



# *Liste des abréviations*

- ❖ **ADN** : acide désoxyribonucléique
- ❖ **AFNOR** : association française de normalisation
- ❖ **BGNOP** : bacille Gram négatif oxydase positif
- ❖ **CMI** : concentration minimale inhibitrice
- ❖ **DMI** : dose minimale inhibitrice
- ❖ **HE** : huile essentielle
- ❖ **LRDEHM** : laboratoire régional de diagnostic épidémiologique et d'hygiène du milieu
- ❖ **MS** : ministère de la santé
- ❖ **ONPG**: Orthonitrophényl -D-Galactopyranoside
- ❖ *S.aureus* : *Staphylococcus aureus*
- ❖ **S. non aureus** : *Staphylococcus non aureus* ou *staphylococcus* à coagulase négatif
- ❖ **TMI** : temps minimal d'inhibition
- ❖ **UHA** : unité d'hygiène alimentaire
- ❖ **VIH** : virus de l'immunodéficience humaine



# *Illustrations des tableaux et figures*

## **1. Liste des Tableaux**

- ❖ Tableau 1 : Modes d'action des désinfectants.....10
- ❖ Tableau 2 : Spectre d'activité des désinfectants.....11
- ❖ Tableau 3 : Répartition des prélèvements réalisés.....24

## **2. Liste des Figures**

- ❖ Figure 1 : Schématisation de la contamination de la surface.....3
- ❖ Figure 2 : Susceptibilité microbienne aux biocides.....12
- ❖ Figure 3 : Pourcentage de contamination des points de prélèvements de surface.....24
- ❖ Figure 4 : Répartition de la contamination des surfaces en fonction des points de prélèvement.....25
- ❖ Figure 5 : Répartition de la contamination des points de prélèvements en fonction de la charge bactérienne.....25
- ❖ Figure 6 : Répartition des bactéries isolées des prélèvements de surfaces en fonction de la forme et de la coloration de Gram.....26
- ❖ Figure 7 : Distribution globale des bactéries isolées des prélèvements de surfaces.....27
- ❖ Figure 8 : Distribution des bactéries isolées des surfaces par points de prélèvement.....28
- ❖ Figure 9: Pourcentage de contamination des points de prélèvements d'air.....28
- ❖ Figure 10: Répartition de la contamination de l'air en fonction des points de prélèvement.....29
- ❖ Figure 11: Répartition des bactéries isolées des prélèvements d'air en fonction de la forme et de la coloration de Gram.....30
- ❖ Figure 12: Distribution globale des bactéries isolées des prélèvements de l'air.....30
- ❖ Figure 13: Distribution des bactéries isolées de l'air par points de prélèvement.....31
- ❖ Figure 14: Evaluation de l'efficacité des désinfectants sur les souches isolées des surfaces contrôlées.....32
- ❖ Figure 15: Détermination de la dilution cible du désinfectant D3.....33
- ❖ Figure 16: Détermination du temps minimal d'inhibition (TMI) du désinfectant D3.....33
- ❖ Figure 17 : Evaluation de l'efficacité des désinfectants sur les souches isolées des prélèvements d'air.....34



# Glossaire

- ❖ **AFNOR** : Association Française de Normalisation qui est un organisme officiel chargé de fixer les normes.
- ❖ **Agent tensio-actif** : Produit capable d'influencer les forces électriques à la surface des molécules.
- ❖ **Asthme** : est une **maladie** du système respiratoire touchant les voies aériennes inférieures et notamment les **bronchioles**, définie comme étant une gêne respiratoire à l'expiration.
- ❖ **Bactéricide** : Agent antimicrobien pouvant détruire les cellules végétatives bactériennes.
- ❖ **Bactériostatique** : Agent chimique qui empêche la multiplication des bactéries, sans les tuer.
- ❖ **Biocides** : Ensemble des produits chimiques dont l'action est de détruire ou d'empêcher le développement des micro-organismes.
- ❖ **Fongicide** : Agent antimicrobien pouvant détruire les champignons y compris leurs spores.
- ❖ **Herpès** est une **maladie virale** contagieuse responsable d'affection de la **peau** et des muqueuses caractérisée par une éruption vésiculeuse de boutons groupés.
- ❖ **Infections nosocomiales** : sont les infections contractées au cours d'un séjour dans un établissement de santé. Elle est aussi appelée infection associée aux soins.
- ❖ **Mouvement brownien** : ou processus de Wiener, est une description mathématique du mouvement aléatoire d'une « grosse » particule immergée dans un fluide et qui n'est soumise à aucune autre interaction que des **chocs** avec les « petites » molécules du fluide environnant.
- ❖ **Mouvement chimiotrope** : Changement de direction d'un organisme animal ou végétal, en présence d'une modification chimique.
- ❖ **Mycobactéricide** : Agent antimicrobien pouvant détruire les mycobactéries.
- ❖ **Savon** : Produit qui sert à dissoudre les graisses. Il est composé de graisse et de soude caustique.
- ❖ **Sporicide** : Agent antimicrobien pouvant détruire les spores bactériennes..
- ❖ **Tensioactivité** : Aptitude des corps mis en solution à modifier la tension superficielle du solvant.
- ❖ **Virucide** : Agent antimicrobien pouvant détruire les virus.



# Résumé

Assurer la sécurité de ses activités et prévenir le risque infectieux sont parmi les objectifs de la démarche qualité instaurée au LRDEHM. Cette maîtrise ne peut être obtenue que par le renforcement et l'application de bonnes pratiques d'hygiène et de désinfection efficace.

Notre étude, mise en place pour atteindre ces objectifs, a été réalisée au LRDEHM de Fès, afin de contrôler l'environnement de l'UHA, d'identifier les germes isolés et d'évaluer l'efficacité de différents produits antimicrobiens sur les micro-organismes retrouvés.

28 points ont fait l'objet d'un contrôle avant désinfection de l'environnement. Ces prélèvements ont été effectués au niveau des paillasse, des étuves et des réfrigérateurs de l'unité d'hygiène alimentaire. La moitié des contrôles a été consacrée pour évaluer la qualité de la surface et l'autre moitié pour la surveillance de l'air.

Le contrôle de l'environnement a révélé un pourcentage de contamination de 92.86%. Le dénombrement et l'identification microbiologique des germes isolés ont montré la prédominance des bactéries à Gram positif ; les bacilles sur les surfaces (*Bacillus sp*) et les cocci dans l'air (*S. non aureus*).

Les résultats des tests de sensibilité des bactéries aux désinfectants soulignent l'existence d'une forte variabilité interspécifique de cette résistance et, contrairement à une croyance répandue, les souches Gram positif sont apparues généralement plus résistantes que les souches Gram négatif. Une variabilité intra-espèce de la résistance vis-à-vis de différents désinfectants a été notée. Le détergent D3 appartenant à la classe des halogénés a été le produit le plus efficace pour désinfecter les surfaces, sa dilution au 1/2 a révélé une sensibilité de 50% des bactéries testées. Le TMI est de 40 min pour la quasi-totalité des germes sauf *Lactobacillus* (60min).

Concernant l'air, l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* est plus commode pour la désinfection (100%) que l'alcool éthylique (66.66%), mais une synergie entre les 2 antimicrobiens pourrait aboutir à une décontamination plus efficace (100%).

Dans le but de réaliser l'objectif fixé par le laboratoire « maîtrise du risque infectieux lié l'environnement », il est recommandé de respecter la marche en avant et les règles préétablies par le laboratoire (autorisation d'accès,..), d'appliquer un protocole de désinfection fiable et défini, de contrôler régulièrement l'environnement selon la fréquence décrite dans la procédure.

**Mots clés :** environnement, maîtrise, risques infectieux, désinfection, contamination, unité d'hygiène alimentaire, LRDEHM.



# Présentation du LRDEHM

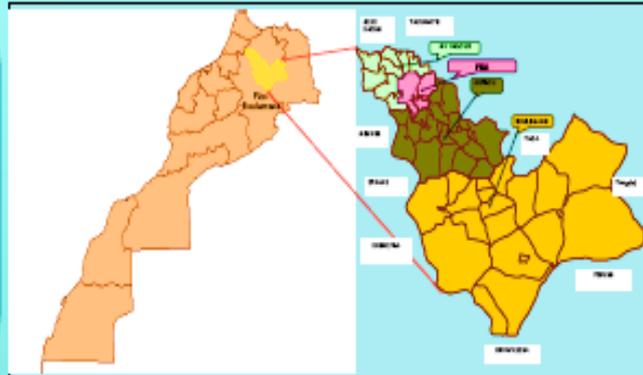
## LABORATOIRE REGIONAL DE DIAGNOSTIC EPIDEMIOLOGIQUE ET D'HYGIENE DU MILIEU DE LA VILLE DE FES

### HISTORIQUE

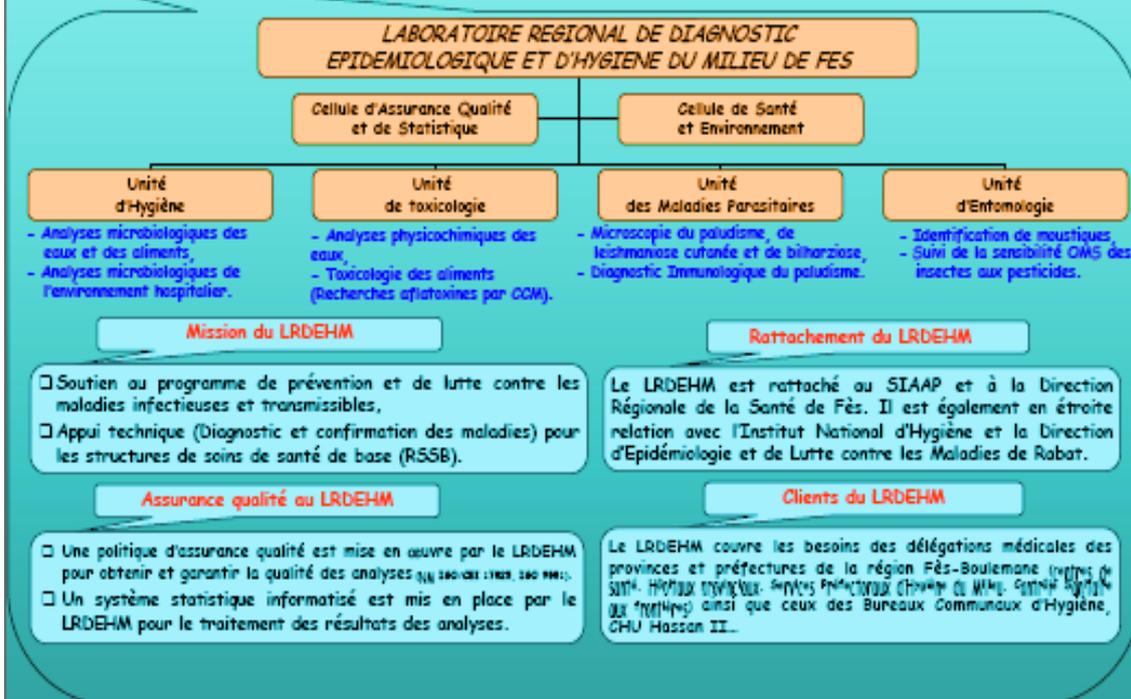
En 1977 Le Ministère de la Santé a créé des laboratoires "à visée préventive" : les Laboratoires de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu (LDEHM). Ils constituent une structure d'appui indispensable pour la surveillance épidémiologique des maladies infectieuses et transmissibles et pour les programmes sanitaires du Ministère de la Santé dans le cadre de l'Hygiène de l'environnement.

Actuellement il existe 42 LDEHM, Le laboratoire de Fès fait partie des 11 laboratoires régionaux qui ont vu le jour à partir des années 80. Il est implanté à l'Hôpital EL GHASSANI et est individualisé des Laboratoires d'analyses cliniques et de transfusion.

### SITUATION GÉOGRAPHIQUE DE LA VILLE DE FÈS



### Organisation fonctionnelle du LRDEHM



### Perspectives

- Structurer la collaboration et la coopération du laboratoire avec son environnement
- Développer et réaliser des études épidémiologiques en relation avec ses activités
- Installer d'autres analyses:
  - Analyses toxicologiques de l'eau (recherches des pesticides et métaux lourds).
  - Parasitologie des eaux.
  - Sérologie et PCR du paludisme.
  - Entomologie du moustique vecteur des leishmanoses.





# Sommaire

Dédicaces.....	i
Remerciements.....	ii
Liste des abréviations.....	iii
Illustrations des tableaux et figures.....	iv
Glossaire .....	v
Résumé.....	vi
Présentation du LRDEHM .....	vii

<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
-----------------------------------	----------

## **Partie bibliographique**

<b>I. Contamination de la surface et adhésion microbienne.....</b>	<b>2</b>
1. Mécanisme de contamination de la surface.....	2
2. Mesurage de la contamination de surface .....	3
<b>II. Contamination de l'air.....</b>	<b>4</b>
1. Sources de contamination.....	4
2. Mesurage de la contamination de l'air.....	4
<b>III. La désinfection .....</b>	<b>6</b>
1. Généralités.....	6
2. Classes, avantages et inconvénients des désinfectants .....	6
3. Mode d'action des désinfectants.....	10
4. Spectre d'activité des désinfectants.....	10
5. Facteurs favorisant l'activité d'un désinfectant.....	11
6. Résistance microbienne aux désinfectants.....	11
7. Evaluation de l'action antimicrobienne des détergents.....	13
8. Désinfection des locaux et des surfaces .....	13
9. Désinfection de l'air .....	14

## **Matériel et méthodes**

<b>1. Type d'étude.....</b>	<b>16</b>
<b>2. Lieu d'étude.....</b>	<b>16</b>
<b>3. Points de prélèvements.....</b>	<b>16</b>
<b>4. Prélèvements de surface et de l'air.....</b>	<b>16</b>
A- Prélèvement de surface.....	16
B- Prélèvement de l'air.....	16
<b>5. Analyse bactériologique et identification.....</b>	<b>16</b>
A- Culture .....	16



**DRS**



B- Purification et identification des cultures obtenues sur gélose MCT et sur milieu PCA .....	17
<b>6. Evaluation de l'activité antibactérienne des désinfectants sur les souches isolées</b> .....	<b>21</b>
6.1. désinfectants.....	22
6.2. Méthodes.....	22
<b>7. Outil d'analyse</b> .....	<b>23</b>

***Résultats***

<b>A- Contrôle de l'environnement</b> .....	<b>24</b>
1. Contrôle de surface.....	24
2. Contrôle de l'air .....	28
<b>B- Evaluation de l'activité antibactérienne des désinfectants sur les souches isolées</b> .....	<b>31</b>
1. Evaluation de l'efficacité des désinfectants sur les souches isolées des surfaces contrôlées.....	31
2. Détermination de la dilution cible .....	32
3. Détermination du temps minimal d'inhibition (TMI) .....	33
4. Evaluation de l'action antimicrobienne des désinfectants sur les souches isolées des prélèvements d'air.....	34

<b><i>Discussion</i></b> .....	<b>35</b>
--------------------------------	-----------

<b><i>Conclusions, recommandations et perspectives</i></b> .....	<b>38</b>
--	-----------

<b><i>Références bibliographiques</i></b> .....	<b>39</b>
---	-----------



# *Introduction générale*

*Rapport-gratuit.com*   
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES



DRS



Vecteurs de contamination, les milieux de l'environnement disséminent les micro-organismes à de longue distance, et contribuent insidieusement à leur transmission à divers supports inertes, entraînant ainsi des conséquences néfastes telles que l'altération des denrées alimentaires et l'augmentation des taux d'infections aussi bien en milieu hospitalier qu'en milieu communautaire (SQUINAZI, 2006).

Dans les laboratoires de microbiologie, les activités présentent des risques infectieux pour le personnel qui y participent et peuvent aussi influencer la sécurité des activités, la qualité et la fiabilité des analyses. Les stratégies de maîtrise de l'environnement permettant de réduire et de supprimer le risque infectieux, exigent d'instaurer une démarche de prévention se basant notamment sur des aspects organisationnels et techniques, la formation du personnel et sur le contrôle et la désinfection rigoureux (TOUCHE et al, 2002).

Assurer un statut hygiénique aux matériels de travail, à l'air et aux surfaces, des traitements de désinfection se basent sur l'utilisation de procédés physiques (UV, traitement thermique...) et sur des agents chimiques peuvent être appliqués. L'efficacité de ces agents reste toutefois variable d'une application à une autre. Cette variation de réponse aux biocides peut être liée à des modifications physico-chimiques de la surface des cellules microbiennes ; aux modifications pouvant être dues à un changement dans leur physiologie, ou encore à leurs conditions de conservation et de mise en culture.

Faisant partie de la direction régionale du Ministère de la Santé (MS), le laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu (LRDEHM) de Fès, est chargé d'assurer le contrôle sanitaire des maladies à transport hydrique et alimentaire, de contribuer aux investigations épidémiologiques en assurant les analyses nécessaires, d'assurer la confirmation des échantillons examinés par les LDEHM provinciaux de la région. Rassurer ses activités et prévenir le risque infectieux sont parmi les objectifs de la démarche qualité instaurée. Pour cela, il a fallu réglementer l'accès des personnes étrangères, aménager le laboratoire selon les normes internationales, assurer une désinfection efficace, travailler selon des méthodes normalisées.

Cependant, vu l'augmentation de la résistance des germes à diverses molécules telles que les désinfectants et les antibiotiques, nous avons jugé intéressant d'apprécier l'action antibactérienne de différents désinfectants sur les germes isolés de l'environnement de l'unité d'hygiène alimentaire du LRDEHM. Dans ce contexte et dans le cadre de notre projet de fin d'études, nous avons réalisé ce travail intitulé :

**« Evaluation de l'activité antibactérienne de divers produits sur les germes isolés du LRDEHM de la ville de Fès »**

Les objectifs de ce travail étaient :

- De déterminer le pourcentage de contamination de la surface et de l'air des points contrôlés ;
- D'identifier les germes isolés ;



**DRS**



- D'évaluer l'action de divers désinfectants sur les germes identifiés ;
- De déterminer la dilution et le temps minimal d'inhibition du désinfectant efficace.



# *Revue* *Bibliographique*



DRS



## IV. Contamination de la surface et adhésion microbienne

### 1. Mécanisme de contamination de la surface

La présence de microorganismes est un phénomène impossible à éviter dans le monde vivant. Ayant le pouvoir d'adhérer et de se multiplier à divers supports inertes, ils peuvent contaminer les surfaces suite à leur dépôt ou à l'apport direct par les objets ou les mains contaminés.

La contamination de la surface se déroule en plusieurs phases : la fixation, l'adhésion et la colonisation (Figure 1).

