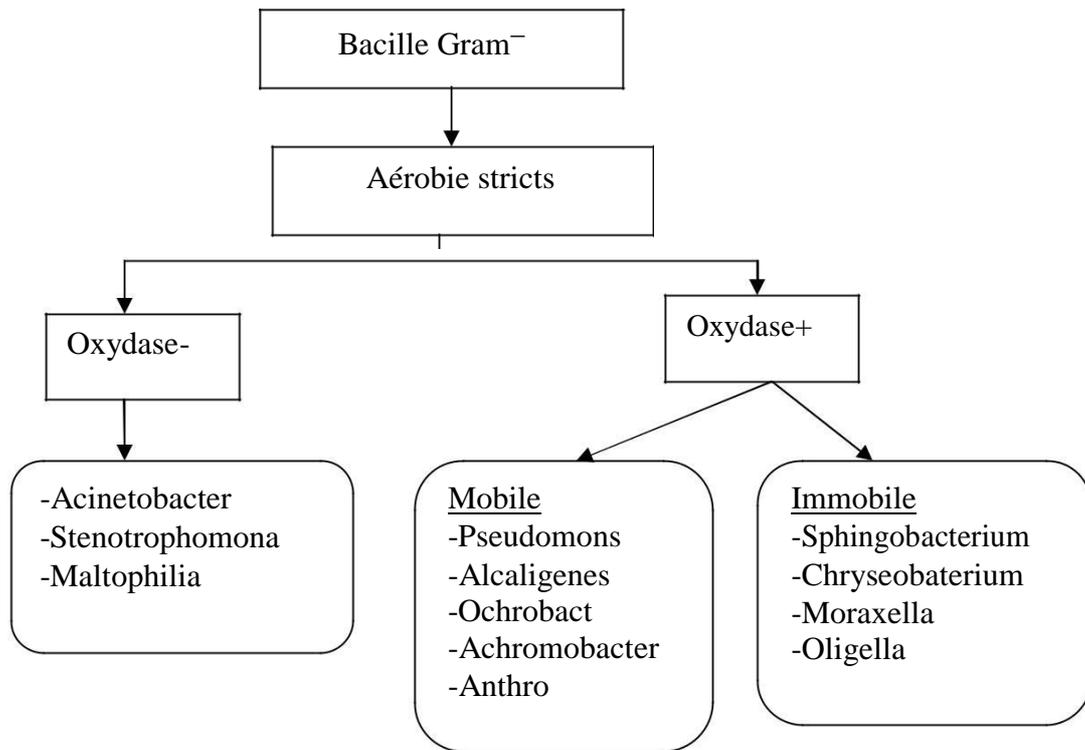


Figure 2 :Schéma de classification des bactéries a Gram(-),aerobies stricts

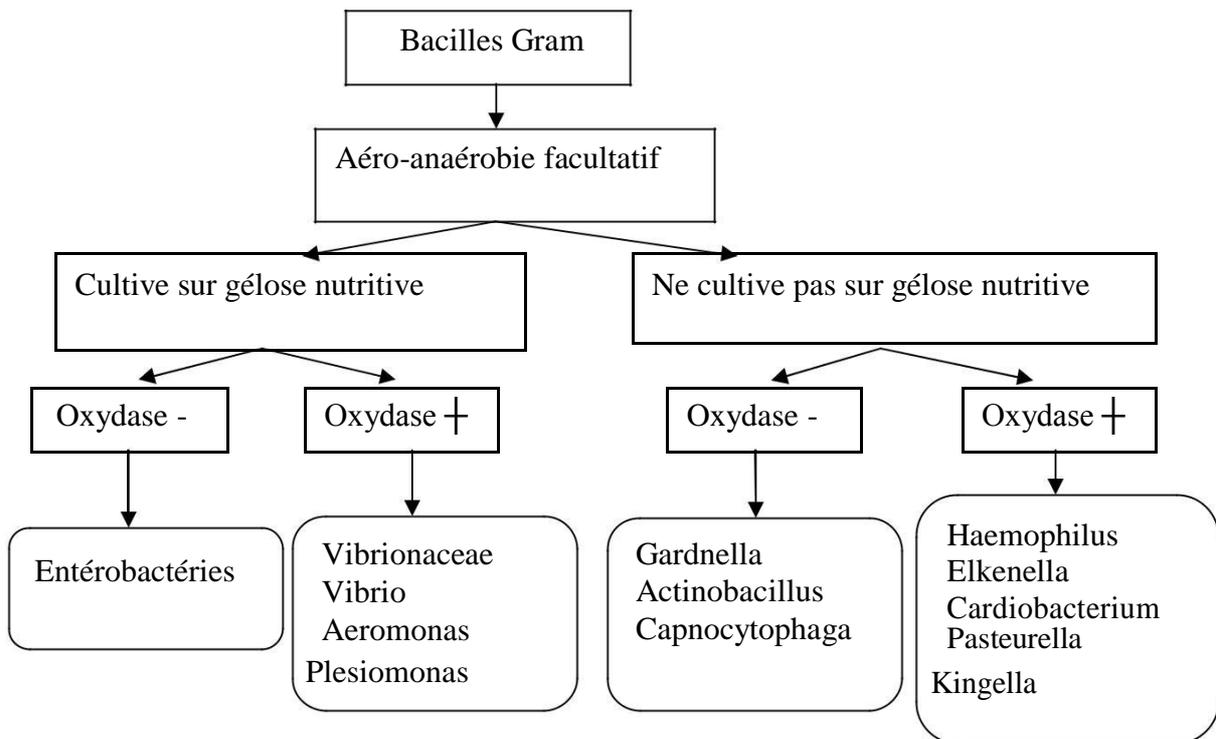


Figure 3 :Schéma de classification des bactéries a Gram(-),aéro-anaérobie facultatif

Tab. 1. Lecture de la galerie miniaturisée API 20E (Lightfoot et Maier, 1998).

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	Ortho-nitro-phenylgalactoside	Beta-galactosidase	incolore	jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orangé
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orangé
ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
CIT	Citrate de sodium	Utilisation du citrate	Vert pâle/jaune	Bleu-vert/vert
H2S	Thiosulfate de sodium	Production d'H2S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/fin liseré
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA / Immédiat	
			Jaune	Marron foncé
IND	Tryptophane	Production d'indole	IND / 2 mn, maxi	
			Jaune	Anneau rouge
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP 1 + VP 2 / 10 mn	
			incolore	Rosé-rouge
GEL	Gélatine de Kohn	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	Glucose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-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
SOR	Sorbitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
RHA	Rhamnose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune

SAC	Saccharose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MEL	Melibiose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
ARA	Arabinose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
Ox	Sur papier filtre	Cytochrome-oxydase	Ox / 5-10 mn	
			incolore	Anneau violet
NO3-NO2	Tube GLU	Production de NO2 Réduction au stade N2	NIT 1 + NIT 2 / 2-3 mn	
			Jaune	Rouge
			Zn	
			Rouge	Jaune
MOB	Microscope	Mobilité	Immobile	Mobile
MAC	Milieu de MacConkey	Culture sur	Absence	Présence
OF	Glucose	Fermentation : sous huile	Vert	Jaune
		Oxydation : à l'air	Vert	Jaune
CAT		Possession d'une catalase	H2O2 / 1-2 mn	
			Pas de bulles	Bulles

