

Liste d'Abréviation

FDA : Food and Drug Administration des États-Unis.

TIAC : Toxi-infections Alimentaires Collectives.

HACCP : Analyse des risques et de maîtrise des points critiques (Hazard Analysis Critical Control Point).

FAO : Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture.

CCP : Point critique pour la maîtrise.

FMAT : Flore mésophile aérobie totale.

UFC : Unité Formant Colonie.

E. coli : *Escherichia coli*.

S.aureus : *Staphylococcus aureus*.

SCN : *Staphylococcus* a coagulase négative.

VRBL : Lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre.

BHI : Brain Heart Infusion.

EMB : Gélose éosine bleu de méthylène.

GEL : Gélatine.

CIT : Citrate.

VP : Voges proskauer.

TDA: Tryptophane désaminase.

IND : Indole.

Liste des figures

Figure 1: Pourcentage de contamination.....	28
Figure 2: Distribution globale des germes isolée.....	29
Figure 3: Répartition de <i>Staphylococcus</i>	31
Figure 4: Répartition des entérobactéries.....	31

Liste des tableaux

Tableau 1: Profil biochimique des <i>Staphylococcus</i> identifiés.....	29
Tableau 2: Profil biochimique des entérobactéries identifiées.....	31

SOMMAIRE

Introduction	12
CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. La restauration collective	13
I.1 Définition	13
I.2 Hygiène en restauration collective	13
I.3 La toxi-infection alimentaire collective	13
II. Démarche HACCP dans la restauration collective	14
II.1 Définition	14
II.2 Les principes du système HACCP	14
III. Hygiène de personnel	15
III.1 Généralité	15
III.2 Hygiène des mains	16
III.2.a Définition d'hygiène des mains	16
III.2.b La catégorie des germes présents dans les mains	16
III.3. <i>FLORE TRANSITOIRE</i>	16
i Flore mésophile aérobie totale	16
ii. Les coliformes fécaux (<i>E. coli</i>)	17
iii. <i>Staphylococcus aureus</i>	17
III.2.d Objectifs d'hygiène des mains	18
CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES	
I. Type d'étude	19
II. Lieu et points de prélèvements et d'étude	19
III. Prélèvements, conservation des échantillons	19
III. 1 Mode de prélèvement	19
IV. 2 Analyse bactériologique	19
IV. 2.1 CULTURE DES PRÉLÈVEMENTS DES MAINS	19
IV. 2.2 IDENTIFICATION BACTÉRIOLOGIQUE	19
IV. 2. 2. a Coloration de Gram	19
IV.2.2.b <i>ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	21
IV.2.2.c <i>ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES COLIFORMES</i>	22
V. Outil d'analyse	22

CHAPITRE 3: RESULTAT ET DISCUSSION

RESULTATS	29
DISCUSSION	31
Conclusions, Recommandations et Perspectives	34
Référence bibliographique	
Annexe	

Introduction

D'un point de vue anatomique, les mains sont l'outil de préhension de l'homme et lui servent à interagir avec son environnement. Cet environnement externe est peuplé par la flore bactérienne ou virale, les salissures et éléments toxiques. Les mains participent à véhiculer ces éléments, et constituent le mode de transmission principal des micro-organismes [1].

L'hygiène des mains dans la restauration collective est considérée comme une des mesures les plus efficaces pour diminuer la contamination des aliments, et à réduire le risque de la TIAC d'une manière très importante, car beaucoup de ces maladies sont causée par des microorganismes transmis par les mains des manipulateurs de nourriture [1].

Cependant, des études ont montré qu'il y avait un faible taux d'adhésion aux pratiques recommandées d'hygiène des mains par les manipulateurs d'aliments pendant la préparation des aliments [2], par exemple, la FDA a établi des recommandations pour prévenir la contamination des aliments. l'organisation mondiale de la santé a également publié le "Five Keys to Safer Food Manual "dans lequel ils mettent l'accent sur les pratiques d'hygiène des mains avant la préparation des aliments ainsi que pendant et après toute la procédure de manutention pour prévenir la contamination alimentaire [3].

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude est d'isoler et identifier les germes manuportés par les manipulateurs d'aliments.

CHAPITRE1: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. La Restauration collective

I. 1 Définition

La restauration collective recouvre toutes les activités consistant à préparer et à fournir des repas aux personnes travaillant et/ou vivant dans une collectivité déterminée à un prix inférieur à celui pratiqué par des restaurants similaires ouverts au public [4].