#### 1.1. La fixation

La fixation ou l'attachement est fonction des forces d'interaction entre molécules des microorganismes et des surfaces. Provoquant l'adhésion entre les molécules différentes ou la cohésion entre molécules identiques, ces forces sont dues à :

- La liaison ionique : attraction entre les ions positifs et ceux négatifs ;
- La liaison covalente : liaison entre atomes partageant leurs électrons ;
- La liaison métallique : formant un réseau cristallin où les électrons se déplacent librement ;
- La liaison entre dipôles ;
- La liaison hydrogène ;
- La liaison faible par partage d'électrons ;
- La liaison entre dipôle et dipôle induit ;
- La liaison de dispersion de London, entre molécules apolaires, dues aux variations instantanées de configuration des électrons (**HARTEMANN et al, 1997**).

#### 1.2. L'adhésion

Elle dépend des forces ayant permis la fixation, cumulés à des facteurs biologiques. En effet, elle n'a lieu que si la distance microorganisme-surface devient suffisamment petite suite aux phénomènes suivants : sédimentation, mouvement brownien, mouvements flagellaires, mouvements chimiotropes, effet hydrophobe, dessiccation, etc.

L'adhésion peut être soit passive et on parle de collage, soit active et on parle d'accrochage.

L'adhérence de micro-organismes aux surfaces est fonction de différents paramètres physicochimiques du milieu (pH du milieu, rugosité de la surface, charge électrique des organismes, etc.) (**MASSICOTE, 2009**).

En outre, certains microorganismes adhèrent plus que les autres en raison de plusieurs raisons notamment la présence d'une capsule et la synthèse d'exopolysaccharides de type « slime » (**HARTEMANN et al, 1997**).

#### 1.3. La colonisation

La colonisation est fonction de l'aptitude des germes à se développer ou à survivre. Elle est aggravée par la présence de molécules organiques car la surface devient une surface-substrat pour le développement des micro-organismes. Elle dépend des conditions écologiques locales (humidité, température, nature de surface, présence de substances protectrices ou

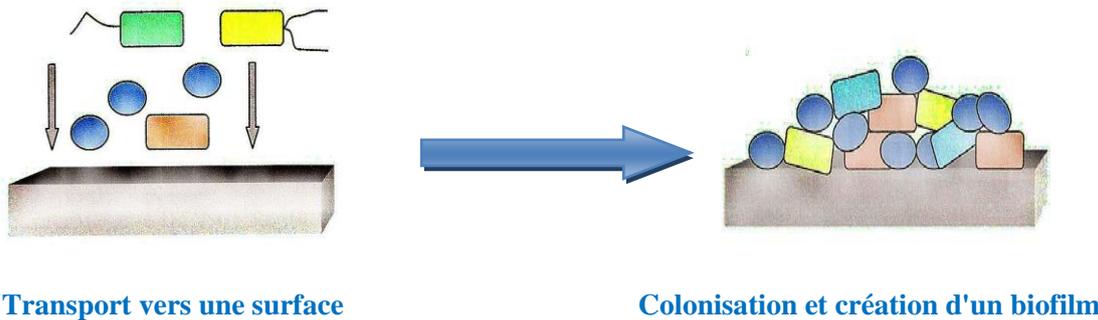


DRS



inhibitrices...) et des caractéristiques métaboliques des microorganismes pouvant agir en synergie. (HARTEMANN et al, 1997).

Lorsque les conditions sont réunies (température, humidité), les bactéries se développent en micro-colonies ou par plaques et forment progressivement un biofilm ; structure multicouche de bactéries enrobées dans un magma de substances polymériques extracellulaires. Celui-ci est composé de cellules bactériennes vivantes, de cadavres bactériens et de diverses espèces microbiennes recrutées en superficie (SQUINAZI, 2006).



**Figure 1** : Schématisation de la contamination de la surface (MASSICOTTE, 2009)

## 2. Mesurage de la contamination de surface

La réalisation des contrôles d'environnement (air, eaux, surfaces) fait partie de la politique de lutte contre les infections nosocomiales. Ce sont des indicateurs qui s'intègrent dans un plan d'action qualité visant à la gestion du risque infectieux (LE GUYADER, 1999).

Le contrôle de la contamination microbiologique des surfaces doit être réalisée lors d'une enquête épidémiologique, ou en cas de validation d'un protocole de nettoyage et de désinfection, ou en cas de contrôle de l'efficacité du bionettoyage (et désinfection). Permettant de quantifier voire de qualifier la flore microbienne pour une surface donnée, ce contrôle s'effectue en récupérant les micro-organismes viables, à l'aide de dispositifs de prélèvement, par contact direct ou indirect, ou par dépôt sur une boîte par sédimentation gravitationnelle. Il s'exprime en unités formant colonies par surface échantillonnée. (ARECLIN, 1999).

### 2.1. Recherche des bactéries

Dans ce cas, 2 méthodes de prélèvement sont principalement utilisées. Il s'agit de :

#### a- Méthode par empreinte

Elle concerne les surfaces planes ou des surfaces non planes avec un support de gélose flexible. Des boîtes de contact présentant un ménisque gélosé, ou tout autre dispositif permettant à un milieu gélosé contenu dans un récipient souple ou rigide d'entrer en contact avec la surface à échantillonner, sont utilisés sur des surfaces lisses et plates. Ces dispositifs permettent d'obtenir, après incubation de milieux de culture appropriés, un dénombrement et une identification de la flore microbienne détachable et revivifiable.



Pour le prélèvement de surfaces horizontales à l'aide de boîtes de contact, une standardisation est apportée grâce à l'application d'une pression constante et uniforme d'une masse de 25 g/cm<sup>2</sup> pendant 10 s sur une surface gélosée de 20 cm<sup>2</sup>. Deux techniques peuvent être utilisées pour obtenir ces conditions et consistent à utiliser soit un poids de 500 g, soit un applicateur (**LE GUYADER, 1999**).

#### **b- Méthode par écouvillonnage**

Cette technique est généralement utilisée pour la recherche d'un germe très spécifique sur une surface plane ou recherche de germes dans une zone difficilement accessible et non plane (tuyaux, recoins, joints ...).

Elle est particulièrement la technique la plus commode pour le prélèvement par écouvillonnage de surfaces importantes, non-absorbantes, irrégulières et par conséquent non accessibles aux dispositifs de contact. Après le prélèvement par passages successifs et perpendiculaires sur la surface à échantillonner, le dispositif est placé dans un volume de liquide de rinçage approprié qui, après agitation, est mis en culture (**LE GUYADER, 1999**).

## **V. Contamination de l'air**

Elle dépend de trois conditions essentielles (présence de sources de contamination, amplification et dissémination microbienne) qui conduisent à une contamination soit permanente, soit le plus souvent transitoire de l'air ambiant, ou flore microbienne de l'air (**SQUINAZI, 2006**).

### **1. Sources de contamination**

Les réservoirs microbiens sont classiquement distingués en réservoirs vivants, c'est-à-dire les personnes présentes dans le local, et en réservoirs inertes. Dans ces milieux de l'environnement, on retrouve les micro-organismes saprophytes, bactéries et champignons microscopiques, qui sont très résistants dans le milieu extérieur, et certains germes pathogènes ou commensaux d'origine humaine qui survivent bien en dehors de leur organisme-hôte.

Les milieux secs comme les poussières et les supports inertes agglomèrent ou fixent les micro-organismes. Ceux-ci sont composés de bactéries à Gram positif (*Bacillus sp*, Staphylocoques, Entérocoques, Actinomycètes...), de bactéries à Gram négatif telles que l'*Acinetobacter sp*, de spores de bactéries anaérobies à Gram positif et de champignons microscopiques.

Les milieux humides favorisent la survie des microorganismes, notamment de bactéries à Gram négatif comme les entérobactéries ou les *Pseudomonas* et d'espèces apparentées comme les Légionnelles, les mycobactéries atypiques, les champignons microscopiques, les virus tels que les entérovirus ou le virus de l'hépatite A (**MASSICOTTE, 2009**).

### **2. Mesurage de la contamination de l'air**

Pour le contrôle de l'air, deux types de contrôles sont à envisager : des contrôles microbiologiques et des contrôles particuliers.



DRS



## 2.1. Contrôles microbiologiques (Aérobiocontamination)

La contamination peut être estimée selon 2 paramètres : classe bactériologique (reflétant « l'entrée » des bactéries) et la cinétique de décontamination (reflétant « l'épuration » des bactéries).

Ces contrôles sont réalisés dans 4 situations :

- Contrôle et suivi de maintenance des secteurs protégés,
- Dans un programme d'assurance qualité en contrôle de routine,
- En cas d'épidémie (recherche spécifique),
- Lors de travaux au voisinage ou dans un secteur protégé (**CCLIN ; Sud-ouest, 1998**).

### ❖ Technique de prélèvement

Les particules viables en suspension dans l'air sont aspirées, sous un volume connu et selon un débit connu, et sont soit recueillies dans un liquide, soit impactées directement sur un milieu de prélèvement ou filtrées à l'aide d'une membrane filtrante spécifique qui seront ensuite analysés au laboratoire par un dénombrement et une identification des colonies microbiennes développées sur le milieu de culture. Les résultats s'expriment en unités formant colonies par mètre-cube d'air prélevé.

Pour les dispositifs de prélèvement par impact sur gélose, on distingue les impacteurs à cribles, à un ou plusieurs étages, les impacteurs à fentes ou les impacteurs par centrifugation. Le choix d'un dispositif d'échantillonnage de l'air dépend du type de particules viables à mesurer, de la sensibilité des micro-organismes, du niveau de contamination attendu, de la capacité de détecter d'éventuels faibles niveaux de contamination, des conditions d'environnement, de la précision et de l'efficacité du prélèvement. D'autres facteurs seront pris en compte : absence de perturbation d'un flux d'air unidirectionnel, facilité de nettoyage et de désinfection, absence de contamination supplémentaire (**CCLIN ; Sud-ouest, 1998**).

Les différents principes de fonctionnement des appareils ne permettent pas de comparer les résultats d'un appareil à l'autre. Il convient donc d'effectuer les prélèvements avec toujours le même appareil qui a été validé par l'utilisateur.

Les résultats obtenus ne permettent pas de donner la contamination microbiologique exacte de l'air. Ils ne donnent que des éléments d'appréciation qualitatifs et/ou quantitatifs sur les microorganismes les plus résistants dans le milieu extérieur, qui sont en suspension dans l'air au moment du prélèvement, et qui sont viables, « non stressés » et revivifiable sur les milieux de culture choisis (**MASSICOTTE, 2009**).

## 2.2. Contrôles particuliers

Les particules sont les véhicules habituels des micro-organismes.

La classe d'empoussièrement évalue « l'entrée des particules » dans l'enceinte : nombre maximal de particules supérieures à une dimension donnée par mètre cube (ou pied cube). Ce nombre va varier selon le niveau d'exigence, donc selon la zone concernée.



La classe cinétique de décontamination évalue la « rapidité d'élimination des particules » par les systèmes d'extraction : temps mis pour réduire de 90% la contamination particulaire (CCLIN ; Sud-Ouest, 1998).

#### ❖ **Technique de prélèvement**

La méthode la plus simple utilise un compteur de particules, dont le principe est le suivant: toute particule, passant dans un faisceau lumineux, vient perturber la transmission de celui-ci. En pratique, on utilise un faisceau laser, et on mesure le nombre de déviations, lorsqu'un certain volume d'air passe dans ce faisceau. L'amplitude de chaque déviation est proportionnelle à la taille de la particule. Il est donc possible de compter le nombre de particules dont la taille est supérieure à une valeur de référence.

Le seuil le plus bas que permet cette méthode est de 0,3 micron. La taille des micro-organismes étant supérieure à ce seuil, on est assuré qu'ils seront dénombrés par cette méthode. La mesure est locale, et nécessite quelques minutes. Elle peut être effectuée très simplement et enregistrée, même au voisinage d'un champ opératoire (CCLIN ; Sud-Ouest, 1998).

## **VI. La désinfection**

### **1. Généralités**

#### **1.1. La désinfection**

Selon l'AFNOR(1975) : « la désinfection est une opération au résultat momentané permettant d'éliminer ou de tuer les microorganismes et/ou d'inactiver les virus indésirables portés sur des milieux inertes contaminés, en fonction des objectifs fixés. Le résultat de cette opération est limité aux microorganismes présents au moment de l'opération.

#### **1.2. Les désinfectants**

Ce sont des produits chimiques utilisés pour la désinfection ou la décontamination dans des conditions définies.

Les désinfectants modernes allient, dans une composition complexe, produits chimiques, savons, détergents et autres substances destinées à favoriser la pénétration des ingrédients actifs (KAHRS, 1995).

### **2. Classes, avantages et inconvénients des désinfectants**

Les désinfectants peuvent être groupés en différentes classifications. Ce classement est essentiellement basé sur le principe actif dominant. En outre, des combinaisons des atomes actifs peuvent avoir lieu. Ainsi, plusieurs substances peuvent contenir à la fois du chlore et de l'oxygène ; alors que dans certains cas, on assiste à la dominance d'un principe actif (l'oxygène, le chlore,...).

L'identification du principe actif dominant se fait par la lecture du nom chimique, figurant sur la fiche technique ou signalétique du produit ou sur l'étiquette, et non du nom commercial qui



DRS



dans la plupart des cas, ne donne aucun indice sur le produit actif. Ainsi, à titre d'exemple, la lecture du nom commercial « Virkon<sup>MD</sup> » ne permet pas à elle seule de connaître qu'il s'agit du peroxy sulfate.

Les principales classes de désinfectants employés dans le réseau de la santé sont : les halogénés à base de chlore, les aldéhydes, les alcools, les oxydants, les phénols et les ammoniums quaternaires (MASSICOTTE, 2009)

### 2.1. Halogénés à base de chlore

Le chlore est un gaz qu'on ne peut utiliser comme tel pour former des désinfectants. Cependant, les chimistes ont trouvé le moyen de le mettre en solution en le faisant réagir avec des produits caustiques. Cette réaction donne la formation d'hypochlorite de sodium communément appelée eau de Javel. Ce type de désinfectant présente des avantages et des inconvénients.

#### a- Avantages

Les produits chlorés ne coûtent pas cher et possèdent un large spectre d'activités contre les microbes. Ils sont efficaces à basse température et, en général, ils ne laissent pas de résidus sur les surfaces.

#### b- Inconvénients

L'hypochlorite de sodium se dégrade rapidement, surtout à la chaleur ou à la lumière. Il peut produire des odeurs irritantes pour le personnel et pour plusieurs patients. Le gaz dégagé ; le chlore gazeux, peut causer une irritation des voies respiratoires, des crises d'asthme, de l'étouffement selon le degré d'exposition et la sensibilité de la personne exposée. En plus de contenir de l'hypochlorite de sodium, l'eau de Javel contient de l'hydroxyde de sodium qui retarde l'évaporation du chlore gazeux au cours de son entreposage.

Le chlore réagit avec les matières organiques (sang, salive, etc.), ce qui en réduit le pouvoir bactéricide. Il faut donc utiliser l'hypochlorite sur des surfaces exemptes de souillures. L'effet bactéricide du produit est également influencé par le pH, la concentration, la température, la présence d'ammoniaque et l'addition d'autres halogènes.

Un autre inconvénient de l'hypochlorite de sodium est l'absence d'un effet résiduel. Le produit n'ayant pas d'effet de rémanence, la surface désinfectée peut être contaminée quelques secondes plus tard.

### 2.2. Aldéhydes

Les principaux désinfectants qui font partie de cette catégorie sont : le formaldéhyde, le glutaraldéhyde et l'aldéhyde succinique.

#### a- avantages

Ces produits sont bactéricides à des concentrations élevées sur les bactéries Gram-. On leur attribue également des qualités de fongicide, de virucide, de mycobactéricide et de sporicide. Il est à noter que l'on utilise principalement le glutaraldéhyde pour la désinfection de certains équipements tels que les endoscopes.



### **b- Inconvénients**

Le principal inconvénient associé à ces produits est la production de vapeurs irritantes pour les voies respiratoires ainsi que les risques de développer un cancer. En outre, ils sont instables en solution alcaline et n'ont pas de pouvoir de détergence, ils ne sont pas efficaces sur des surfaces souillées et détériorent les surfaces de plastique.

## **2.3. Alcools**

Parmi les différents types d'alcools les plus utilisés, on trouve les molécules d'éthanol (alcool éthylique) et d'isopropanol (alcool isopropylique appelé alcool à friction).

### **a- Avantages**

Les alcools sont actifs sur les bactéries Gram+ et Gram- et agissent rapidement (environ 30 secondes). L'alcool est surtout utilisé en association avec d'autres substances, comme les dérivés du phénol, ce qui permet d'en améliorer les capacités bactéricides.

### **b- Inconvénients**

L'alcool est inefficace contre les spores, peu efficace sur les virus et s'évapore rapidement. Il est inactivé par les matières organiques et a tendance à faire coller les débris organiques (salive, sang, bactéries) sur les surfaces. Il ne possède pas d'effet de rémanence.

Du point de vue sanitaire et sécuritaire des travailleurs, il possède un haut indice d'inflammabilité. Le contact répété ou prolongé assèche et dégraisse la peau, ce qui peut être la cause de gerçures.

## **2.4. Oxydants**

Les produits oxydants à base d'oxygène possèdent des atomes qui travaillent généralement par paires. On parle alors de peroxyde, d'acide peracétique, peroxyphthalate ou perglutarique et de peroxymonosulfate. Plus il comprend un nombre élevé de paires d'atomes d'oxygène, plus le produit est puissant et fortement chargé négativement (-).

### **a- Avantages**

Les produits à base de peroxyde d'hydrogène réagissent très rapidement avec la matière (de quelques secondes à quelques minutes, au plus) et endommagent peu les surfaces inanimées sauf les surfaces composées de fer qui sont facilement oxydables. En général, ils ne génèrent pas de résidus ou de gaz toxiques, sauf s'ils sont mélangés avec d'autres produits comme l'acide acétique (vinaigre) tels certains produits appelés acides peroxyacétiques.

Tout comme le chlore, le peroxyde d'hydrogène présente l'inconvénient de n'avoir aucun effet résiduel.

### **b- Inconvénients**

Malgré le potentiel très intéressant de ces produits, divers facteurs peuvent affecter leur efficacité, tels que : le pH, la température, la concentration en peroxyde et le temps de contact. La molécule de peroxyde d'hydrogène est fortement chargée électriquement. Cette caractéristique induit une mauvaise diffusion dans la membrane cellulaire. Pour obtenir une bonne diffusion, il est donc nécessaire d'y mélanger des agents tensio-actifs qui neutralisent en partie la charge et facilitent la pénétration.



Ces agents tensio-actifs coûtent souvent plus cher que le produit actif lui-même et peuvent varier selon l'usage qu'on veut faire de ce désinfectant.