Tab.2. Tables de Mac Grady

Tables de Mac Grady

<i>2 tubes par dilution</i>		<i>3 tubes par dilution</i>					
Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules
000	0.0	000	0.0	201	1.4	302	6.5
001	0.5	001	0.3	202	2.0	310	4.5
010	0.5	010	0.3	210	1.5	311	7.5
011	0.9	011	0.6	211	2.0	312	11.5
020	0.9	020	0.6	212	3.0	313	16.0
100	0.6	100	0.4	220	2.0	320	9.5
101	1.2	101	0.7	221	3.0	321	15.0
110	1.3	102	1.1	222	3.5	322	20.0
111	2.0	110	0.7	223	4.0	323	30.0
120	2.0	111	1.1	230	3.0	330	25.0
121	3.0	120	1.1	231	3.5	331	45.0
200	2.5	121	1.5	232	4.0	332	110.0
201	5.0	130	1.6	300	2.5	333	140.0
210	6.0	200	0.9	301	4.0		
211	13.0						
212	20.0						
220	25.0						
221	70.0						
222	110.0						

<i>5 tubes par dilution</i>							
Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules
000	0.0	203	1.2	400	1.3	513	8.5
001	0.2	210	0.7	401	1.7	520	5.0
002	0.4	211	0.9	402	2.0	521	7.0
010	0.2	212	1.2	403	2.5	522	9.5
011	0.4	220	0.9	410	1.7	523	12.0
012	0.6	221	1.2	411	2.0	524	15.0
020	0.4	222	1.4	412	2.5	525	17.5
021	0.6	230	1.2	420	2.0	530	8.0
030	0.6	231	1.4	421	2.5	531	11.0
100	0.2	240	1.4	422	3.0	532	14.0
101	0.4	300	0.8	430	2.5	533	17.5
102	0.6	301	1.1	431	3.0	534	20.0
103	0.8	302	1.4	432	4.0	535	25.0
110	0.4	310	1.1	440	3.5	540	13.0
111	0.6	311	1.4	441	4.0	541	17.0
112	0.8	312	1.7	450	4.0	542	25.0
120	0.6	313	2.0	451	5.0	543	30.0
121	0.8	320	1.4	500	2.5	544	35.0
122	1.0	321	1.7	501	3.0	545	45.0
130	0.8	322	2.0	502	4.0	550	25.0
131	1.0	330	1.7	503	6.0	551	35.0
140	1.1	331	2.0	504	7.5	552	60.0
200	0.5	340	2.0	510	3.5	553	90.0
201	0.7	341	2.5	511	4.5	554	160.0
202	0.9	350	2.5	512	6.0	555	180.0

Tableau 3 : résultat macroscopique poste N° 5, 9,12

Milieu de culture	Couleur et aspects des colonies	La taille	La forme
Gélose Nutritive	Colonies blanche cotonneuse	Grande	Irrégulière bombés
Mac Conkey	Pas de pousse	Pas de pousse	Pas de pousse
Chapman	colonies jaune avec virage de couleur vers le jaune	Moyennes	Régulières bombé arrondies
Gélose SS	Culture négative	Culture négative	Culture négative
Gélose Hectoén	Colonies marron muqueuse	Petite	Régulières bombé arrondies

Tableau 4 ; résultat macroscopique poste N° 3 ,7,10,16

Milieu de culture	Couleur et aspects des colonies	La taille	La forme
Gélose Nutritive	Colonies blanche lisse	moyenne	régulière arrondies
	Colonies jaunes muqueuses	petite	Régulières arrondies bombé
Mac Conkey	Culture négative	Culture négative	Culture négative
Chapman	Virage de couleur vers le jaune des colonies jaune doré lisse	moyennes	Régulières arrondies
Gélose SS	Culture négative	Culture négative	Culture négative
Gélose Hectoén	Culture négative	Culture négative	Culture négative

Tableau5 : résultat macroscopique poste N° 4, 15,13

Gélose Nutritive	Colonies blanches rugueuses	grandes	Régulière bombés arrondies
	colonie blanchâtre lisse	moyennes	
Macconkey	colonies marron rugueuses	moyennes	Irrégulière bombés arrondies
Chapman	colonies jaunâtres avec sommet Cotonneuse	moyennes	Irrégulière bombé arrondies
Gélose SS	colonies rouges lisses	petites	Régulière bombés arrondies
Gélose Hectoen	Colonies vertes rugueuses	Grandes	Régulières bombé arrondies
	Colonies orange avec fond marron rugueuses		