La restauration collective regroupe [4] : les entreprises publiques ou privées, les collectivités territoriales et administrations, l'enseignement public et privé (crèches, lycée), tous les autres organismes publics et privés assurant l'alimentation de leurs ressortissants (les centres de loisirs, les forces armées) ...

I. 2 Hygiène en restauration collective

L'hygiène en restauration consiste à recevoir des denrées alimentaires brutes, à les transformer et à les distribuer, tout en empêchant la multiplication des microbes qu'elles renferment (moisissures, levures, bactéries, virus) et en essayant d'en ajouter le moins possible. En effet, ceux-ci sont responsables de l'altération des denrées (acidification, fermentation) et des Toxi-infections Alimentaires Collectives [5].

I. 3 La toxi-infection alimentaire collective

Les TIAC sont fréquentes et parfois graves. Elles représentent un véritable problème de santé publique et sont, de ce fait, incluses parmi les maladies transmissibles à déclaration obligatoire. Un foyer de TIAC est défini par l'apparition d'au moins deux cas d'une symptomatologie, en général digestive, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire. La surveillance, le contrôle et la prévention des TIAC nécessitent une collaboration étroite entre les médecins, les vétérinaires, les épidémiologistes et les professionnels de la restauration collective et du secteur agro-alimentaire [5].

Parmi les microorganismes principalement responsables des TIAC on trouve : *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* et *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens* [5]

Le non-respect de la chaîne du froid, les erreurs dans le processus de préparation des aliments et un délai trop important entre la préparation et la consommation représentent les principaux facteurs favorisant la survenue d'une TIAC et des maladies graves chez les consommateurs de restauration collective [5].

Donc pour le respect des règles d'hygiène alimentaire, la mise en place d'un système d'hygiène dans la restauration est nécessaire, la réglementation renvoie aujourd'hui expressément vers les guides des bonnes pratiques sectoriels qui permettent la mise en œuvre de la démarche HACCP [5].

II. Démarche HACCP dans la restauration collective

II. 1 Définition

Créée dans les années 60 par la société Pillsbury et la NASA a fin de garantir la sécurité sanitaire et la salubrité des aliments [6].

La méthode HACCP permet:

- ✚ D'identifier et analyser les dangers associés aux différents stades du processus de production d'une denrée alimentaire.
- ✚ De définir les moyens nécessaires à leur maîtrise
- ✚ De s'assurer que ces moyens sont mis en œuvre de façon effective et efficace.

II. 2 Les principes du système HACCP

Principes 1: Identifier et analyser les dangers

a. Identifier les dangers :

L'HACCP s'intéresse aux 3 classes des dangers pour l'hygiène des aliments: Les dangers biologiques (virus, bactéries), les dangers chimiques, les dangers physiques (bois, verre...) [7].

b. Evaluer le risque de chaque danger :

Pour chaque danger identifié on évalue le risque pour le produit considéré (fréquence ou probabilité d'apparition, et gravité du danger et la détectabilité) [7].

c. Trouver les causes :

Pour chaque opération, on cherche les causes des dangers identifiés. La méthode 5M est une méthode d'analyse qui sert à rechercher et à représenter de manière synthétique les différentes causes possibles d'un problème. Elle fut créée par le professeur Kaoru Ishikawa (1915-1989) d'où son appellation « Méthode d'Ishikawa » [8].

LES 5M sont : Matières premières, Matériel, Main d'œuvre, Méthode, Milieu.

Principe 2: Identification des CCP

Déterminer les points critiques pour la maîtrise (CCP) [7].

Principe 3: Etablissement des limites critiques

Il convient de fixer et valider des seuils correspondants à chacun des points critiques pour la maîtrise des dangers [7].

Principe 4: Etablissement d'un système de surveillance des CCP

Mettre en place un système de surveillance permettant de maîtriser les CCP [7].

Principe 5: Etablissement d'un plan d'actions correctives

Déterminer les mesures correctives à prendre lorsque la surveillance révèle qu'un CCP donné n'est pas maîtrisé [7].

Principe 6: Instauration des procédures de vérification

Appliquer des procédures de vérification afin de confirmer que le système HACCP fonctionne efficacement [7].

Principe 7: Constituer des dossiers et tenir des registres

Constituer un dossier dans lequel figurera toutes les procédures et tous les relevés concernant ces principes et leur mise en application [7].