## 2.5. Dérivés phénoliques

D'un point de vue chimique, un phénol se définit comme une molécule aromatique, possédant un groupe hydroxyle OH fixé sur un carbone d'un cycle benzénique.

Une molécule de phénol peut servir de base à la création de divers désinfectants dont les phénols halogénés utilisés comme agents antimicrobiens, par exemple le chlorophénol.

Les composés phénoliques entrent dans la composition de nombreux savons et de nombreux produits détergents-désinfectants pour sols, surfaces et mobilier.

### a- Avantages

Les effets des produits phénoliques sur les micro-organismes varient selon la nature des molécules qui sont associées au groupement phénol.

Les composés phénoliques possèdent une action bactéricide et fongicide. À faible concentration, ils sont bactériostatiques (0,2 %) et bactéricides à partir de 1 %. Les dérivés phénoliques dissous dans l'eau ont une excellente activité contre les mycobactéries et les virus.

### b- Inconvénients

Ces produits sont inactivés par les détergents, les matières organiques et l'eau dure. En augmentant le pH de la solution, on augmente la solubilité mais leur activité se trouve réduite. De plus, ils sont incompatibles avec le fer, l'hypochlorite et les ammoniums quaternaires. À forte concentration, les phénols sont corrosifs pour les métaux et de nombreux matériaux. Ils sont absorbés par le caoutchouc, ce qui en entraîne la dégradation progressive.

Dans l'environnement, les produits phénoliques sont difficilement biodégradables et peuvent être nocifs pour les organismes exposés. Du point de vue microbiologique, les virus lipophiles (enveloppés) sont détruits alors que les virus hydrophiles et les spores sont résistants.

## 2.6. Ammoniums quaternaires

On nomme ammoniums quaternaires les produits dont les molécules sont constituées d'un atome d'azote (N) auquel sont accrochés quatre groupes comportant entre 8 et 35 atomes de carbone. Le nom quaternaire provient du nombre de groupes (R) attachés à l'atome d'azote, soit quatre.

En raison de leur pouvoir détergent, les ammoniums quaternaires entrent dans la composition de nombreux produits détergents-désinfectants pour sols, surfaces et mobilier et en combinaison avec des détergents non ioniques et des produits pour la pré-désinfection des dispositifs médicaux.

Ils sont bactériostatiques sur les Gram - et bactéricides sur les Gram + et ont une activité variable sur les virus enveloppés, nulle sur les virus nus. Ils sont fongistatiques mais n'ont aucune action sporicide.



#### **a- Avantages**

Les ammoniums quaternaires sont leurs propres agents tensio-actifs, ils possèdent leur propre action détergente. En les combinant avec des agents non ioniques, on obtient des produits très efficaces pour le nettoyage et la désinfection en une seule étape. La plupart des ammoniums quaternaires sont peu toxiques. Leur structure moléculaire permet la création de produits neutres. Comme ce ne sont pas des agents oxydants, ils s'attaquent peu aux surfaces. Selon leur concentration, on peut obtenir un effet bactériostatique (rémanence) avec une faible concentration et un effet bactéricide avec une forte concentration. Malgré un manque d'eau, ils demeurent sur les surfaces et y exercent une activité résiduelle qui peut durer plusieurs heures. Ils sont stables dans l'eau chaude.

#### **b- Inconvénients**

Les ammoniums quaternaires d'une même classe possèdent des propriétés similaires. Il faut donc une combinaison minimale de trois ammoniums quaternaires de classes différentes pour obtenir un désinfectant capable d'avoir un large spectre. Dans la littérature, on décrit l'apparition de plusieurs épidémies nosocomiales malgré l'utilisation de produits contenant une ou deux générations. Les ammoniums quaternaires perdent considérablement leur efficacité dans l'eau fortement minéralisée, dans l'eau froide et en présence de matières organiques (exemple : l'huile). L'efficacité maximale nécessite la combinaison de 4 ou 5 ammoniums quaternaires différents. Ces combinaisons augmentent les coûts du produit. Les ammoniums quaternaires réagissent avec l'hypochlorite de sodium. Cette réaction entraîne la formation de chloramines qui sont irritantes pour les voies respiratoires. Ils diminuent également l'efficacité germicide de l'hypochlorite de sodium.

### **3. Mode d'action des désinfectants**

Le mode d'action des désinfectants varie d'une classe à l'autre. Certains entraînent une dénaturation des protéines cytoplasmiques et membranaires et une inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines alors que d'autres agissent en altérant la paroi cellulaire et en inhibant la synthèse des acides nucléiques et des protéines,.... Le tableau suivant résume le mode d'action des différentes classes de désinfectants.



DRS



**Tableau 1** : Modes d'action des désinfectants (CAPP-INFO, N°46, 2007).

Classe	Exemple	Cible et mode d'action
<b>Alcools</b>	Ethanol, isopropanol	Dénaturation des protéines cytoplasmiques et membranaires, inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines
<b>Aldéhydes</b>	Formaldéhyde	Altération de la paroi cellulaire, inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines
<b>Ammoniums quaternaires</b>	Benzalkonium	Liaison aux acides gras et groupes phosphates de la membrane cellulaire fuite de constituants cellulaires et lyse de la cellule
<b>Halogénés chlorés et iodés</b>	Hypochlorite de sodium (Javel, Dakin) PVP-iodé	Destruction des protéines membranaires et Chromosomiques (halogénéation)
<b>oxydants</b>	Peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée)	Production de radicaux libres qui interagissent avec les lipides, protéines et ADN

#### 4. Spectre d'activité des désinfectants

La plupart des produits ont une activité satisfaisante sur les bactéries et les virus enveloppés (*ex. VIH, hépatites B et C, herpes, grippe*). Par contre, l'activité sur les virus nus (*ex. poliovirus, hépatite A et E, papillomavirus*), les mycobactéries (*tuberculose*), les moisissures ou les spores varie d'un produit à l'autre. Le choix du produit dépendra du type de désinfection envisagée et de l'objectif à atteindre (CAPP-INFO, N°46, 2007).

Le spectre d'activité des différentes classes de désinfectants est présenté dans le tableau suivant.

**Tableau 2** : Spectre d'activité des désinfectants (CAPP-INFO, N°46, 2007).

familles	Spectre d'activité							
	Gram+	Gram -	Mycobactéries	Levures	Moisissures	Virus nus	Virus enveloppés	Spores
<b>Alcools</b>	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+	-
<b>Aldéhydes</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Ammoniums quaternaires</b>	+	+/-	-	+	+	+/-	+	-
<b>Halogénés chlorés et iodés</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Oxydants</b>	+	+	+	+	+	+	+	+

+ Produits actifs

+/- produits inconstamment actifs

- produits inactifs



DRS



## 5. Facteurs favorisant l'activité d'un désinfectant

En matière de désinfection, l'élément le plus important est le nettoyage préalable.

L'activité de certains désinfectants dépend également des micro-organismes visés, de leurs conditions de multiplication et de leur résistance au milieu environnant et aux produits chimiques. Il faut également prendre en considération d'autres facteurs, tels que la concentration du désinfectant, le temps de contact avec les surfaces traitées, la température ambiante, etc.

Le paramètre déterminant pour l'issue d'une opération de désinfection reste cependant la présence de matières organiques, car celles-ci diluent et neutralisent rapidement les produits chimiques biocides. Il faut donc procéder à un décapage vigoureux et à un curage à grande eau avant toute application de désinfectants. Ni d'importantes quantités de produits ni une application à haute pression ne sauraient remplacer un nettoyage préalable minutieux et dans les règles (KAHRS, 1995).

## 6. Résistance microbienne aux désinfectants

L'élément majeur de la résistance est la paroi de la cellule bactérienne. En effet, la majorité des désinfectants exercent leur action essentiellement au niveau de la membrane cytoplasmique et doivent donc traverser la paroi.

Chez les souches devenues résistantes, ces mécanismes de passage sont altérés. Ainsi, les mycobactéries, dont la membrane externe est très épaisse, sont plus résistantes que les bactéries à Gram négatif, elles-mêmes plus résistantes que les bactéries à Gram positif.

Il est important de signaler que le phénomène inverse intervient pour les virus enveloppés. Ainsi, les virus enveloppés (cas du VIH par exemple) sont plus sensibles que les virus nus (ex : Poliovirus) car leur enveloppe externe, riche en lipides, est facilement désorganisée par les antiseptiques et désinfectants, ce qui provoque leur inactivation (figure 2).

La résistance microbienne aux désinfectants peut être naturelle ou acquise (BILLAST et al, 2000).

### 6.1. La résistance naturelle ou intrinsèque

La résistance naturelle est un caractère inné, stable, de l'espèce ou de la souche bactérienne. Elle détermine le spectre d'activité des désinfectants.

### 6.2. La résistance acquise

La fréquence des résistances acquises aux désinfectants est nettement inférieure à la fréquence des résistances acquises aux antibiotiques.

#### ❖ Résistance acquise chromosomique

La résistance chromosomique peut être obtenue expérimentalement en faisant cultiver certaines espèces bactériennes (bacilles à Gram négatif : *Serratia marcescens*, *Providencia stuartii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) en présence de concentrations



sublétales de produit (chlorhexidine, ammoniums quaternaires, peroxyde d'hydrogène, formol, polyvinylpyrrolidone iodée ou PVPI).

### ❖ Résistance acquise extra-chromosomique

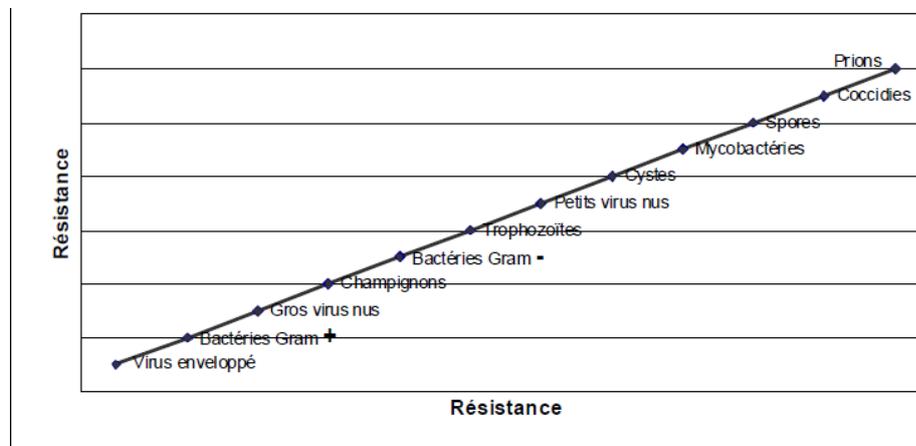
Le caractère de résistance à un ou plusieurs antibactériens est porté par un plasmide, petit fragment d'ADN indépendant du chromosome, transmissible d'une bactérie à l'autre et héréditaire.

Quelques gènes de résistance aux désinfectants sont connus :

- gène *qac* (quaternary ammonium compound) code pour la résistance aux ammoniums quaternaires. Cette résistance peut être associée à une résistance à la chlorhexidine.
- gène *mer*, code pour la résistance aux dérivés mercuriels. Il s'agit d'une résistance très fréquente.

Dans la pratique, le problème se pose lorsque les bactéries sont résistantes à des concentrations proches ou supérieures de la concentration d'emploi. Une diminution de la concentration du produit peut entraîner l'émergence d'une résistance des bactéries. Les circonstances de réduction de l'activité des antiseptiques et désinfectants sont nombreuses : matières organiques, substances interférentes, vieillissement du produit...

Il est donc essentiel de respecter scrupuleusement les conditions d'utilisation des produits (concentrations et mode d'emploi) afin d'éviter l'émergence de souches résistantes.



**Figure 2** : Susceptibilité microbienne aux biocides (MASSICOTTE, 2009)

## 7. Evaluation de l'action antimicrobienne des désinfectants

Plusieurs méthodes ont été mises en œuvre pour vérifier l'efficacité antibactérienne des désinfectants. Les plus utilisées sont : la technique en microméthode et la technique en macrométhode.

### 7.1. Technique en microméthode

La technique en microméthode repose sur l'utilisation de microplaques stériles de 96 puits à fond plat. La croissance bactérienne est détectée grâce à un lecteur de microplaque et un spectrophotomètre (Molecular Devices® Spectromax). Le logiciel (Molecular Devices® Soft Max Pro) permet l'exploitation des données.



DRS



Chaque puits de la microplaque stérile de 96 puits à fond plat (Costar®) est inoculé par une quantité déterminée (X) de la suspension bactérienne de travail et d'une même quantité (Y) d'une des dilutions du désinfectant à tester. Les puits témoins sont inoculés par la quantité X de la suspension bactérienne de travail pour le test de fertilité ou de bouillon BHI stérile pour le test de stérilité, et de Y d'eau distillée stérile.

Pour chaque souche étudiée, trois puits tests et un puits témoin de fertilité sont utilisés. Une microplaque permet de tester 23 souches en une seule analyse.

La microplaque est recouverte d'un film étirable plastique puis disposée dans le lecteur programmé. Le schéma de plaque est établi et la lecture de l'absorbance à 490 nm est programmée pour chaque puits toutes les cinq minutes pendant 18 heures, après agitation de la plaque thermostatée à 37 °C. Le lecteur restitue une représentation graphique de l'absorbance en fonction du temps : toute augmentation progressive des valeurs au cours du temps et pour un même puits est interprété comme une croissance bactérienne. À l'inverse, une densité optique stable et nulle sera considérée comme une absence de croissance bactérienne due à l'effet au moins bactériostatique du détergent ((**ROUILLON et al,2006**) ; (**SCHMITT et al, 2009**)).

## 7.2. Technique en macrométhode : méthode de référence

Elle repose sur l'utilisation de tubes à hémolyses stériles dans lesquels est mise la suspension bactérienne (préalablement préparé par ensemencement d'un bouillon BHI et incubation à 37°C pendant 3h) à laquelle différentes concentrations de désinfectant sont rajoutées. Les tubes sont agités et incubés à 37 °C pendant 18 heures. L'absence de trouble du milieu de culture dans un des tubes permet de déterminer la dilution du désinfectant suffisante pour empêcher le développement de la souche étudiée (dilution cible)(**ROUILLON et al, 2006**).

## 8. Désinfection des surfaces

Elle procède à la fois de l'entretien, de la maintenance et de la réduction du risque infectieux. Elle fait appel au nettoyage couplé à une opération de désinfection. Cela conduit à utiliser le terme de « bionettoyage » (**THIEBAUD et al, 2005**).

### 8.1. Objectifs

Le bionettoyage est défini comme un traitement qui réunit le nettoyage, l'évacuation des salissures et des produits utilisés avec application finale d'un désinfectant. Il est destiné à l'élimination soignée et poussée de l'ensemble des matières organiques et minérales supportées par les objets, instruments et surfaces. Le bionettoyage allie l'action mécanique et chimique avec une solution à température adaptée, en respectant le temps de contact du désinfectant. Il répond ainsi à la recherche de la propreté physique et bactériologique.

### 8.2. Produits utilisés

Pour les surfaces, les produits utilisés doivent avoir à la fois une action détergente et une action désinfectante, ces deux caractéristiques pouvant être combinées.



### a- Détergents

Le détergent est un produit de nettoyage qui présente deux objectifs, d'une part décrochage des salissures des surfaces sur lesquelles elles se trouvent installées et d'autre part, leur enlèvement du milieu. Les spécifications d'un détergent sont définies par le résultat de ses pouvoirs mouillant, dispersant, séquestrant et anti-redéposition, liés à sa tensioactivité, sa capacité à solubiliser les matières organiques et à son pH. Le choix d'un détergent repose sur l'appréciation de ces différents paramètres, et à leur compatibilité avec l'agent désinfectant qui sera utilisé par la suite.

Toute application d'un produit détergent seul nécessite un rinçage.

### b- Détergents désinfectants

Ces produits permettent de réduire le temps des opérations à une seule et même étape, éliminant ainsi le rinçage intermédiaire et la double application du produit. Ces produits « agents doubles » relèvent, comme les désinfectants, de la classe des produits « biocides ». Ils doivent répondre aux spécifications des normes adéquates de chaque objectif. Leur formulation fait appel à l'association du principe actif détergent et du principe actif désinfectant, auxquels des adjuvants sont ajoutés. Ces derniers ont divers rôles ; ils permettent la compatibilité ou la solubilité, parfument, augmentent la consistance de la solution, stabilisent le produit final et assurent un effet protecteur.

Le choix d'un produit détergent désinfectant sera orienté, au-delà de ses compétences microbiologiques, en fonction d'une évaluation en cours d'utilisation sur le terrain. Des critères prenant en compte, aisance d'emploi, présentation (sachet dose, pompe doseuse etc.), solubilité, odeur, causticité et risque de contact cutané, peuvent être proposés.

## 9. Désinfection de l'air

L'air du laboratoire présente un réservoir actif à de nombreux microorganismes susceptibles de sédimenter et fausser les résultats des analyses microbiologiques effectuées. Pour cette raison, une désinfection de l'air est nécessaire, cela est réalisé par évaporation d'un produit désinfectant ou antimicrobien volatil.

Parmi les différents principes actifs cités par **DRUILLES et al (1985)**, pour désinfecter l'air, on peut citer les huiles essentielles. Ces extraits de végétaux odorants, sont définis selon la norme française **NF T 75-006 (AFNOR, 1980)**, comme étant « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation sèche ». Ils ont fait l'objet de nombreuses recherches scientifiques dans le domaine médical. Leur efficacité pour le traitement de nombreuses pathologies ainsi qu'à la désinfection de l'environnement, a été démontré dans des études antérieures (**PIBIRI, 2005**). Notons à titre d'exemple:

- Le travail de thèse, réalisé en France, intitulé : « Activité antifongique de l'huile essentielle de *Cymbopogon nardus* sur l'*Aspergillus Niger* », dans lequel une évaluation d'un bioréacteur pour l'étude de l'effet inhibiteur des substances volatiles en phase vapeur, a été



**DRS**



effectuée. Il a montré la preuve irréfutable de l'action des huiles essentielles en phase gazeuse sur *Aspergillus Niger*.

- L'étude déroulée au Japon, sur l'activité des HE en phase gazeuse, et ayant utilisé un dispositif expérimental permettant d'effectuer des prélèvements dans des boîtes test étanches de 1,3 litres afin de déterminer les concentrations en huiles essentielles. Selon les résultats, les valeurs des doses minimales inhibitrices (DMI) des huiles essentielles en phase gazeuses sont plus faibles que les concentrations minimales inhibitrices (CMI) en phase liquide. La bioactivité des huiles essentielles a été plus importante en phase gazeuse qu'en phase liquide, en particulier sur les champignons filamenteux et sur les bactéries à Gram négatif.