III. Hygiène de personnel

III. 1 Généralité

Le personnel qui manipule les aliments peut être une source de contamination importante, soit du fait de son mauvais état de santé ou d'être porteur asymptomatique (est une personne qui héberge un agent infectieux sans que celui-ci provoque de symptômes visibles) de certains germes, d'un comportement inapproprié mais également du fait d'une hygiène corporelle inadéquate [9].

➤ Maladies et blessures

Toute personne dont l'état de santé est anormale (diarrhée, Fièvre, Lésions de la peau visiblement infectées, vomissements pourrait conduire à la contamination des produits, donc

chaque affection doit être signalée à la direction, afin que celle-ci envisage la nécessité éventuelle d'un examen médical et/ou d'une exclusion des aires de manutention des aliments [9].

➤ **Propreté corporelle**

Les personnes qui manipulent les aliments devraient maintenir un haut standard de propreté corporelle et porter des vêtements sains, un couvre-chef et des chaussures appropriés [9].

➤ **Comportement personnels**

Les personnes qui manipulent les aliments devraient éviter les comportements susceptibles d'entraîner une contamination des aliments (fumer; mâcher ou manger; les effets personnels tels que bijoux, montres, épingles ou autres objets ne devraient pas être portés ou introduits dans les aires de manutention des aliments s'ils posent une menace pour la sécurité et la salubrité des aliments) [9].

III.2 Hygiène des mains

III.2.a Définition d'hygiène des mains

Il s'agit d'un traitement des mains par un savon liquide non médicamenteux ou par un produit (savon, gel ou solution) ayant un spectre d'activité antimicrobien ciblé sur les micro-organismes de la flore cutanée afin de prévenir leur transmission » [10].

III. 2. b La catégorie des germes présents dans les mains

La flore résidente : regroupe les germes commensaux de la peau qui sont installés de façon permanente et habituelle, cette flore joue un rôle important de barrière en évitant la colonisation par d'autres espèces [11].

La flore transitoire : ou superficielle est composée des germes saprophytes issus de l'environnement (eau, surfaces, plantes...) et parfois des bactéries pathogènes. Elle varie au cours de la journée selon les activités, Cette flore sera diminuée et/ou éliminée par des techniques d'hygiène des mains [11].

III. 3. c Flore transitoire (pathogène) :

i. Flore mésophile aérobie totale

La FMAT est un indicateur sanitaire qui permet d'évaluer le nombre d'Unité Formant Colonie présent dans un produit ou sur une surface. L'unité de dénombrement est UFC. Théoriquement, il s'agit alors de rechercher la flore thermophile dont la température optimale

de croissance se situe à +45°C, la flore mésophile dont la température optimale de croissance se situe entre +20°C et +40°C et la flore psychrophile dont la température optimale de croissance se situe à +20°C. Leur isolement se faisant sur un milieu gélosé dit ordinaire ou nutritif, la plupart des microorganismes se développe, sauf les microorganismes exigeants et les microorganismes anaérobies stricts. Il est donc préférable de parler de Flore Mésophile Aérobie à +30°C, plutôt que de « Flore Totale » [13].

ii. Les coliformes fécaux (*E. coli*)

Les coliformes fécaux sont des coliformes capables de se développer à 44°C.

Cette catégorie inclut essentiellement *Escherichia coli*. Cette flore est spécifique de la flore fécale, elle est donc recherchée pour évaluer la contamination fécale des aliments. Les coliformes fécaux ne survivent pas longtemps à l'extérieur du corps, leur présence dans les aliments est donc un signe de contamination relativement récente [14].

❖ *Escherichia coli*

Le genre *Escherichia* fait partie du groupe des coliformes thermotolérants, lequel appartient à la famille des entérobactéries, Il s'agit d'une bactérie aéro-anaérobie, lactose +, gazogène, réalisant une fermentation mixte, elle produit de l'indole, il réduit les nitrates en nitrites et fermentent le glucose [15].

C'est un hôte normal de l'intestin de l'homme et des animaux qui est très abondant dans les matières fécales (10^6 à 10^7 par gramme chez l'homme : 80 % de la flore aérobie), donc c'est une germe d'origine fécale humaine ou animale, car il n'existe pas dans l'environnement naturel, il peut cependant survivre quelques mois dans l'eau, le sol ou sur les plantes, bien qu'il se multiplie rarement dans ces milieux [15].

iii. *Staphylococcus aureus*

S.aureus plus couramment appelé *staphylocoque* doré en raison de la couleur jaune des colonies qu'il forme sur gélose, est une bactérie sphérique à Gram positif, anaérobie facultative, immobile et formant des amas réguliers à la manière de grappe de raisins, c'est une bactérie mésophile, neutrophile, et halophile [16].