DRS



# *Partie expérimentale*



### **1- Type d'étude**

Il s'agit d'une étude prospective réalisée sur une durée de 45 jours allant du 15 avril au 31 mai 2014.

### **2- Lieu d'étude**

Les prélèvements ont été réalisés et analysés au laboratoire régional de diagnostic épidémiologique et d'hygiène du milieu de Fès (LRDEHM).

### **3- Points de prélèvements**

Les prélèvements réalisés au LRDEHM ont concerné aussi bien la surface que l'air des locaux, des étuves et des réfrigérateurs de l'unité d'hygiène alimentaire. Ils ont été effectués avant la désinfection. Le nombre de prélèvements accomplis était de 28.

### **4- Prélèvements de surface et de l'air**

#### **A- Prélèvement de surface**

Les prélèvements de surface ont été faits par la technique d'écouvillonnage qui consiste à frotter chaque point de prélèvement avec un écouvillon stérile préalablement humidifié dans le sérum physiologique contenu dans son étui, en effectuant des stries parallèles rapprochées, et en le faisant tourner légèrement dans le même point en stries perpendiculaires aux premières et sur une surface donnée à l'aide du quadrillage de 25 cm<sup>2</sup> préalablement stérilisé (voir annexe 1).

#### **B- Prélèvement d'air**

La technique de prélèvement consiste à exposer une boîte de Pétri contenant le milieu PCA dans une surface de 1 m<sup>2</sup>, à enlever le couvercle, et à laisser la boîte ouverte à l'air ambiant pendant 16 minutes (Voir annexe 2).

### **5- Analyse bactériologique et identification**

N.B : La composition, la préparation, et les contrôles qualités des milieux de culture sont décrits en annexe (annexe 3).

#### **A- Culture**

##### **A-1- Culture des prélèvements de surface**

L'analyse des prélèvements de surface est pratiquée immédiatement après prélèvement, selon la méthode appliquée par le laboratoire et mentionnée dans la procédure « Contrôle de la qualité de l'environnement du secteur de la bactériologie ».

Chaque écouvillon a été ensemencé après agitation au vortex, par épuisement sur milieu MCT, puis incubé respectivement à 37±1°C pendant 48 h.

##### **A-2- Culture des prélèvements d'air**

Les boîtes de PCA préalablement ouvertes et exposées ont été incubées à 37±1°C pendant 48 h.



DRS



## B- Purification et identification des cultures obtenues sur gélose MCT et sur milieu PCA

### B-1- Purification

Après 48 h d'incubation, l'aspect, la taille, la forme, la couleur et le nombre des colonies ont été notées, ensuite une purification de chaque type de colonie a été réalisée par ensemencement par épuisement sur milieu PCA.

### B-2- Identification microbiologique

#### ➤ Coloration de Gram

##### ❖ Principe

C'est la coloration de base en bactériologie, elle permet une classification des bactéries selon leur structure, leur forme et leur Gram.

##### ❖ Technique

A partir de la culture purifiée, on réalise un étalement sur une lame à l'aide d'une anse, puis on fixe à la chaleur, ensuite on couvre par la solution de violet de gentiane pendant 30 secondes, puis on élimine le violet de gentiane en rinçant avec de l'eau, on ajoute le Lugol, 2 fois pendant 15 secondes, et on rince avec de l'eau. Ensuite on décolore à l'alcool-acétone par un mouvement de bascule, jusqu'à ce que l'alcool acétone n'entraîne plus de violet et soit bien incolore, On lave après à l'eau courante et on recolore avec la fuchsine diluée pendant 15 secondes. Ensuite, on rince bien et on sèche, et enfin, on observe à l'huile d'immersion au fort grossissement (Voir annexe 4).

Les germes à Gram positif apparaissent violets, et ceux à Gram négatif apparaissent roses (Voir annexe 4).

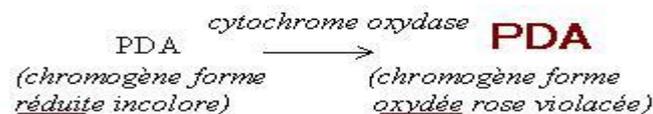
### B-3- Identification biochimique

Le schéma général de l'identification des bactéries est montré en annexe 5

#### a- Recherche de l'oxydase

##### ❖ Principe

Si une bactérie possède l'enzyme respiratoire, appelée cytochrome oxydase, alors elle peut faire la réaction suivante :



Les cytochromes sont des protéines qui appartiennent à la chaîne respiratoire, composée d'une succession de transporteurs d'électrons, en particulier les cytochromes c. En fait, ce test recherche le cytochrome c-oxydase.

La recherche de l'oxydase est un des critères le plus discriminatif et le plus employé pour l'identification des bactéries, surtout celles à Gram négatif.

Cette recherche consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée, à oxyder la forme réduite incolore de dérivés N-méthylé du paraphénylène diamine, en leurs formes oxydées semi-quinoniques rose-violacées.



#### ❖ **Technique**

A partir de la culture purifiée, un inoculum bactérien est déposé sur un disque d'oxydase à l'aide d'une pipette pasteur.

#### ❖ **Lecture**

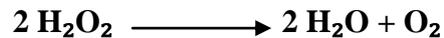
La réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration violette à l'endroit où nous avons déposé la colonie, soit immédiatement, soit quelques secondes après (Voir annexe 5).

### **b- Test de la catalase**

#### ❖ **Principe**

Certaines réactions métaboliques aboutissent, dans les conditions de l'aérobiose, à la production de peroxyde d'hydrogène (= eau oxygénée ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Mais ce composé peut être le produit de la chaîne respiratoire. Cependant, ce peroxyde d'hydrogène doit être éliminé. C'est en effet un poison cellulaire. Sa décomposition dans l'organisme microbien peut être réalisée soit par des peroxydases, soit par la catalase (la peroxydase ayant toutefois une activité plus faible). En l'absence de système enzymatique destructeur, la vie en aérobie devient généralement impossible : les micro-organismes sont alors anaérobies strictes.

La catalase est une enzyme importante. Elle joue un rôle majeur dans l'élimination du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



La plupart des micro-organismes aérobies possèdent une catalase. Parmi les bactéries Gram positif, seules les *Streptococcaceae*, les *Lactobacillus*, les *Erysipelothrix* sont dépourvues de catalase.

Ce test a été appliqué pour les cocci Gram positif, ce qui a permis de différencier entre les *Streptococcus*, les *Micrococcus* et les *Staphylococcus*.

#### ❖ **Technique**

A partir de la culture purifiée, nous avons prélevé à l'aide d'une pipette pasteur stérile une quantité suffisante de culture, et on l'a mise en suspension dans une goutte d'eau oxygénée.

#### ❖ **Lecture**

Une réaction positive s'est traduite par un dégagement gazeux d'oxygène (Voir annexe 5)

### **c- Test ONPG (Orthonitrophényl -D-Galactopyranoside)**

#### ❖ **Principe**

Le terme ONPG hydrolase est plus propre que celui de D-galactosidase dans la mesure où il précise que le substrat utilisé est l'ONPG et non le lactose.

En effet, il existe des germes qui reconnaissent l'ONPG du côté nitro-2-phénol et non celui du D-galactoside. Ces germes ont donc une activité ONPG hydrolase sans fermenter le lactose. Le test à l'ONPG est une technique basée sur l'action directe de l'enzyme sur une molécule chromogène pouvant être l'Orthonitrophényl-D-Galactopyranoside, ou le 2-naphtol-D-galactopyranoside.

Ceux-ci sont utilisés comme substrat et libèrent respectivement l'orthonitrophénol (jaune) et le b-naphtol.



#### ❖ **Technique**

A partir d'une culture purifiée de bacille Gram négatif et oxydase négative, nous avons réalisé une suspension dans 1 ml d'eau distillée stérile, puis nous avons ajouté un disque imprégné d'ONPG.

#### ❖ **Lecture**

Une réaction positive se traduit par un virage du milieu au jaune (Voir annexe 5).

#### **d- Milieu lactose-glucose-H<sub>2</sub>S (Kligler-Hajna)**

Ce milieu est un milieu complexe, qui permet la recherche de plusieurs caractères biochimiques. Il est très utilisé dans l'identification des *Enterobacteriaceae*.

#### ❖ **Principe**

Il s'agit d'un milieu différentiel de couleur rouge qui permet de confirmer la fermentation du glucose et du lactose, la production des gaz, et aussi la réduction des composés soufrés qui se traduit par la production de H<sub>2</sub>S. Comme les milieux contiennent des sels de fer, la production de H<sub>2</sub>S est révélée par la formation du sulfure métallique de couleur noire.

#### ❖ **Technique**

A partir d'une culture purifiée de bacille Gram négatif oxydase négative, on ensemence la pente du milieu Kligler en stries serrées et parallèles, et le culot par piqûre centrale, on incube ensuite à 37±1°C pendant 18 à 24 h.

#### ❖ **Lecture**

- Si la souche fermente le lactose, la surface inclinée vire au jaune. Sinon, sa couleur reste inchangée.
- Si la souche fermente le glucose, le culot vire au jaune. Sinon, sa couleur reste inchangée.
- Si la souche produit l'H<sub>2</sub>S, il se produit un noircissement de la zone joignant le culot à la pente.
- Si la souche produit du gaz, elle se traduit par la présence de bulles de gaz au niveau du culot (Voir annexe 5)

#### **e- Test Indole**

#### ❖ **Principe**

Après addition du réactif de Kovacs, le diméthyl-amino-4-benzaldéhyde contenu dans le réactif de Kovacs réagit avec l'indole produit par l'activité de la tryptophanase, et produit un anneau rouge à la partie supérieure du milieu urée-indole préalablement ensemencé.

#### ❖ **Technique**

Ajouter une goutte de Kovacs au milieu Urée-indole préalablement ensemencé.

#### ❖ **Lecture**

Si formation d'un anneau rouge : indole positif

Si absence d'un anneau rouge : indole négatif (Voir annexe 5)



### f- Milieux de King

Les milieux King (King A et King B) permettent de différencier entre elles les différentes espèces du genre *Pseudomonas*, par la mise en évidence de la production de pigments spécifiques.

#### ❖ Principe

L'élaboration des pigments est influencée par la composition du milieu, ce qui justifie l'utilisation de deux milieux différents :

- la production de pyocyanine, due spécifiquement à *Pseudomonas aeruginosa*, est favorisée par la présence d'ions inorganiques. La recherche de la production de pyocyanine est effectuée sur milieu King A ;
- la production de pyoverdine, est favorisée par une teneur élevée en phosphate. La recherche de la production de pyoverdine est effectuée sur milieu King B.

#### ❖ Technique

A partir d'une culture purifiée de bacille Gram négatif oxydase positive, on ensemence la surface du milieu, puis on incube pendant 24 heures à 37°C, voire même de préférence à 42°C (l'incubation à 42°C permet un isolement spécifique de *P.aeruginosa*).

#### ❖ Lecture

La présence de pigments diffusibles se traduit par l'apparition d'une couleur qui peut diffuser sur toute la pente :

- couleur **bleue** sur le milieu King A (**présence de pyocyanine**) → King A positif
- couleur **jaune-vert fluorescent** sur le milieu King B (**présence de pyoverdine**) → King B positif (voir annexe 5)

### g- Milieu Chapman-mannité

Le milieu de Chapman est un milieu sélectif, utilisé surtout en microbiologie médicale, permet la croissance des germes halophiles, parmi lesquels figurent au premier rang les bactéries du genre *Staphylococcus*, mais aussi les *Micrococcus*, les *Enterococcus*, les *Bacillus*, et de rares bactéries à Gram négatif.

#### ❖ Principe

Ce milieu contient du chlorure de sodium en forte concentration (75 g/l) ce qui permet un isolement sélectif de *Staphylococcus* tolérant les fortes concentrations en NaCl. Cependant, l'identification des *Staphylococcus* a été faite par le test catalase.

Ce milieu permet aussi d'étudier la fermentation du mannitol par virage au jaune de l'indicateur coloré, le rouge de phénol, autour des colonies.

#### ❖ Technique

A partir d'une culture purifiée de cocci Gram positif oxydase négative et catalase positive, on ensemence en stries serrées la surface du milieu Chapman mannité, puis on incube à 37°C pendant 18-24 heures.

#### ❖ Lecture

Les colonies mannitol + sont entourées d'une auréole jaune.

Les colonies pigmentées en jaunes et mannitol + : forte suspicion de *S. aureus*

N.B : Ne pas confondre la pigmentation des colonies et le virage de l'indicateur coloré.



(Voir annexe 5)



## **h- Milieu DNase**

### **❖ Principe**

Le milieu gélose à l'acide désoxyribonucléique permet la recherche de l'ADN des bactéries, et particulièrement celle des *Staphylococcus aureus*.

La révélation se fait par l'acide chlorhydrique (1fois normal) qui, une fois appliqué et laissé pénétrer dans le milieu, les microorganismes positifs à la DNase, comme *Staphylococcus aureus*, sont entourés d'une zone claire d'ADN dépolymérisé, tandis que les parties du milieu plus éloignées de la bande d'ensemencement sont opaques et blanchâtres, sous l'effet de l'ADN polymérisé. Les colonies de microorganismes négatifs à la DNase ne présentent pas de zones plus claires en périphérie des colonies. Si la zone autour de la strie est claire, la souche est DNase (+) ; sinon, elle est DNase (-).

### **❖ Technique**

A partir d'une culture purifiée identifiée de *Staphylococcus*, on ensemence par épuisement le milieu Gélosé à l'acide désoxyribonucléique à l'aide d'une anse à fil droit, on incube à 37°C pendant 24 h.

### **❖ Lecture**

Si après addition de l'acide chlorhydrique, la zone autour de la strie est claire, la souche est DNase (+) (Voir annexe 5).

## **i- Test coagulase**

### **❖ Principe**

Le plasma de lapin est un milieu idéal pour la recherche de la coagulase libre de *Staphylococcus aureus*. La production de la coagulase permet de différencier les souches de *Staphylococcus aureus* des autres souches (*epidermis*,...).

Les souches de *Staphylococcus aureus* provoquent la coagulation du plasma le plus souvent au cours des 3 premières heures. Dans certains cas, la coagulation est plus légère et plus tardive, mais la réaction ne doit être considérée comme négative que si le phénomène n'intervient pas après la 24ème heure.

### **❖ Technique**

Après une étape d'enrichissement sur milieu BHI de l'inoculum de *Staphylococcus* préalablement identifié et confirmé DNase+, on prélève 0,5 ml de ce dernier, et on l'ajoute à 0,5 ml du plasma de lapin et on incube à 37±1°C pendant 24 h.

### **❖ Lecture**

Si la coagulation se produit dans les 24 h, la souche de *Staphylococcus* est coagulase positive (Annexe 5).



DRS



## 6- Evaluation de l'activité antibactérienne des désinfectants sur les souches isolées

### 6.1. Désinfectants

Nous avons évalué l'efficacité de 4 désinfectants sur les souches isolées des prélèvements de surface, et de 2 désinfectants (soit 1 désinfectant et une huile essentielle) sur les souches isolées des prélèvements de l'air.

- Les désinfectants testés sur les souches isolées des prélèvements de surface sont :
  - **D1** ; un désinfectant à base de chlorure de didécyl diméthyl-ammonium, appartient à la classe des ammoniums quaternaires.
  - **D2** ; un désinfectant dont la molécule active principale est le Chlorure de Benzalkonium., faisant partie, comme D1, de la class des ammoniums quaternaires.
  - Un désinfectant désigné **D3**, à base de chlore faisant partie de la classe des halogénés.
  - **D4** ; un désinfectant à base de Dechloroxylénol(C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>ClO).
- Les désinfectants testés sur les souches isolées des prélèvements d'air sont :
  - **L'alcool éthylique** ou éthanol qui est un produit de la classe des alcools.
  - L'huile essentielle de *Lavandula officinalis*, extraite de la lavande, composée de dérivés monoterpéniques oxygénés et des hydrocarbures monoterpéniques.

### 6.2. Méthodes

Après purification et identification des bactéries isolées, les souches bactériennes testées ont été réisolées sur gélose PCA et incubées à 37°C pendant 18 heures.

La méthode utilisée aussi bien pour l'évaluation de l'activité antibactérienne des désinfectants que pour la détermination de la dilution cible et du temps minimal d'inhibition (TMI), est la macrométhode.

#### a- Evaluation de l'activité antibactérienne des désinfectants

Une colonie de chaque souche testée est ensemencée dans 2 tubes à hémolyse stériles contenant chacun 1,8 ml de bouillon BHI et incubée à 37 °C pendant deux à trois heures pour obtenir une culture en phase exponentielle de croissance. L'un des tubes sert comme témoin de la fertilité. L'ajout de 200 µl des différents détergents testés aux différentes cultures de suspensions bactériennes, a été ensuite réalisé. L'incubation a été effectuée à 37°C pendant 18 à 24 heures. Dans les tubes témoins, le désinfectant n'a pas été rajouté.

L'absence de trouble du milieu de culture dans un des tubes permet de déterminer le désinfectant le plus efficace.

Une mesure de l'absorbance des tubes témoins et des tubes présentant un aspect clair (absence de trouble), a été effectuée au spectrophotomètre.

#### b- Détermination de la dilution cible

Après avoir préparé une suspension bactérienne par ensemencement de la souche testée dans 1,8ml de bouillon BHI et l'avoir incubé 3heures à 37°C, une dilution en cascade (de 1/2 au 1/8) du désinfectant ayant présenté une efficacité a été effectuée dans de l'eau distillée stérile. L'ajout dans chaque tube (contenant la suspension bactérienne) de 200 µl de chaque



**DRS**



concentration du désinfectant a été ensuite fait. L'incubation des tubes après homogénéisation a été enfin réalisée à 37°C pendant 18 à 24h.

L'absence de trouble du milieu de culture dans un des tubes permet de déterminer la dilution du désinfectant suffisante pour empêcher le développement de la souche étudiée ; dilution cible.

#### **c- Détermination du temps minimal d'inhibition (TMI)**

La suspension bactérienne déjà préparé dans le BHI et incubée à 37°C pendant 3h, est distribuée dans des tubes, puis on ajoute 200µl de la dilution cible du désinfectant jugé efficace, et on mesure l'absorbance à t=0.

Les tubes sont incubés à 37°C, et on mesure l'absorbance chaque 10min jusqu'au moment où le trouble disparaît et l'absorbance devient nulle.

#### **7- Outil d'analyse**

La saisie et le traitement des données ont été faits à l'aide du programme Excel.



DRS



# *Résultats*



Notre étude a comporté 2 volets, le 1<sup>er</sup> étant consacré au contrôle de l'environnement (air et surface) de l'unité d'hygiène alimentaire (UHA) du laboratoire régional de diagnostic épidémiologique et d'hygiène du milieu de Fès ; le second volet a été sacré à l'évaluation de la sensibilité des germes isolés à différents désinfectants.