Cette espèce fait partie du genre *Staphylococcus* qui peut être divisé en deux groupes: Les staphylocoques à coagulase positive et les staphylocoques à coagulase négative. La coagulase produite par les staphylocoques à coagulase positif tels que *S. aureus* est une exoenzyme capable de coaguler le plasma sanguin et constitue un moyen d'identification simple et rapide. Une intoxication alimentaire due à *S. aureus* est suspectée lorsque des symptômes, tels que nausées, vomissements, crampes abdominales et diarrhée, affectent des

individus 1 à 8 h après l'ingestion d'aliments. Ces symptômes sont dus à l'action des entérotoxines que la bactérie peut produire au cours de sa croissance. La présence de *S. aureus* peut être d'origine humaine ou animale, il colonise la peau et les muqueuses de l'homme et de nombreuses espèces animales à sang chaud [16].

Bien qu'il existe de nombreux sites de colonisation chez l'homme, le nasopharynx est le site de portage le plus fréquent. Il a été estimé que 27% de la population humaine est porteuse de *S. aureus* dans le nasopharynx. Les autres sites fréquents de portage sont la peau et le périnée [17].

Même si le portage de *S. aureus* augmente le risque de contracter une infection liée à cette bactérie, l'homme ne présente généralement aucun symptôme lié à cette colonisation. De ce fait, au cours de la fabrication/préparation des aliments, une contamination de l'aliment par l'homme est possible si les conditions d'hygiène ne sont pas pleinement contrôlées.

Il a été estimé qu'environ 20% des cas de TIAC impliquent une contamination par une personne infectée par un agent pathogène et ayant manipulé la nourriture, ces cas de TIAC ont été provoqués principalement dans des lieux de restauration (restaurant, hôtel...), lors d'événements animés par des traiteurs ou encore à la maison. Mais il arrive aussi que les contaminations aient lieu dans les usines de transformation des aliments [18].

III. 2. d Objectifs d'hygiène des mains [9]

En restauration la législation impose de se laver les mains chaque fois que cela est nécessaire :

- A la prise ou à la reprise du travail.
- Après passage aux toilettes.
- Après s'être mouché, avoir toussé, s'être touché le nez, les cheveux ou la tête.
- Après une opération contaminante (manipulation des poubelles, des emballages...).
- Avant des opérations sensibles (hachage, etc.) ou avant manipulation de produits sensibles (mayonnaise, tartare, carpaccio, etc.).

Le lavage des mains permet donc d'éliminer les résidus alimentaires et les souillures visibles et de détruire la charge microbienne des mains de personnel qui manipule les aliments.

CHAPITRE 2: MATERIEL ET METHODES

I. Type d'étude

Il s'agit d'une étude rétrospective réalisée au laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès sur une période de 2 mois, allant du 3 avril au 25 mai 2017.

II. Lieu et points de prélèvements et d'étude

Les prélèvements analysés ont été réalisés auparavant par un technicien d'hygiène dans un restaurant et stockées à -80°C .

Le nombre de prélèvements analysés à partir des mains de manipulateur était de 20 prélèvements. L'analyse a été réalisée au laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès.

III. Prélèvements, conservation des échantillons

III .1 Mode de prélèvement

Les prélèvements des mains ont été faits par la technique d'écouvillonnage, appelée aussi la technique de rinçage par tampon, un modèle de papier stérile de 25 cm^2 a été utilisé pour délimiter la zone de la main à échantillonner, cette technique consiste à utiliser un écouvillon stérile préalablement humidifié dans le sérum physiologique contenu dans son étui, La zone délimitée a été frottée pendant 20 s : en effectuant des stries parallèles rapprochées, et en le faisant tourner légèrement dans le même point en stries perpendiculaires aux premiers, l'écouvillon ensuite a été introduit dans le tube contenant le sérum physiologique pour une analyse ultérieure en laboratoire.

IV. 2 Analyse bactériologique

IV. 2 . 1 Culture des prélèvements des mains

Les écouvillons ont été immergés dans un bouillon nutritif liquide (BHI), puis incubés à $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 24h.

Ce bouillon a été utilisé pour ensemer, par épuisement, 2 milieux : la gélose VRBL, et la gélose Baird Parker. Ces différentes cultures ont été incubées à 44°C et à 37°C pendant 24H respectivement.

IV. 2 . 2 Identification bactériologique

IV. 2. 2. a 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 s, puis on élimine le violet de gentiane en rinçant avec le lugol, 2 fois pendant 15 secondes. 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.

IV. 2. 2. b Isolement et identification des *Staphylococcus aureus*

❖ **Isolement sur gélose Baird Parker**

Baird Parker est un milieu différentiel modérément sélectif servant à l'isolement et à l'énumération des *Staphylococcus aureus*.

▪ **Principe**

La gélose Baird Parker est un milieu qui exploite la capacité des staphylocoques à réduire la tellurite en tellure et à détecter la présence de lécithinase à partir de la lécithine de l'œuf. Il contient les sources de carbone et d'azote nécessaires à la croissance. La glycine, le chlorure de lithium et le tellurite de potassium jouent le rôle d'agents sélectifs. Le jaune d'œuf est le substrat qui permet de mettre en évidence la production de lécithinase, Les staphylocoques produisent des colonies de couleur gris foncé à noire, en raison de la réduction de la tellurite contenue dans le milieu; les staphylocoques qui produisent de la lécithinase dégradent le jaune d'œuf, provoquant ainsi la formation des zones claires autour des colonies correspondantes.

▪ **Technique**

A partir d'une culture bactérienne, la surface du milieu Baird Parker estensemencée en stries serrées, puis incubé à 37°C pendant 24 heures.

▪ **Lecture**

Les staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus*) produisent des colonies convexes brillantes de couleur gris foncé à noire présentant un contour complet et des zones transparentes.

❖ Identification

➤ Le 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.

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+, 0,5 ml de ce dernier est prélevé, ensuite 0,5 ml du plasma de lapin puis incubé à $37\pm 1^\circ\text{C}$ pendant 24 h.

▪ Lecture

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

IV. 2.2. c Isolement et identification des coliformes (Entérobactéries)

❖ Isolement des coliformes fécaux sur gélose VRBL

Le Milieu VRBL est un milieu de culture utilisé pour les coliformes.

▪ Principe

Le milieu VRBL est un milieu sélectif qui contient simultanément le cristal violet et les sels biliaires qui assurent l'inhibition des bactéries à Gram positif.

La fermentation du lactose se traduit par une acidification, révélée par le virage au rouge de l'indicateur pH (rouge neutre), et par la précipitation d'acides biliaires autour des colonies.

▪ Technique

A partir d'une culture bactérienne, la surface du milieu VRBL estensemencée en stries serrées, puis incubé à 44°C pendant 24 heures.

▪ Résultat

Les colonies des coliformes sont rondes, rouge-pourpre, de diamètre entre 0,5 à 2 mm.

Escherichia coli se caractérise sur la gélose VRBL par des colonies roses à pourpre avec halo. La confirmation se fait après la réalisation des tests suivants :

➤ **Test Indole**

▪ **Principe**

Les bactéries dégradent le tryptophane en indole grâce à une tryptophanase.

▪ **Technique**

Le milieu Urée-Indole est ensemencé avec la culture du germe à étudier et puis l'incubé à 37° C pendant 24 à 48 heures.

Après addition du réactif de Kovacs, le diméthyl-amino-4-benzaldéhyde contenu dans ce dernier réagit avec l'indole, produit de l'activité de la tryptophanase, et forme un composé coloré en rouge.

▪ **Lecture**

Formation d'un anneau rouge : indole positif, il s'agit d'*E. coli*

Absence d'un anneau rouge : indole négatif, il ne s'agit pas d'*E. coli*.

➤ **Le milieu EMB**

▪ **Principe :**

La gélose EMB ou milieu de Lévine, est utilisée pour isoler et identifier *Escherichia coli* et *Enterobacter*, ainsi que les bactéries intestinales à Gram négatif.

L'éosine et le bleu de méthylène sont deux colorants inhibiteurs et des agents faiblement sélectifs. Ils n'inhibent le développement des microorganismes à Gram positif tels que les entérocoques, ces colorants assurent la différenciation entre les germes lactose positif et les germes lactose négatif.

▪ **Technique :**

A partir d'une culture bactérienne, la surface du milieu EMB est ensemencée en stries serrées, puis incubé à 37°C pendant 24 heures.