## C- Contrôle de l'environnement

Le nombre total de prélèvements réalisés était de 28, ils ont concerné aussi bien le contrôle de l'air que celui de la surface des points les plus susceptibles de modifier la qualité des analyses réalisées au sein de l'UHA. Leur répartition est montrée dans le tableau suivant.

**Tableau 3:** Répartition des prélèvements réalisés

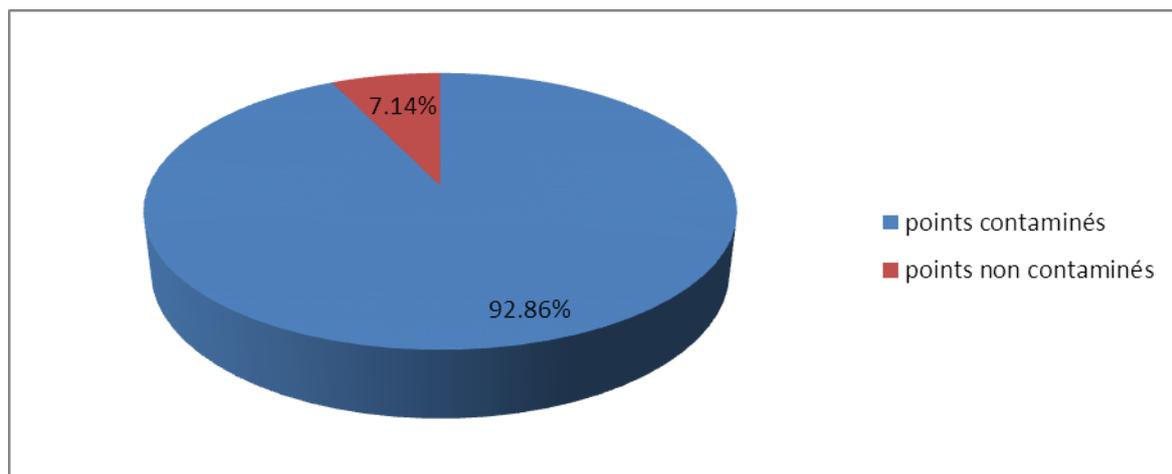
Point de prélèvement	Nombre de points prélevés	Type de prélèvement
Salles de l'unité d'hygiène alimentaire	8	Air
	8	Surface
Incubateurs	4	Air
	4	Surface
Réfrigérateurs	2	Air
	2	Surface

### 1. Contrôle de surface

Le nombre total de points prélevés des surfaces de l'UHA était de 14.

#### 1.1. Pourcentage de contamination

Sur les 14 points contrôlés, 13 ont été contaminés, soit un pourcentage de contamination de 92,86%(Figure 3)



**Figure 3 :** Pourcentage de contamination des points de prélèvements de surface.



DRS

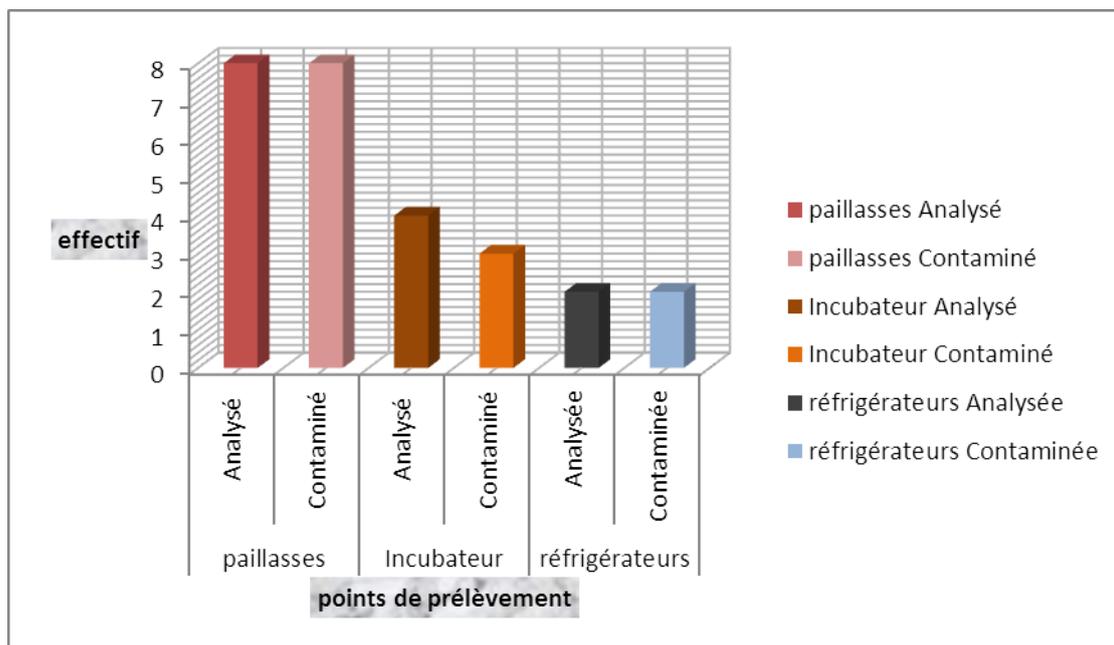


## 1.2. Distribution globale des germes isolés

L'identification des germes isolés a révélé que 100% des germes retrouvés était des bactéries.

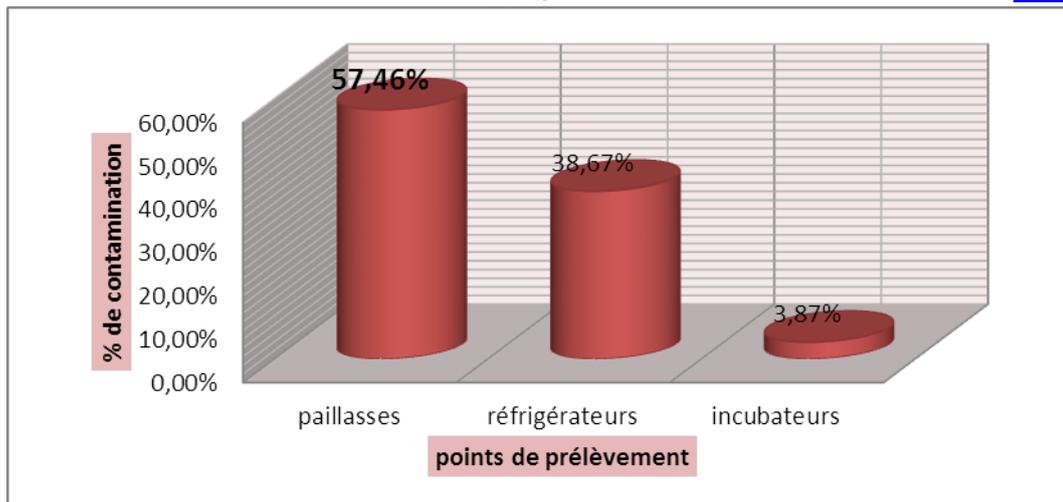
## 1.3. Répartition de la contamination des surfaces en fonction des points de prélèvement

La répartition de la contamination en fonction des points de prélèvements, présentée en figure 4, a montré que le pourcentage de contamination est de 100% aussi bien pour les paillasses que pour les réfrigérateurs et de 75% pour les incubateurs.



**Figure 4** : Répartition de la contamination des surfaces en fonction des points de prélèvement.

En outre, la comparaison du nombre de colonies trouvées au niveau des paillasses par rapport aux incubateurs et réfrigérateurs, a montré une charge bactérienne plus importante au niveau des paillasses (57,46%) contre 38,67% au niveau des réfrigérateurs et 3,87% au niveau des incubateurs.

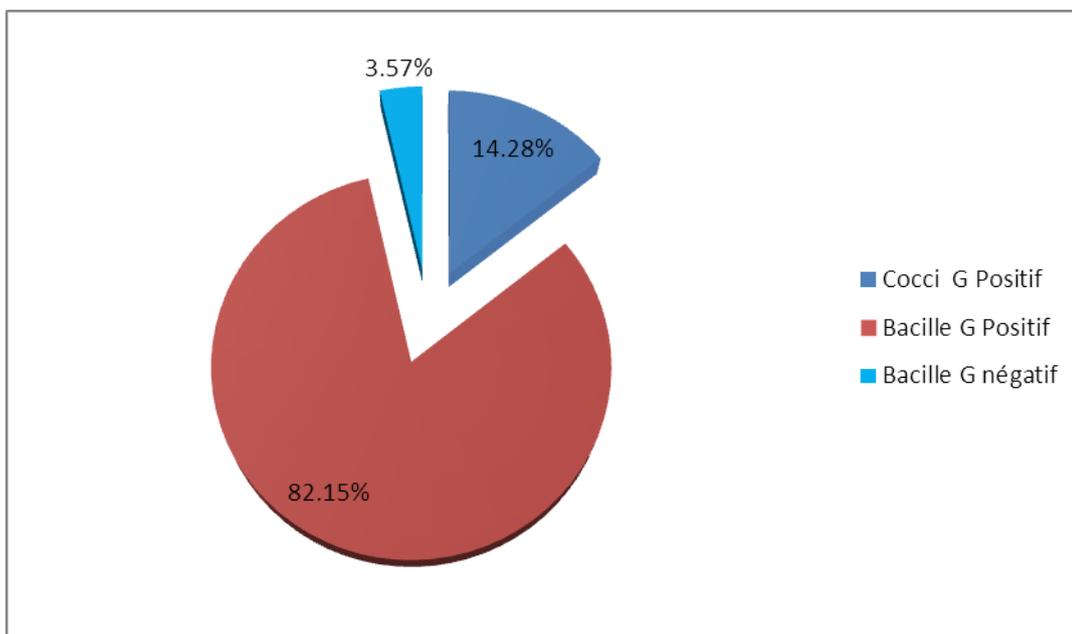


**Figure 5 :** Répartition de la contamination des points de prélèvements en fonction de la charge bactérienne.

#### 1.4. Répartition des bactéries isolées des surfaces en fonction de la forme et de la coloration de Gram

Le nombre total de bactéries isolées est de 28 bactéries. Leur répartition selon la forme, présentée en figure 6, a montré que 85,72% était des bacilles.

Leur identification par coloration de Gram, a révélé la prédominance des bactéries Gram positif (96,43%) par rapport aux bactéries Gram négatif (3,57%).

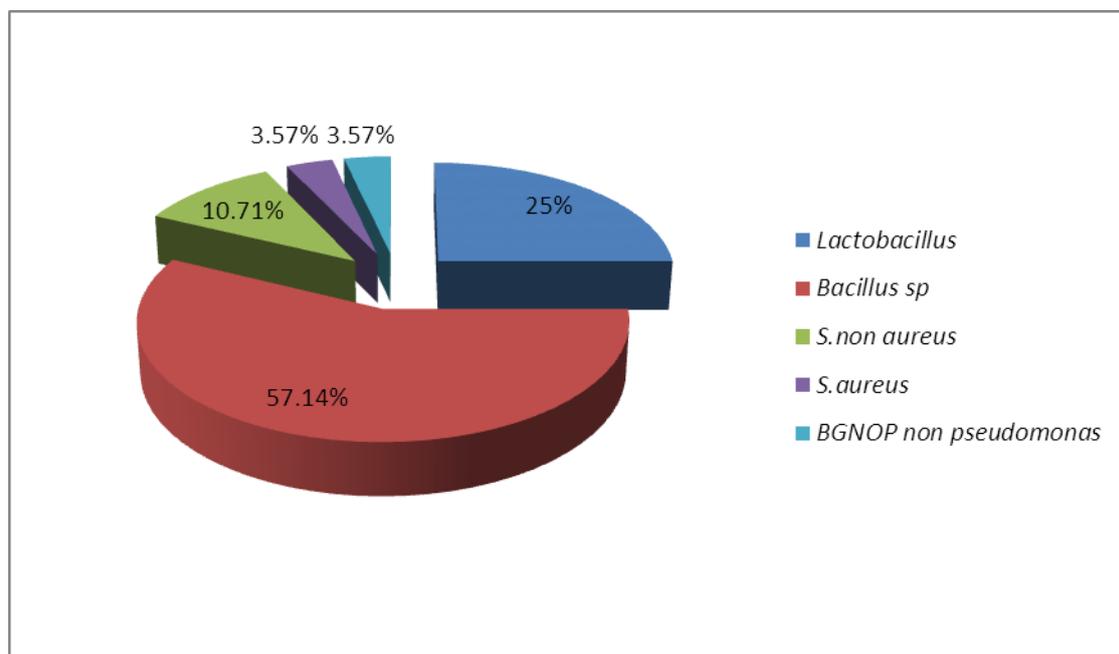


**Figure 6 :** Répartition des bactéries isolées des prélèvements de surfaces en fonction de la forme et de la coloration de Gram.



### 1.5. Identification biochimique des bactéries isolées des surfaces

L'identification biochimique des 28 bactéries isolées (figure 7), a exhibé sept *Lactobacillus* avec un pourcentage de 25%, 16 bacilles Gram positif identifiés *Bacillus sp.* soit un pourcentage de 57,14%, trois Staphylocoques coagulase négatif (10,71%), une souche de *Staphylococcus aureus* (3,57%) et une souche de bacille Gram négatif oxydase positif non *psedomonas* (3,57%).



**Figure 7 :** Distribution globale des bactéries isolées des prélèvements de surfaces

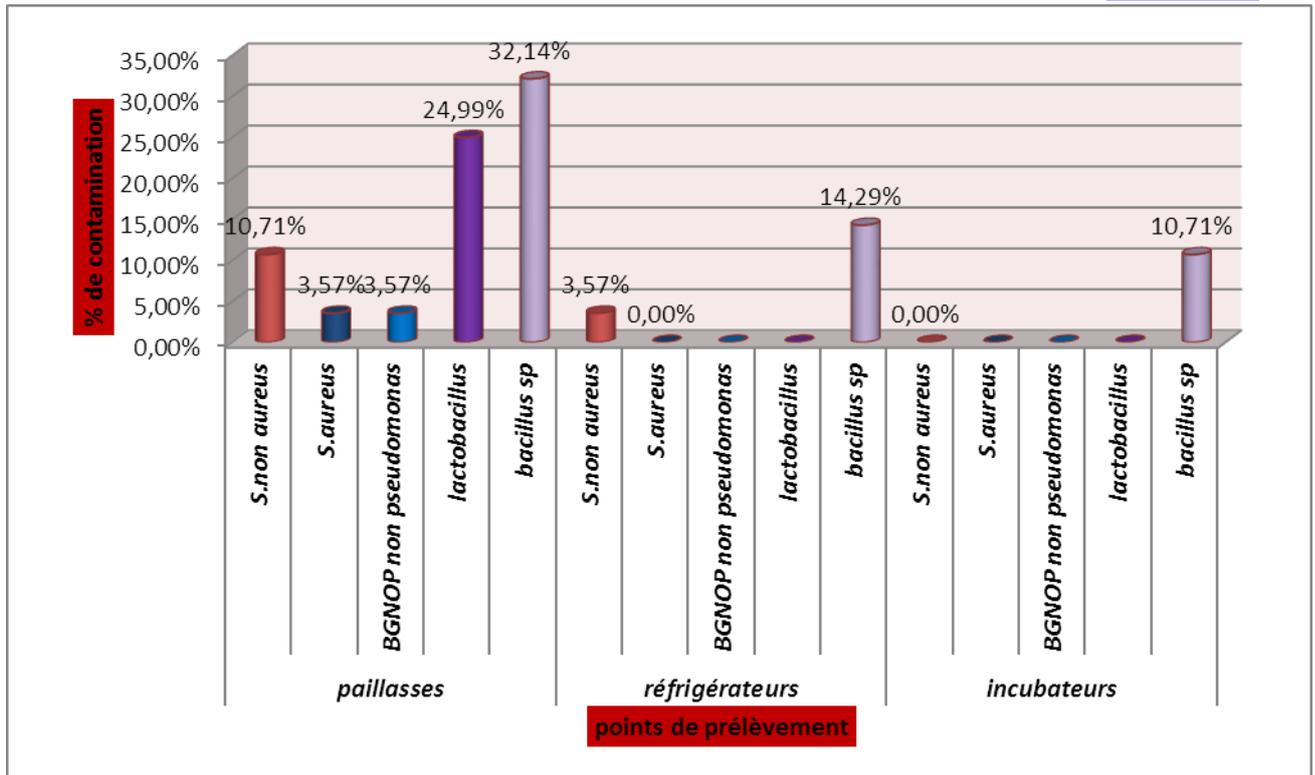
### 1.6. Distribution des bactéries isolées des surfaces par points de prélèvement

La distribution des bactéries isolées par points de prélèvement, présentée en figure 8, a révélé que les paillasses étaient les surfaces les plus contaminées par plusieurs genres de bactéries. Elles ont constitué un réservoir de *S.coagulase négative* (10,71%), de *S.aureus* (3,57%), de BGNOP non *peudomonas* (3,57%), de *Lactobacillus* (24,99%) et de *Bacillus sp.* avec une nette prédominance pour ce genre bactérien (32,14%).

Les réfrigérateurs ont été chargés par les *bacillus sp.* (14,29%) et les *S.coagulase négative* (3,57%), alors que les incubateurs n'ont été contaminés que par les *Bacillus sp.* (10,71%).



DRS



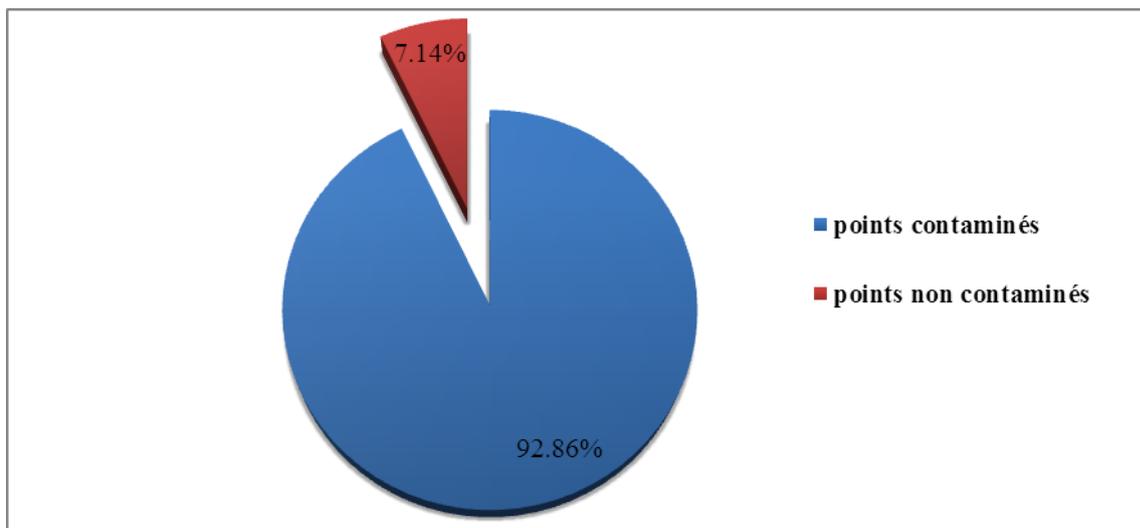
**Figure 8** :Distribution des bactéries isolées des surfaces par points de prélèvement.