▪ **Lecture :**

Dans ce milieu, *E. coli* donne des colonies violet foncé ; bombées faiblement confluentes, de 2 à 3 mm de diamètre, à centre noir étendu à plus des 3/4 du diamètre et qui présentent un éclat métallique verdâtre en lumière réfléchi.

➤ **Le milieu Citrate de Simmons**

▪ **Principe**

Dans le milieu Citrate de Simmons, le citrate est l'unique source de carbone, son utilisation se traduit par une alcalinisation du milieu qui est révélée par le virage de l'indicateur de pH (bleu de bromothymol) au bleu et donc la souche est Citrate de Simmons positive.

▪ **Technique**

A partir d'une culture bactérienne, la gélose Citrate de Simmons qui est dans des tubes inclinés, est ensemencée, puis incubé à 37°C pendant 24 heures.

▪ **Lecture**

-Virage vers le bleu (citrate+): les souches *d'E. coli* utilisant le citrate comme seule source de carbone aboutissent a une coloration bleu du milieu.

-pas de virage (citrate-): les bactéries n'utilisant pas le citrate donc ne se cultivent pas, donc ils ne sont pas des *E. coli*.

➤ **Le milieu Kligler-Hajna**

Le milieu Hajna-Kligler est un milieu complexe, qui permet la recherche de plusieurs caractères biochimiques. Il est très utilisé dans l'identification des Enterobacteraceae.

▪ **Principe**

Le milieu Kligler-Hajna est un milieu différentiel de couleur rouge qui permet de confirmer la fermentation du glucose et du lactose, la production de gaz, et aussi la réduction des composés soufrés qui se traduit par la production de H₂S. Comme les milieux contiennent des sels de fer, la production de H₂S est révélée par la formation du sulfure métallique de couleur noire.

▪ **Technique**

A partir d'une culture purifiée de bacille Gram négatif oxydase négative, la pente du milieu Kligler est ensemencée en stries serrées et parallèles, et le culot par piqûre centrale, puis incubé 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'H₂S, il se produit un noircissement de la zone joignant le culot à la pente.

Si la souche produit du gaz, cela se traduit par la présence de bulles de gaz au niveau du culot.

- Les souches *d'E. coli* fermentent le glucose et le lactose contenu dans le milieu de culture, ce qui aboutit à une coloration jaune de culot et de la pente du milieu de culture.

❖ **Identification des entérobactéries par Galerie Api 20E:**

La suite des identifications a été réalisée sur les Api 20 E.

▪ **Principe:**

L'Api 20^E est un système standardisé pour l'identification des Entérobacteraceae et autres bacilles Gram- non fastidieux, elle comporte 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

Son principe est basé sur une fermentation et une oxydation de 10 sources de carbone et l'utilisation de 10 tests enzymatiques par Enterobacteraceae gram négatifs; L'Api 20^E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs. La lecture des réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

▪ **Technique**

a- Préparation de la Galerie:

La référence de la souche est inscrite d'abord dans la languette latérale de la boîte fermée. Une atmosphère humide est ensuite créée en répartissant 5ml d'eau distillée dans les alvéoles du fond de la Galerie qui est placée dans la boîte d'incubation.

b- Préparation de l'inoculum:

Réaliser une suspension bactérienne bien homogène par ensemencement d'une colonie provenant d'une culture jeune (18 à 24h) dans un tube stérile contenant 5ml d'eau physiologique stérile.

c- Inoculation de la Galerie:

Introduire la suspension dans la galerie: on crée l'anaérobiose en remplissant leurs cupules avec l'huile de paraffine; pour les tests CIT, VP, GEL, on remplit les tubes et les cupules et enfin pour les autres tests non soulignés on remplit uniquement les tubes. Ensuite, on met la boîte d'incubation dans l'étuve à 36° C, pendant 18 à 24h.

d- Lecture de la Galerie



En se référant au tableau de lecture. Les tests: TDA, IND et VP sont révélés après addition des réactifs: on ajoute une goutte du réactif JAMES pour le TDA et on ajoute une goutte des réactifs VP1 et VP2 pour les tests IND et VP.

e- Interprétation

La détermination du profil numérique se réalise sur une fiche de résultat, dont les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. La galerie Api 20^E comporte 20 tests; on réalise aussi la réaction de l'oxydase qui constituera le 21ème test, celle-ci est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive. On additionne à l'intérieur de chaque groupe, (chaque groupe correspond à 3 tests, ce qui fait un total de 7 groupes si on leur ajoute le test de l'oxydase), la somme des valeurs correspondantes aux réactions positives et on obtient 7 chiffres.

f-Identification

Elle est réalisée à partir de la base de données à l'aide du catalogue analytique, on recherche le profil numérique dans la liste des profils.

V. Outil d'analyse

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

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

Résultats

Sur une période de deux mois, 20 prélèvements ont été réalisés à partir des mains du personnel dans un restaurant. Au cours de cette étude un total de 49 isolats a été obtenu et identifié.

1-Niveau de contamination

Sur les 20 prélèvements analysés, 17 ont présenté des germes, alors que 3 prélèvements ont été exempts. Le résultat de cette étude est présenté dans la figure 1.

Le niveau de contamination microbiologique des mains du personnel a montré que le pourcentage de contamination des mains est de 85 %.

Cette contamination peut être essentiellement due à une mauvaise hygiène personnelle ou d'une contamination croisée.

On peut remonter les causes d'absence des germes dans 3 prélèvements à la pratique adéquate de personnel manipulateur des aliments (lavage des mains à la prise ou à la reprise du travail. après passage aux toilettes...)

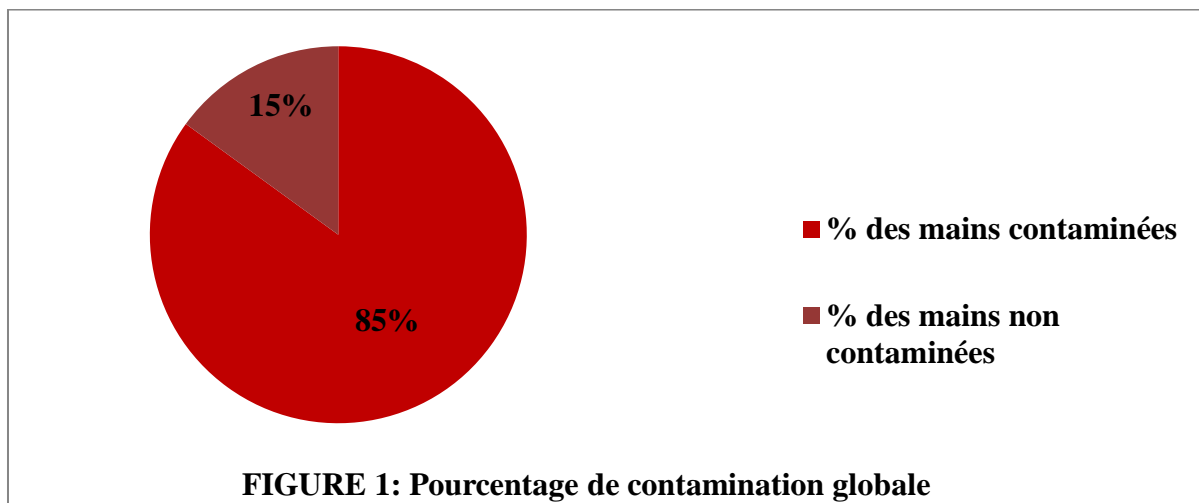


FIGURE 1: Pourcentage de contamination globale

2- Répartition des germes en fonction de la coloration Gram

Dans cette étude, 49 isolats ont été obtenus. La coloration Gram a montré une prédominance des bactéries Gram positif (63%), contre 37% pour les bactéries Gram négatif (Figure 2).