## 2. Contrôle de l'air

Le contrôle microbiologique de l'air a concerné les mêmes points prélevés pour le contrôle de surfaces.

### 2.1. Pourcentage de contamination

Sur les 14 points de prélèvement d'air réalisés, nous avons noté que 13 points étaient contaminés soit un pourcentage de contamination de 92,86% (Figure 9)

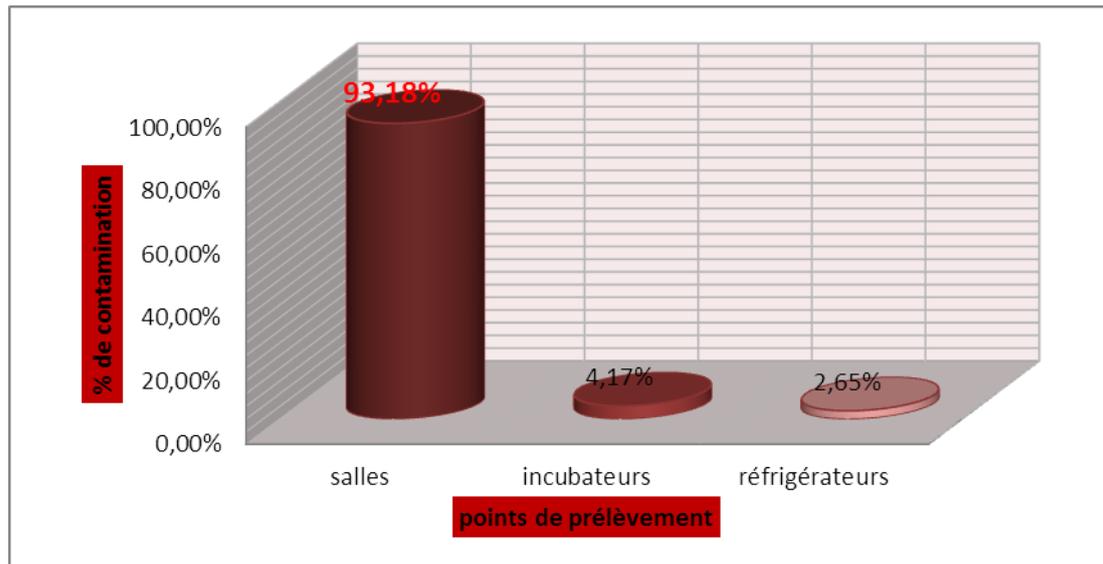


**Figure 9**: Pourcentage de contamination des points de prélèvements d'air



## 2.2. Répartition de la contamination de l'air en fonction des points de prélèvement

La répartition de la contamination en fonction des points de prélèvement a révélé la présence d'une contamination importante au niveau de l'air des salles de l'UHA (93,18%). Les incubateurs et les réfrigérateurs sont moins contaminés avec des pourcentages respectifs de 4,17% et de 2,65% (Figure 10)

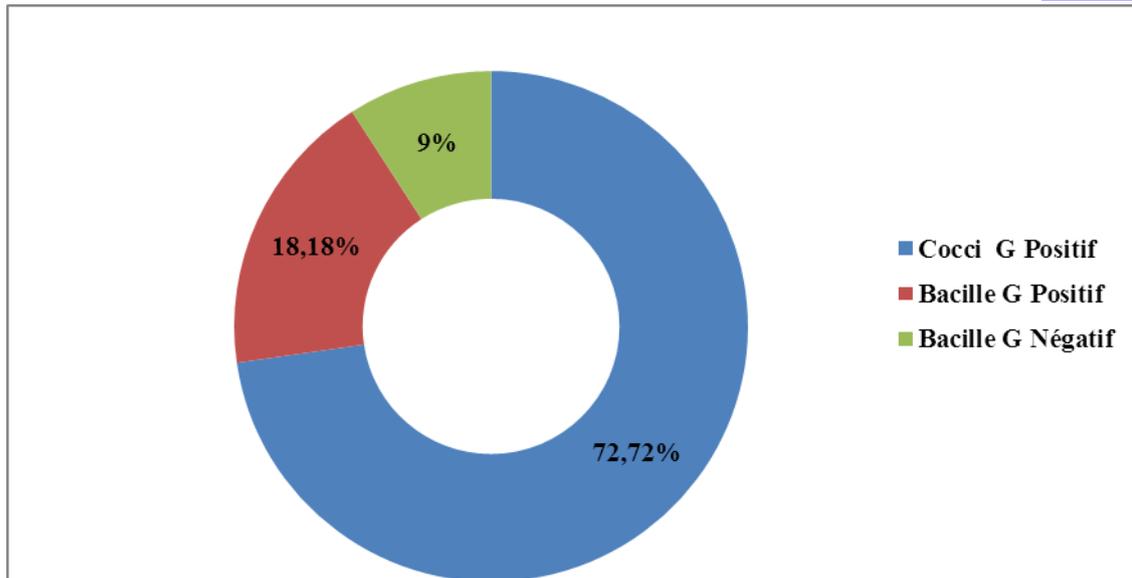


**Figure 10:** Répartition de la contamination de l'air en fonction des points de prélèvement.

## 2.3. Répartition des bactéries isolées des prélèvements d'air en fonction de la forme et de la coloration de Gram

La répartition des 22 bactéries isolées à partir de l'air des différents points contrôlés au niveau du laboratoire, présentée en figure 11, a montré la prédominance des cocci (72,72%) par rapport aux bacilles (27,28%).

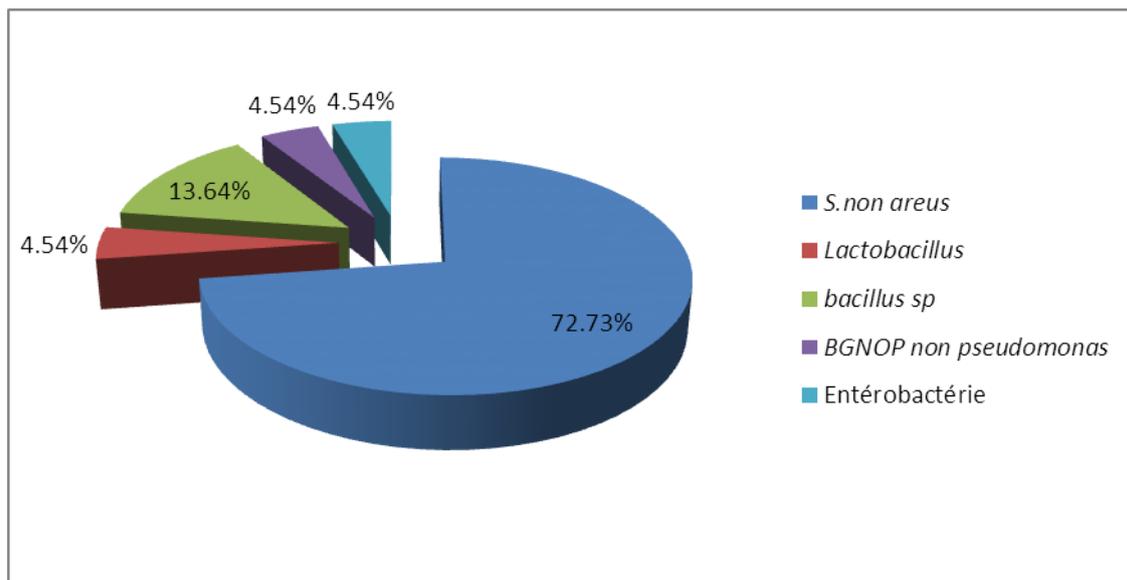
Leur identification par coloration de Gram a révélé la prépondérance des bactéries à Gram positif (90,9%) par rapport à celle à Gram négatif (9,1%).



**Figure 11:** Répartition des bactéries isolées des prélèvements d'air en fonction de la forme et de la coloration de Gram.

#### 2.4. Identification biochimique des bactéries isolées des prélèvements d'air.

Comme présenté en figure 12, les tests biochimiques effectués aux bactéries isolées des prélèvements d'air (soit 22 bactéries), ont montré la présence de 16 souches de *Staphylococcus* coagulase négative, soit un pourcentage de 72,73%, d'une souche de *Lactobacillus* avec un pourcentage de 4,54%, de trois souches de *Bacillus* sp, soit un pourcentage de 13,64%, d'une souche d'entérobactérie (4,54%) et d'une souche de BGNOP non *pseudomonas* (4,54%).



**Figure 12:** Distribution globale des bactéries isolées des prélèvements de l'air.

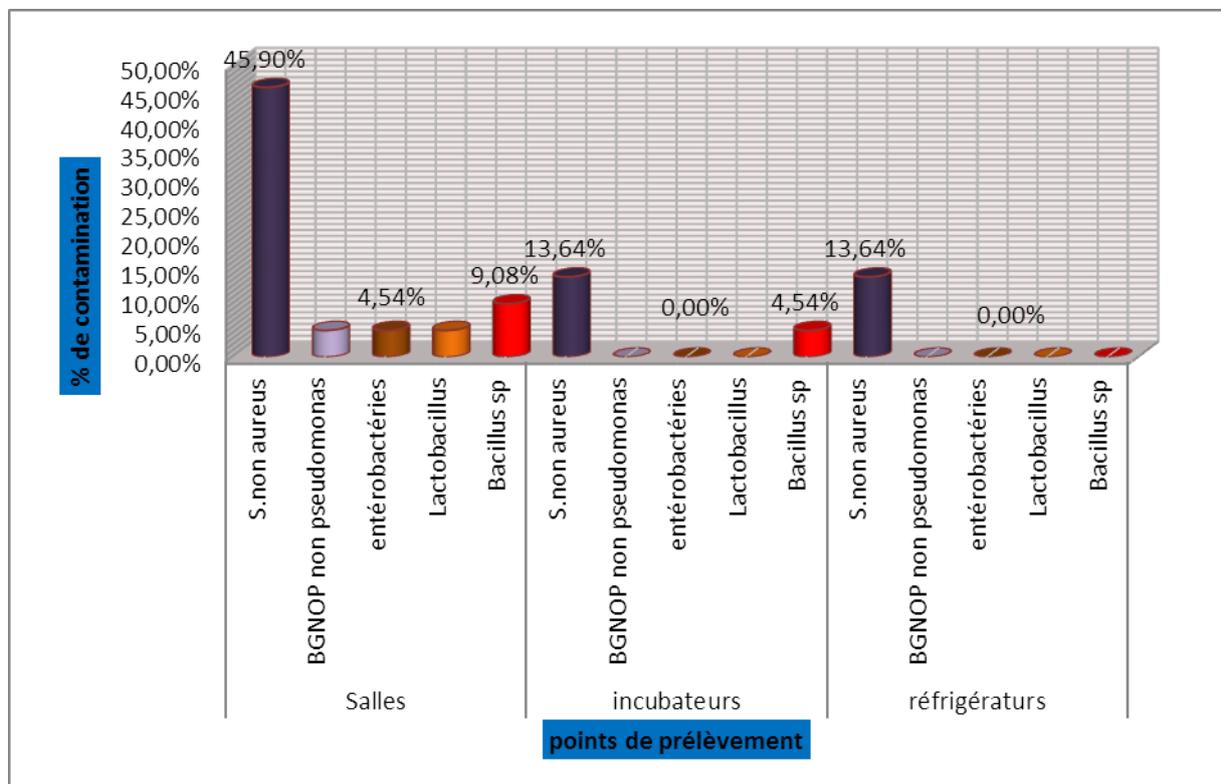


## 2.5. Distribution des bactéries isolées de l'air par points de prélèvement

La répartition des bactéries à partir des différents contrôles d'air réalisés, a permis de noter que *S.coagulase négative* était le genre bactérien le plus fréquemment isolé aussi bien dans l'air ambiant des salles contrôlées que dans l'air des réfrigérateurs et des incubateurs évalués. Nous avons aussi constaté que l'air des salles était contaminé par plusieurs genres bactériens ; *S.coagulase négative* avec un pourcentage de 45,9%, BGNOP non *pseudomonas* (4,54%), entérobactéries (4,54%), *Lactobacillus* (4,54%) et les *Bacillus sp.* (9,08%).

Au niveau des incubateurs, l'air était souillé par les *S.coagulase négative* (13,64%) et par les *Bacillus sp.* (4,54%).

Cependant, les réfrigérateurs n'étaient contaminés que par *S.coagulase négative* (13,64%).



**Figure 13:** Distribution des bactéries isolées de l'air par points de prélèvement.

## B. Evaluation de l'activité antibactérienne des désinfectants sur les souches isolées

### 1. Evaluation de l'efficacité des désinfectants sur les souches isolées des surfaces contrôlées

L'évaluation de l'efficacité de quatre désinfectants désignés par D1, D2, D3 et D4, sur les souches isolées des surfaces contrôlées, illustrée en figure 14, a montré qu'il y a une différence d'efficacité d'un désinfectant à l'autre et d'un genre bactérien à l'autre.



DRS

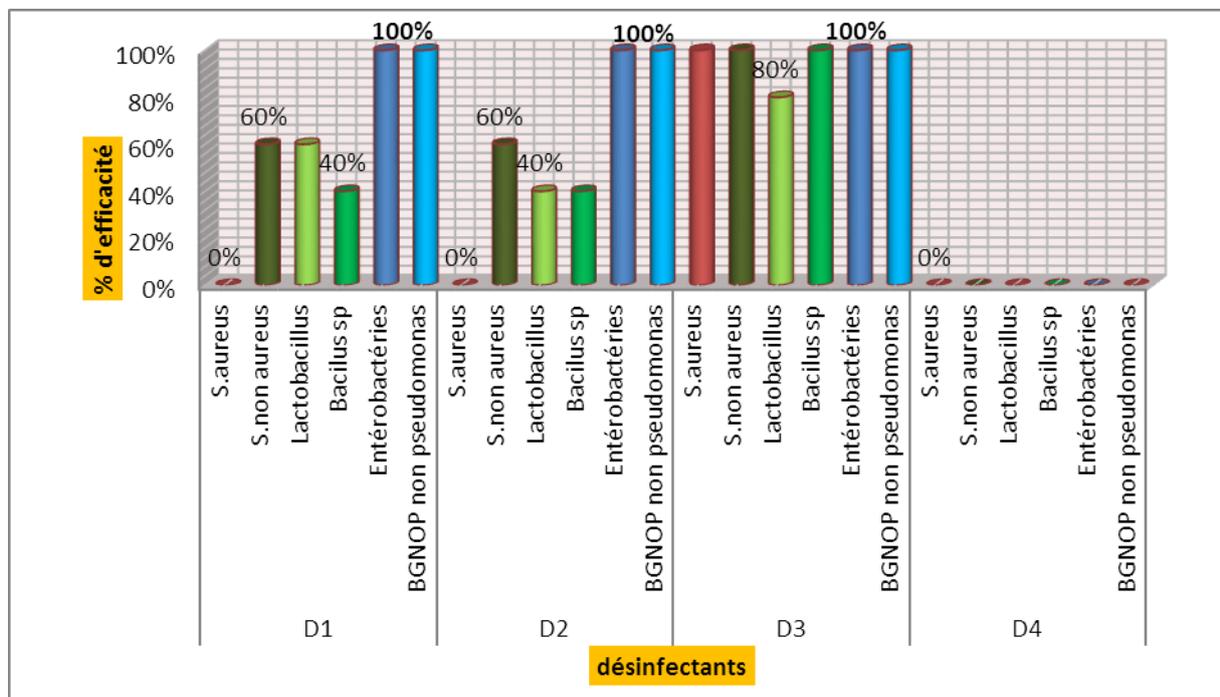


Le désinfectant D1 (à base de chlorure de didécyl diméthyl ammonium) a présenté une efficacité maximale (100%) sur les BGNOP non *pseudomonas* et les entérobactéries, de 60% sur les *Lactobacillus* et *S.coagulase* négative, de 40% sur les *Bacillus sp.* Cependant, il a été inefficace sur les souches de *Staphylococcus aureus* testées ;

L'efficacité du désinfectant D2 (à base de Chlorure de Benzalkonium) est maximale (100%) sur les BGNOP non *pseudomonas* et les entérobactéries, relativement élevée (60%) sur les souches de *S. coagulase* négative, légèrement modérée (40%) sur les *Lactobacillus* et *Bacillus sp* et nulle sur les *S.aureus*.

Le désinfectant D3, appartenant à la classe des halogénés avait une efficacité maximale contre les *S.aureus*, les *S. coagulase* négative, les entérobactéries, les BGNOP non *pseudomonas*, et les *Bacillus sp*, et relativement élevée contre les *Lactobacillus* (80%).

Le désinfectant D4, à base de Dechloroxylérol, n'a pas montré d'action (efficacité nulle) contre aucune souche bactérienne isolée des surfaces du laboratoire.

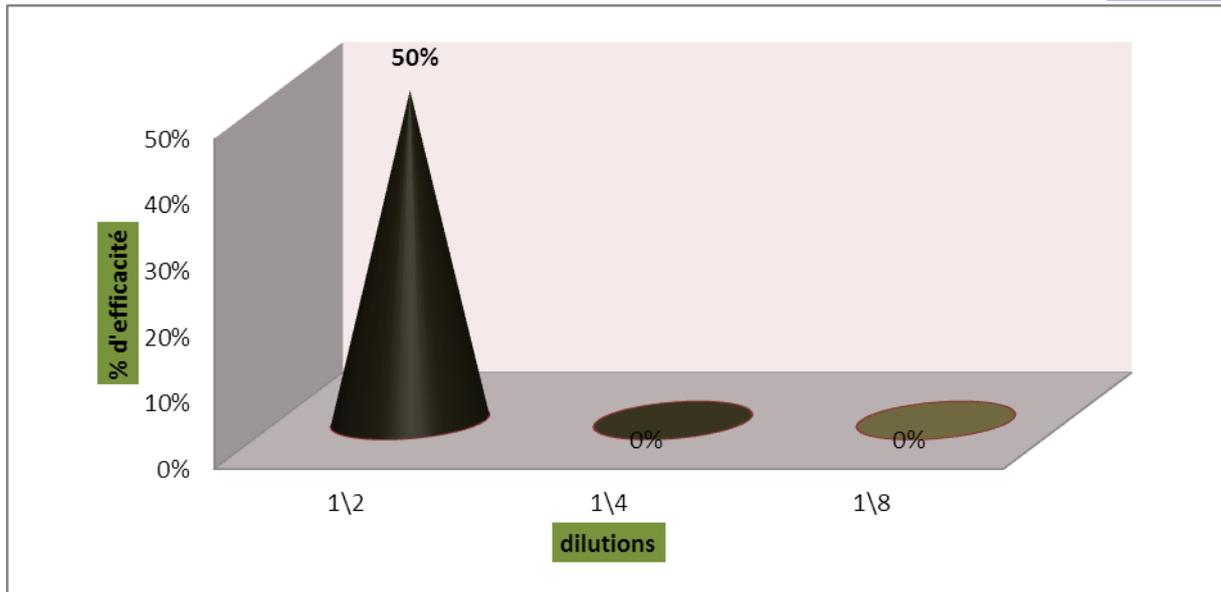


**Figure 14:** Evaluation de l'efficacité des désinfectants sur les souches isolées des surfaces contrôlées.

## 2. Détermination de la dilution cible

Comme le désinfectant D3 était le seul qui a montré une bonne efficacité sur la quasi-totalité des souches isolées et testées, sa dilution cible a été déterminée. Les résultats présentés en figure 15, montrent que la croissance de toutes les souches testées n'est pas inhibée par les dilutions 1/4 et 1/8.

Cependant, la dilution 1/2 a montré seulement une efficacité de 50% contre les bactéries isolées du laboratoire.



**Figure 15:** Détermination de la dilution cible du désinfectant D3.

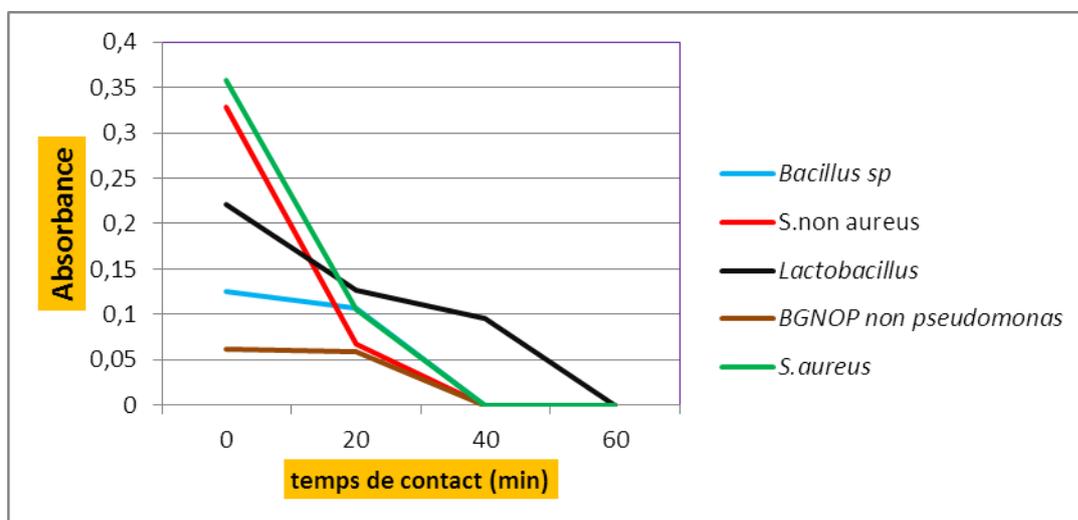
### 3. Détermination du temps minimal d'inhibition (TMI)

La détermination du temps minimal d'inhibition permettant d'inhiber le développement des souches bactériennes isolées des surfaces des points contrôlés, a été réalisée pour le désinfectant ayant montré la plus grande efficacité et sur l'ensemble des souches testées, soit le désinfectant D3.

En plus de l'absence de trouble, une mesure de l'absorbance au spectrophotomètre à la longueur d'onde 490 nm a été achevée. Les résultats sont montrés en figure 16.

Nous avons constaté que l'absorbance s'annule et le trouble disparaît à partir de 40 minutes de contact entre la souche bactérienne et le désinfectant D3, aussi bien pour les BGNOP non *pseudomonas*, que pour les *Bacillus sp* et les *S. coagulase négative*.

Le temps de contact atteint 60 min dans le cas des *Lactobacillus*.



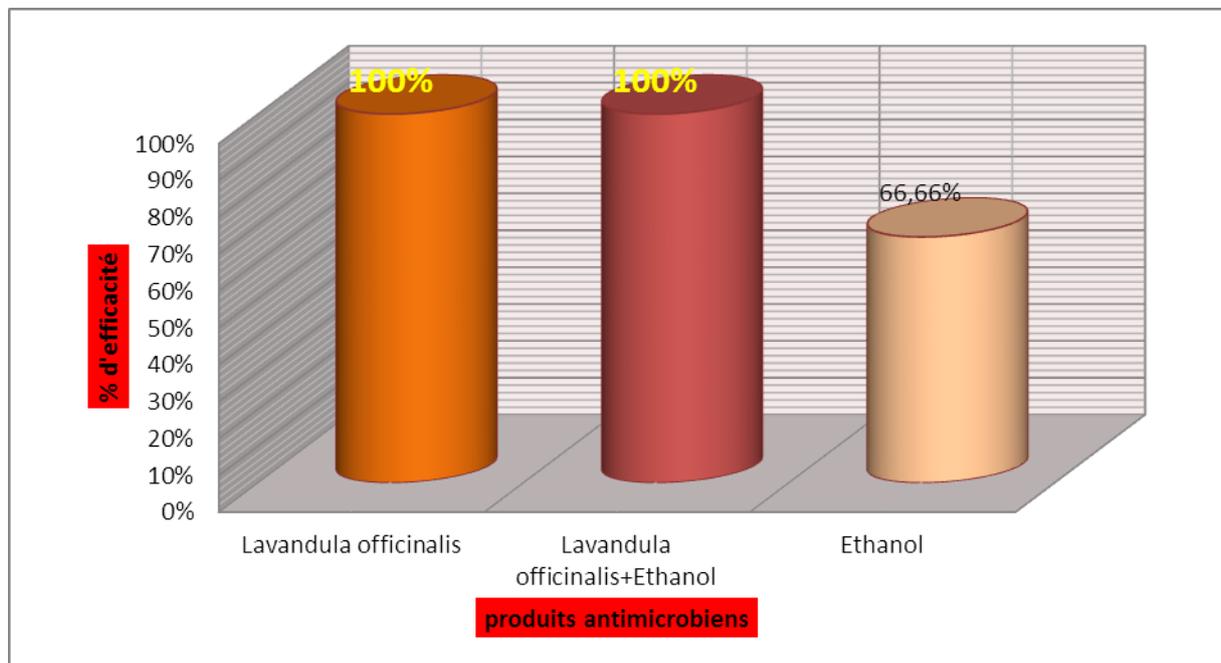


**Figure 16:** Détermination du temps minimal d'inhibition (TMI) du désinfectant D3

#### 4. Evaluation de l'action antimicrobienne des désinfectants sur les souches isolées des prélèvements d'air

L'action de deux désinfectants sur les souches isolées des prélèvements d'air a été déterminée. Les désinfectants choisis étaient l'huile essentielle de la lavande (*Lavandula Officinalis*) et l'éthanol à 70°.

Comme présentée en figure 17, l'huile essentielle de la lavande aussi bien à l'état pure que diluée au 50mg/ml dans l'éthanol 70°, a montré une inhibition totale de la croissance des souches bactériennes testées, alors que l'éthanol pur n'a montré qu'une efficacité de 66,66% contre les souches bactériennes isolées des prélèvements d'air



**Figure 17 :** Evaluation de l'efficacité des désinfectants sur les souches isolées des prélèvements d'air.



DRS



# *Discussion*

*Rapport-gratuit.com*   
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES



Assurer la sécurité de ses activités et prévenir le risque infectieux sont parmi les objectifs de la démarche qualité instaurée au LRDEHM. Cette maîtrise ne peut être obtenue que par le renforcement et l'application de bonnes pratiques d'hygiène et de désinfection efficace.

En tenant compte de la résistance des bactéries vis-à-vis de produits biocides, qui ne cesse de croître au fil du temps, nous avons réalisé cette étude durant laquelle nous avons d'abord contrôlé la contamination de l'environnement de l'unité d'hygiène alimentaire, identifié les germes isolés, puis nous avons évalué la sensibilité des souches bactériennes identifiées vis-à-vis de différents désinfectants.

28 points ont fait l'objet d'un contrôle avant désinfection de l'environnement. Ces prélèvements ont été effectués au niveau des paillasse, des étuves et des réfrigérateurs de l'unité. La moitié des contrôles a été consacrée pour évaluer la qualité de la surface et l'autre moitié pour la surveillance de l'air. La contamination a été notée dans 26 points, soit un pourcentage de contamination globale de 92,86%. L'absence de souillure a été constatée uniquement dans deux étuves.

Le pourcentage de contamination était identique pour les deux types de contrôle (92,86%).

La répartition des bactéries en fonction de la coloration de Gram a montré une prédominance des bactéries à Gram positif avec un pourcentage de 94%. **SCHMITT et al (2009)** notent que les bactéries à Gram+, très largement dispersées dans l'environnement par l'activité humaine, sont plus résistantes à la dessiccation que celles à Gram-, et surtout si les surfaces ne subissent qu'un bionettoyage quotidien sans effet désinfectant du produit. Ils ont aussi signalé que l'environnement constitue un réservoir aux bactéries Gram positif.

L'identification morphologique des bactéries isolées a révélé que les surfaces étaient plus contaminées par les bacilles notamment ceux à Gram positif (82,15%), alors que l'air était plus chargé par les cocci Gram+ (72,72%). Ces résultats ne concordent pas avec ceux mentionnés par **BOTTEREL et al (2004)** qui avaient trouvé une prédominance des bacilles (62%) contre un faible pourcentage de Cocci (35%).

Parmi les bacilles retrouvés au niveau des surfaces, les *Bacillus sp* ont été les plus fréquents (57,14%), suivis par *Lactobacillus* (25%) et les *S.non aureus* (10,71%), puis *S.aureus* et BGNOP non *pseudomonas* avec un faible pourcentage (3,57%).

Un résultat semblable a été obtenu par **SERGE et al** durant la période entre **2004** et **2005**. Ils avaient trouvé un pourcentage élevé de *Bacillus sp*.

La présence de *S.aureus* en faible pourcentage (3,57%) a été aussi notée par **BRUN-BUISSON (1996)** lors de l'identification des germes responsable des infections nosocomiales.

L'identification des cocci à Gram positif les plus fréquemment rencontrés dans l'air, en particulier des salles du laboratoire, a montré que la majorité était des *Staphylococcus* à



DRS



coagulase négative (45,90%), ce résultat concorde avec ceux de **MARCILA et al** en 2012 qui n'ont trouvé que ce genre de bactéries.

Ils sont considérés, par **LAVERN (1995)**, comme les premiers germes qui peuvent être présents dans l'environnement hospitalier et qu'il faut les maîtriser.

Les deux premiers désinfectants testés (D1 et D2) appartenant à la classe des ammoniums quaternaires, ont agi contre toutes les bactéries Gram- (BGNOP non *pseudomonas* et entérobactéries). Cependant, ils étaient moins efficaces vis-à-vis des bactéries Gram+ (*Lactobacillus*, *Bacillus sp* et *S.non aureus*). Ces résultats ne concordent pas à ceux obtenus par d'autres auteurs. **TENNSTEDT(2008)** a conclu que les ammoniums quaternaires sont très actifs face aux bacilles Gram positif alors que leur action est nettement moins importante vis-à-vis des bacilles Gram négatif.

La résistance totale de *S.aureus* à ces deux désinfectants a été remarquée, et pourrait être expliqué par **BRIDIER et al(2011)** comme étant due à la résistance acquise favorisée par la présence d'un plasmide codant pour un gène de résistance contre les ammoniums quaternaires.

Le désinfectant appartenant à la classe des halogénés (dérivés chlorés) désigné par D3, a présenté un pourcentage d'efficacité de 100% contre : les *Staphylococcus aureus* et non *aureus*, les entérobactéries, les BGNOP non *pseudomonas*, les *Bacillus sp*. Son efficacité était relativement élevée contre les *Lactobacillus* (80%). La sensibilité des bactéries vis-à-vis de ce produit était élevée. Selon **MOUNIER et al(2009)**, les dérivés chlorés agissent comme Oxydants, ils dénaturent les protéines, inactivent les acides nucléiques et ont aussi une action sporicide.

Le produit D4, à base de Dechloroxylénol, a été inefficace contre toutes les bactéries isolées. Ces résultats concordent avec ceux trouvés par **MUNTON et PRINCE (1975)** qui n'ont obtenu qu'une réduction de log10 pour nombreux germes, parmi lesquels on trouve *S.aureus*.

La détermination de dilution minimale cible, équivalente à la concentration minimal inhibitrice (CMI) a été réalisée pour le produit D3 puisque la quasi-totalité des souches y était sensible. Elle a montré que seulement la dilution 1/2 qui a donné un pourcentage de 50% d'efficacité. Cette résistance pourrait être liée au non-respect du protocole de désinfection au cours de la dilution du désinfectant par le personnel. Pour cette raison, il fallait utiliser le produit pur pour la désinfection des surfaces.

La détermination du temps minimal d'inhibition (TMI) a révélé que ce temps a varié d'une souche à l'autre, il était de 40min pour *Bacillus sp*, *S.aureus* et non *aureus*, *BGNOP non pseudomonas*, et de 60 min pour les *Lactobacillus*. Le temps minimal permettant d'inhiber la croissance de toutes les souches isolées de la surface est donc de 60 min.



**DRS**



Concernant les bactéries isolées de l'air ambiant du laboratoire, elles sont sensible à 100% à l'HE de *Lavandula officinalis* pure ou diluée dans l'alcool éthylique, mais elles sont moins sensibles vis-à-vis de l'alcool pur, soit un pourcentage d'inhibition de 66,66%, donc on peut suggérer l'utilisation de l'HE de la lavande diluée dans l'éthanol afin d'obtenir une meilleure efficacité. Ceci permet d'une part d'économiser le produit utilisé (HE de la lavande) et d'autre part de limiter les problèmes de résistance des germes vis-à-vis des produits antimicrobiens.



**Conclusions,**  
**recommandations et**  
**perspectives**



- ❖ Au terme de ce travail sur l'évaluation de l'efficacité antibactérienne de divers produits sur les germes isolés de l'environnement du LRDEHM de la ville de Fès, nous pouvons conclure que :
  - 92,86% des points contrôlés étaient contaminés au niveau de l'air et des surfaces ;
  - 96,43% des bactéries isolées de la surface des points contrôlés sont à Gram positif, et 3,57% sont à Gram négatif ;
  - Les surfaces les plus contaminées étaient les paillasses (75,46%), suivies des réfrigérateurs (36,67%) et des incubateurs (3,87%) ;
  - L'identification biochimique a montré une prédominance des *Bacillus sp* (57,14%), principalement au niveau des paillasses (32,14%) ;
  - L'air ambiant des salles était le plus contaminé, soit un pourcentage de 93,18% ;
  - Les bactéries Gram+ ont été les plus fréquemment retrouvées dans l'air (72,72%), avec une prédominance des *S. non aureus* notamment dans les salles (45,90%) ;
  - Les tests d'efficacité de désinfectants de surface ont révélé :
    - Une efficacité importante du désinfectant D3 à base du chlore avec un pourcentage de sensibilité maximale des genres bactériens testés à l'exception du genre *Lactobacillus* (soit 80% d'inhibition) ;
    - Le détergent D4 n'était pas efficace même à l'état pur ;
    - Le détergent D3 n'était pas efficace à l'état dilué ;
    - Le temps minimal d'inhibition était de 40min pour la quasi-totalité des genres bactériens sauf le genre *Lactobacillus* (60min) ;
    - Les produits biocides volatils utilisés pour la désinfection de l'air ont montré une :
      - Efficacité maximale de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* (100%), aussi bien à l'état pur qu'à l'état dilué dans l'éthanol ;
      - Efficacité relativement élevée de l'éthanol à 70° (66,66%).
- ❖ En guise de notre étude, il est recommandé de :
  - Sensibiliser le personnel sur l'importance du respect du protocole de la désinfection ;
  - Réaliser systématiquement un nettoyage et une désinfection selon un protocole défini ;
  - Alternier périodiquement les désinfectants pour ne pas favoriser l'installation de souches multi résistantes ;
  - Respecter la marche en avant et empêcher l'entrée de toute personne étrangère au laboratoire.
- ❖ A la suite de ces résultats, il serait intéressant de :
  - Mener une étude sur la résistance des souches isolées ;
  - Déterminer la CMI et le TMI des biocides jugés efficaces pour la désinfection de l'air.
  - Trouver d'autres alternances pour les désinfectants, notamment des surfaces ;



**DRS**



- Evaluer l'efficacité des désinfectants sur les champignons et les spores ;
- Déterminer l'effet du pH et de la température sur l'efficacité des désinfectants utilisés.
- Evaluer le protocole de désinfection mis en place.



# *Références* *bibliographiques*



- **ARECLIN**, juin 2001. Prélèvements d'environnement dans les établissements de santé – Mode opératoire ;
- **BILLAST. N, DUFFET. A, DUMARTIN. C, FELDMAN. P, FOSSE. F, POURRIER. C, RICON. G, ROBIQUET. A, SOUMAH. F**, Mai 2000. Antiseptiques et désinfectants. Centre de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales de l'interrégion Paris-Nord ;
- **BOTTEREL. F, FAIBIS. F, CHEVALIER. C, DELISSE. C, FIACRE. A, DUBOIS. A, DEMACHY. M.C**, 2004. Intérêts et limites de la surveillance des infections nosocomiales à partir du laboratoire de microbiologie : expérience du CHG de Meaux ;
- **BRIDIER. A, BRIANDET. R, THOMAS. V, DUBOIS-BRISSONNET. F**, 2011. Comparative biocidal activity of peracetic acid, Benzalkonium chloride and ortho-phthalaldehyde on 77 bacterial strains. *Journal of Hospital Infection* 78. 208e213 ;
- **BRUN-BUISSON. C**, 1996. Les infections nosocomiales. *Méd Mal Infect* ; 26,53-62 ;
- **CAPP-INFO**, N°46, juin 2007. Bulletin d'information du CAPP (Contact Avis Pharmacologique et Pharmaceutique) ;
- **CCLIN Sud-ouest**, novembre 1998. Contrôles microbiologiques en hygiène hospitalière, conseils pratiques ;
- **DRUILLES. J, CHANEFORT. A et HUET. M**, 1985. La désinfection chimique de l'air : mythe ou réalité ? *Médecine et maladies infectieuses*-8/9-421 à 429 ;
- **HARTEMANN. P, BLECH. M.F, SIMON. L**, mars 1997. Les contrôles microbiologiques de l'environnement hospitalier. *Revue française des laboratoires* ; N°291 ;
- **KAHRS. R.F**, 1995. Principes généraux de la désinfection, *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, 14 (1), 123-142 ;
- **LAVERN. H**, 1995. Les infections nosocomiales. *Méd Mal Infect* ; 25,67-72 ;
- **LE GUYADER. A**, Octobre 1999. Recommandations pour les contrôles d'environnement dans les établissements de santé ; C.CLIN-Ouest ;
- **MARCILA. S, KABBAJA. H, CHERKAOUIA. O, NADAHA. M, ALAOUIA. A.E, SEFFAR. M**, 2012. Endophtalmies bactériennes : étude rétrospective clinique et microbiologique à l'hôpital des spécialités de Rabat ;
- **MASSICOTTE.R**, 2009. Ph. D. Environnement. Désinfectants et désinfection en hygiène et salubrité: principes fondamentaux. Santé et services sociaux. Québec ;
- **MOUNIER. M, PESTOURIE. N, PLOY. M.C, DENIS. F** (2009). Les détergents et les désinfectants : rôle en médecine (1re partie). *Antibiotiques*, 11, 177—184 ;
- **MUNTON. T, Prince. J**, 1975. The bactericidal activity of Dettol on skin artificially contaminated with micro-organisms using the replica plating technique. *Reckitt & Colman SORL BL 75/12* (technical report).
- **PIBIRI. M**, 2005. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. THÈSE NO 3311. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne ;



DRS



- **ROUILLON. S, OURDANABIA. S, JAMART. S, HERNANDEZ. C, MEUNIER. O,** 2006. Étude de l'efficacité d'un produit détergent désinfectant pour sols et surfaces sur les souches bactériennes isolées à partir de l'environnement hospitalier ; *Pathologie Biologie* 54 (325–330) ;
- **SCHMITT. A, GLASSER. N, STAINBACH. D, MEUNIER. O,** 2009. Études expérimentales de l'effet rémanent d'un détergent désinfectant pour surfaces sur une souche d'*Escherichia coli* ; *Pathologie Biologie* 57 463–469 ;
- **SERGE. M, BENOIT. N, ROULEAU. A, GUILLOTEAU. D, VAN DER MEE-MARQUET. N,** 2007. Contamination microbiologique en radiopharmacie : problématiques et mise en œuvre de contrôles dans le cadre d'une démarche qualité ;
- **SQUINAZI. F,** 10 juin 2006. Analyses en microbiologie, Environnement microbien (air, surfaces, eau) ;
- **TENNSTEST. D,** 2008. Pathologies induites par les ammoniums quaternaires : de la maison au travail Pathologies dermatologiques. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* 48, 246–248;
- **THIEBAUD. D, GRIMOUD. A.M, MARTY. N, ROQUES. C, LODTER. J.P, CHABANON. G,** 2005. Hygiène : structures, matériels, méthodes. *EMC-Ondontologie* 1 307–339 ;
- **TOUCHE. S, LEPRINCE. A, ABITEBOUL. D,** 2002. Maîtrise des risques infectieux en laboratoires de microbiologie. Article paru dans la revue *Hygiènes*, volume X, n°2, pp 118-131 ;



DRS



# *Annexes*



DRS



## ❖ Annexe 1 : Ecouvillons stériles humidifiés



## ❖ Annexe 2 : Prélèvement d'air



## Annexe 3 : composition et contrôle qualité des milieux de culture

### 1- Composition des milieux de cultures

Les formules de chaque milieu sont données en gramme par litre d'eau distillée.  
Les milieux qui sont préparés sont tous stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 20 min

#### ❖ Milieu PCA

Tryptone	5.0
Extrait autolytique de levure	2,5
Glucose	1.0
Agar agar	15.0

pH du milieu : 7,0 +/- 0,2



### ❖ Milieu MCT

Tryptone	15.0
Peptone papainique de soja	5.0
Chlorure de sodium	5.0
Lécithine	0.7
Polysorbate (Tween 80)	5.0
Thiosulfate de sodium, 5 H <sub>2</sub> O	0.5
L-histidine	1.0
Agar agar bactériologique	20

pH du milieu : 7.3±0.2

### ❖ Milieu BHI

Infusion cœur-cerveau (matières solides)	8.0
Digestion peptique de tissu animal	5.0
Digestion pancréatique de caséine	16.0
Chlorure de sodium	5.0
Glucose	2.0
Phosphate d'hydrogène disodique	2.5
gélose	13.5

pH du milieu : 7.4±0.2

### ❖ Gélose à l'ADN

Hydrolysate tryptique de caséine	20.0
ADN	2.0
Chlorure de sodium	5.0
Agar agar	12.0

pH du milieu : 7.3

### ❖ Chapman mannité

Peptone	10.0
Extrait de viande de bœuf	1.0
Chlorure de sodium	75.0
Mannitol	10.0
Rouge de phénol	0.025
Agar agar	15.0

pH du milieu : 7.4

### ❖ King A

Peptone dite A	20.0
----------------	------



DRS



glycérol	10.0
Sulfate de potassium	10.0
Chlorure de magnésium	1.4
Agar purifié	12.0

pH du milieu : 7.2

### ❖ King B

Peptone dite B	20.0
glycérol	10.0
Hydrogénophosphate de potassium	1.5
Sulfate de magnésium heptahydraté	1.5
Agar purifié	12.0

pH du milieu : 7.2

### ❖ Hajna Kligler

Extrait de viande de bœuf	3.0
Extrait de levure	3.0
Peptone (riche en lysine)	20.0
NaCl	5.0
Citrate ferrique	0.3
Thiosulfate de sodium	0.3
Lactose	10.0
Glucose	1.0
Rouge de phénol	0.024
Agar	12.0

pH du milieu : 7.5±0.2

### ❖ Plasma de lapin

Peptone de viande	4.0
Peptone de gélatine	1.0
Extrait de viande	2.0
Chlorure de sodium	5.0

pH du milieu : 7.0±0.2

### ❖ Milieu urée-indole

L-Tryptophane	0.3g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1g
KHPO <sub>4</sub>	0.1g
NaCl	0.5g



DRS



Urée	2.0g
Alcool à 95°	1.0ml
Rouge de phénol à 1%	0.25ml
Eau distillée	100ml

Afin d'avoir des résultats fiables, nous avons procédé à un contrôle qualité de tous les paramètres (milieux de cultures, mesure Température des étuves et des réfrigérateurs, contrôle de la qualité de la verrerie et du consommable utilisé).

## 2- Contrôles qualité des milieux de cultures

Ce contrôle est basé sur les manipulations suivantes :

- Effectuer un calibrage de la balance,
- Utiliser une eau distillée préalablement contrôlée (pH, conductivité, ...),
- Préparer les milieux de cultures dans un champ stérile, à côté d'un bec benzène,
- Utiliser une verrerie contrôlée,
- Dissoudre complètement les composants du milieu préparé,
- Respecter la durée et le temps d'autoclavage,
- Contrôler le niveau d'eau de l'autoclave avant utilisation,
- Contrôler l'efficacité de l'autoclave à chaque stérilisation par le ruban indicateur et mensuellement par l'indicateur biologique (Stérikon),
- Couler les milieux stérilisés dans un champ stérile,
- Contrôler la stérilité du milieu préparé avant utilisation, par incubation d'une boîte si milieu solide ou d'un tube si bouillon à l'étuve à  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 48H.

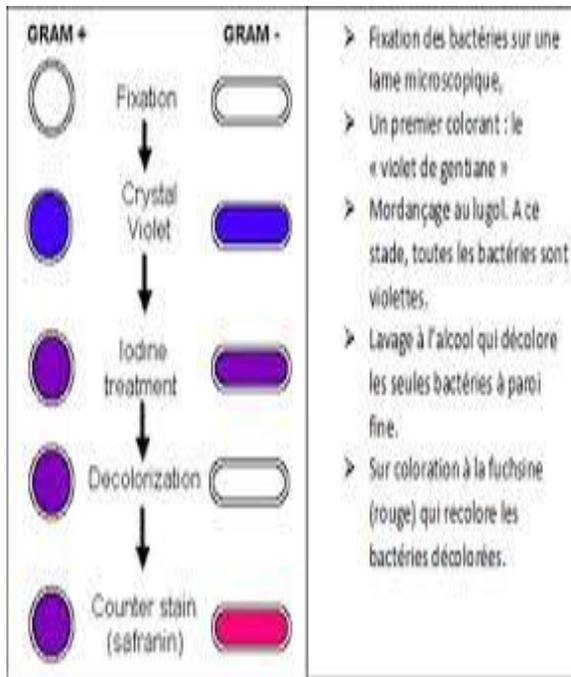


DRS



## Annexe 4 : identification bactériologique

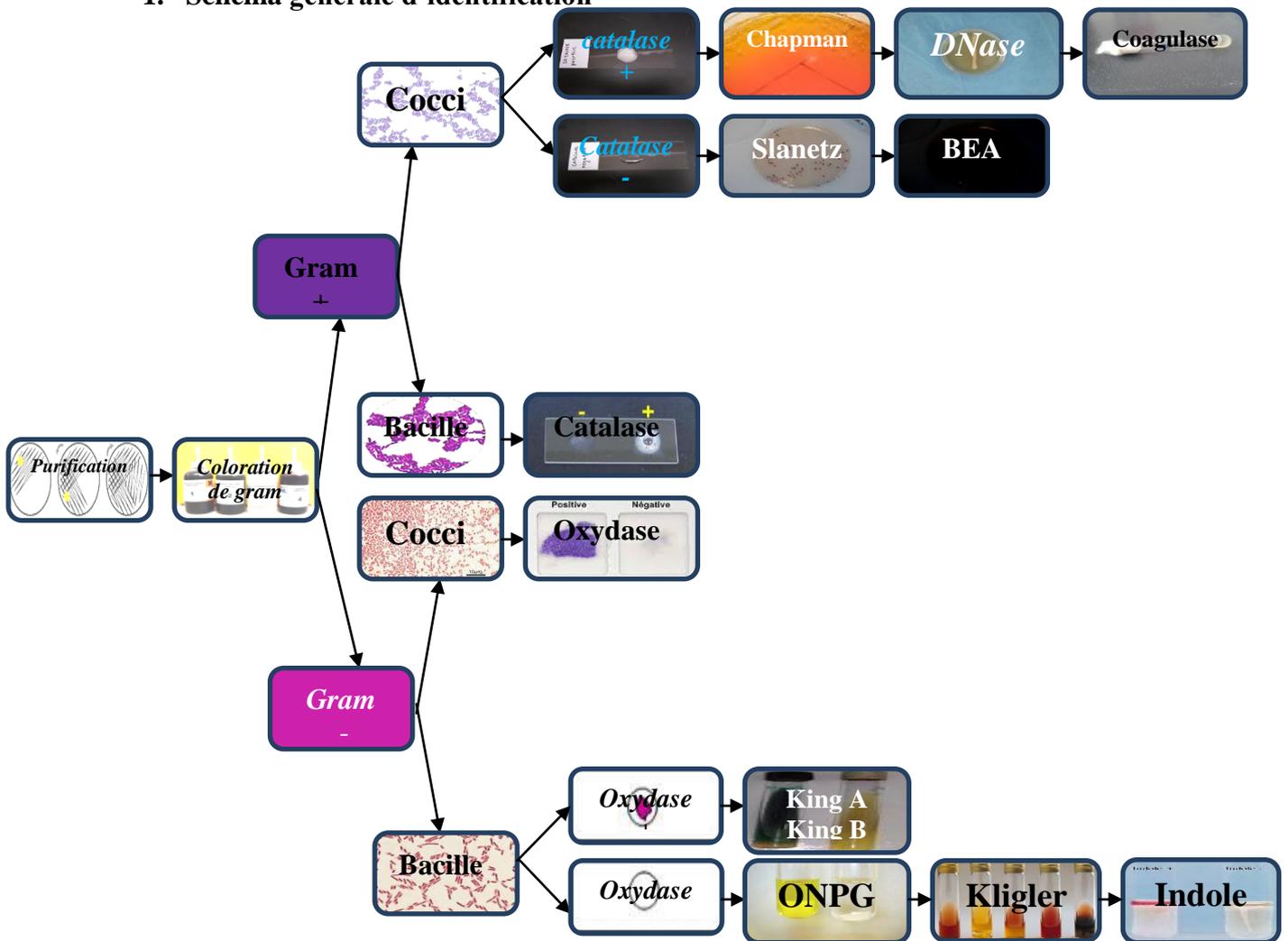
### 1. Coloration de Gram





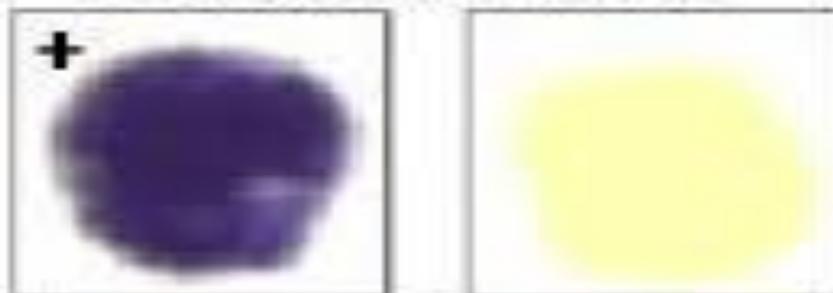
## Annexe 5 : Identification biochimique et lecture des résultats

### 1. Schéma générale d'identification



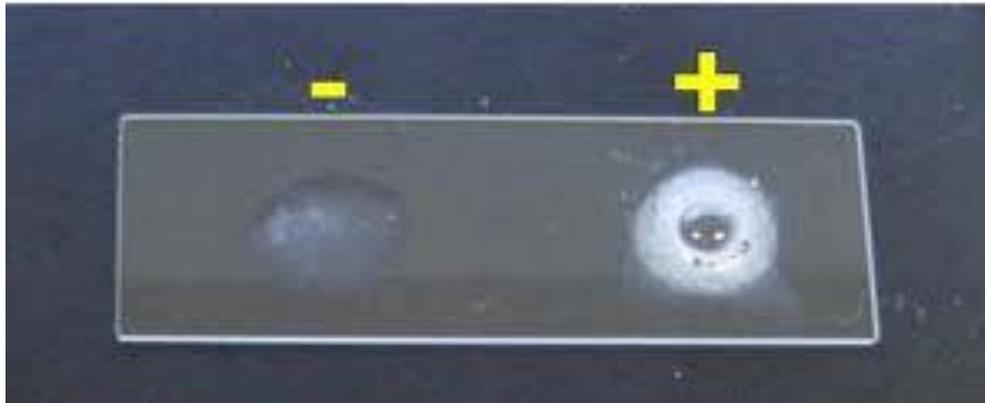
### 2. Test oxydase

oxidase test





### 3. Test de la catalase



### 4. Test ONPG



**Test ONPG négatif  
positif**



**Test ONPG**



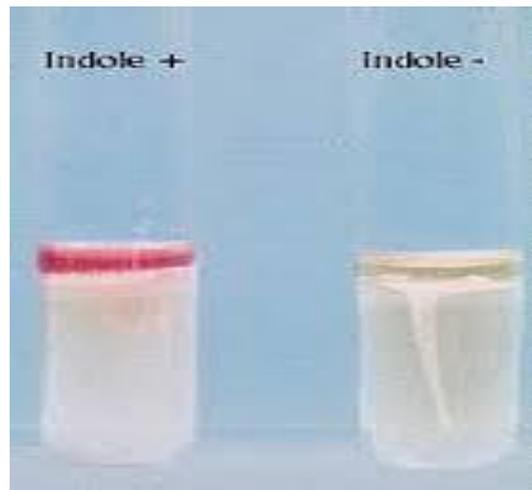
DRS



### 5. Milieu lactose-glucose-H<sub>2</sub>S (Kligler-Hajna)



### 6. Test indole



### 7. Milieux de King

<b>King A</b>	<b>King B</b>	<b>King A</b>	<b>King B</b>	<b>King A</b>	<b>King B</b>
Production de pyocyanine et pyoverdine		Production de pyoverdine uniquement		Pyocyanine - et pyoverdine -	



DRS



## 8. Milieu Chapman mannité



Milieu Chapman avant utilisation

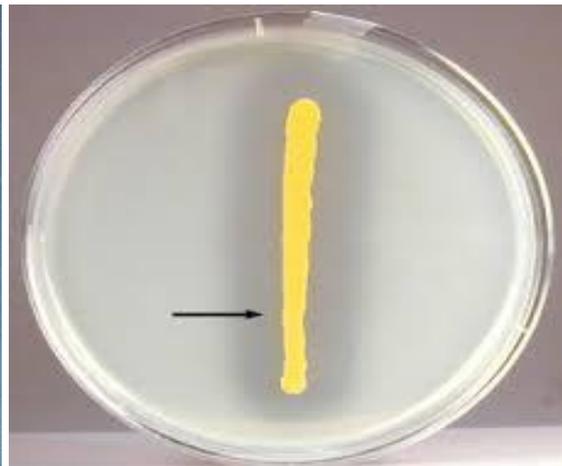


Milieu Chapman positif

## 9. Recherche de la DNase

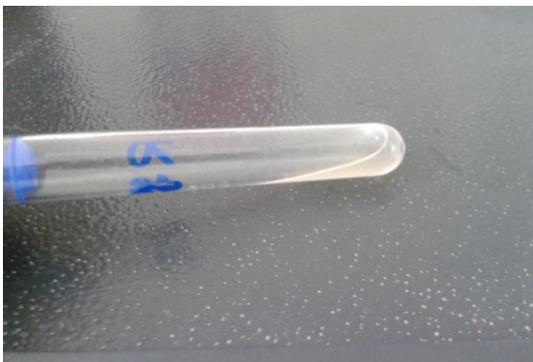


DNase négatif

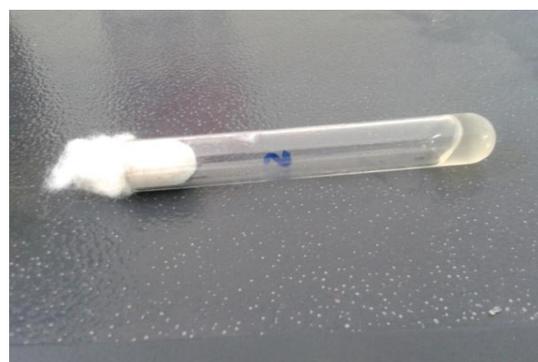


DNase positif

## 10. Test coagulase :



Coagulase négatif



Coagulase positif