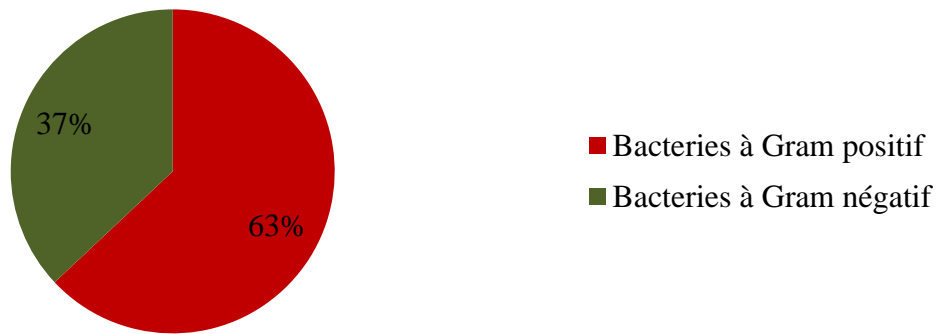


FIGURE 2: Distribution globale des germes isolé selon le Gram

3- Identification des bactéries Gram positif

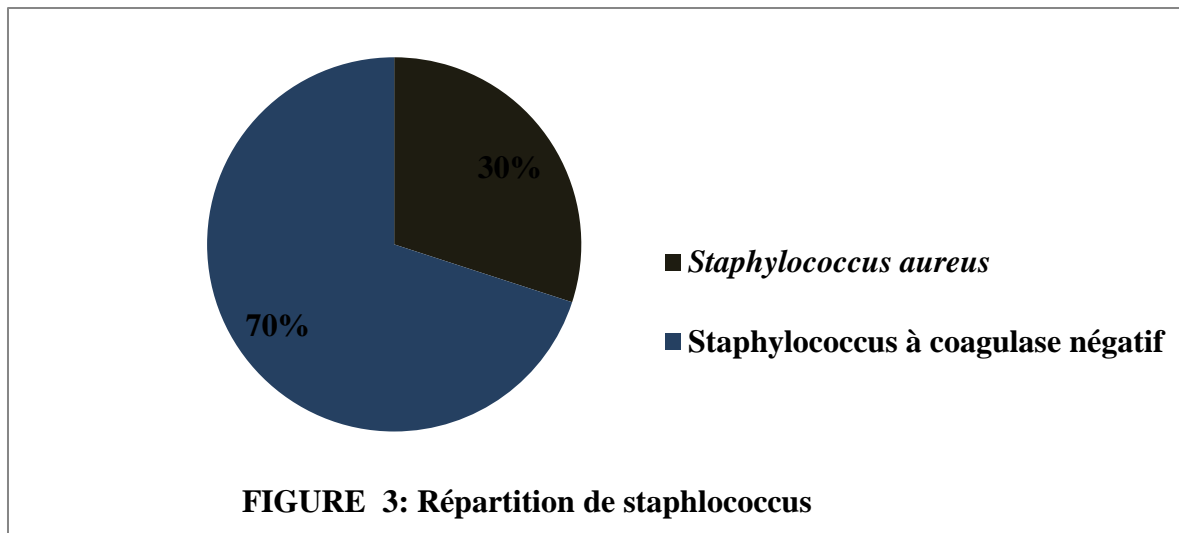
Un total de 31 isolats de bactéries Gram positif a été obtenu. L'identification biochimique de ces isolats a permis de distinguer deux profils :

- Des isolats à coagulase négative : *Staphylococcus* à coagulase négatif.
- Des isolats à coagulase positif : *Staphylococcus aureus*.

Tableau 1: Aspect des colonies et test coagulase des *Staphylococcus* identifiés

Souches identifiées	<i>Staphylococcus Aureus</i>	<i>Staphylococcus</i> a coagulase négative
Profil. Biochimique		
Aspect sur milieu Baird Parker	colonies grises noires, brillantes, bombées, entourées d'une zone claire	colonies grises noires entourées des halos opaques
Coagulase (Plasma de lapin)	Positive	Négative

Staphylococcus à coagulase négatif a été la plus dominante (70%) par rapport aux *Staphylococcus aureus* qui a été trouvé avec 30%. Le résultat est présenté dans la figure 3 :



Staphylococcus à coagulase négatif a été la plus dominante ce genre de bactéries est actuellement reconnu comme de véritables pathogènes. Les SCN peuvent également contenir des gènes d'entérotoxines et de nombreux cas d'intoxication alimentaire de SCN par ingestion des denrées contaminés sont rapportés, mais malgré ça *Staphylococcus aureus* est un pathogène opportuniste qui peut causer diverses maladies chez les humains. Cette bactérie est une des principales causes de toxi-infections alimentaires, résultant de la consommation d'aliments contaminés par des entérotoxines, D'autres affections cutanées peuvent être causées par ces toxines exfoliatives : phlyctènes, perte cutanée, papules, furoncles, impétigo, folliculite, abcès, piètre contrôle thermique, perte de liquide et infection secondaire. *S. aureus* peut également causer une fasciste nécrosante chez les sujets immunodéprimés, mais c'est très rare. La fasciste nécrosante est une maladie potentiellement mortelle qui s'accompagne d'une importante morbidité.

4- Identification des bactéries Gram négatif

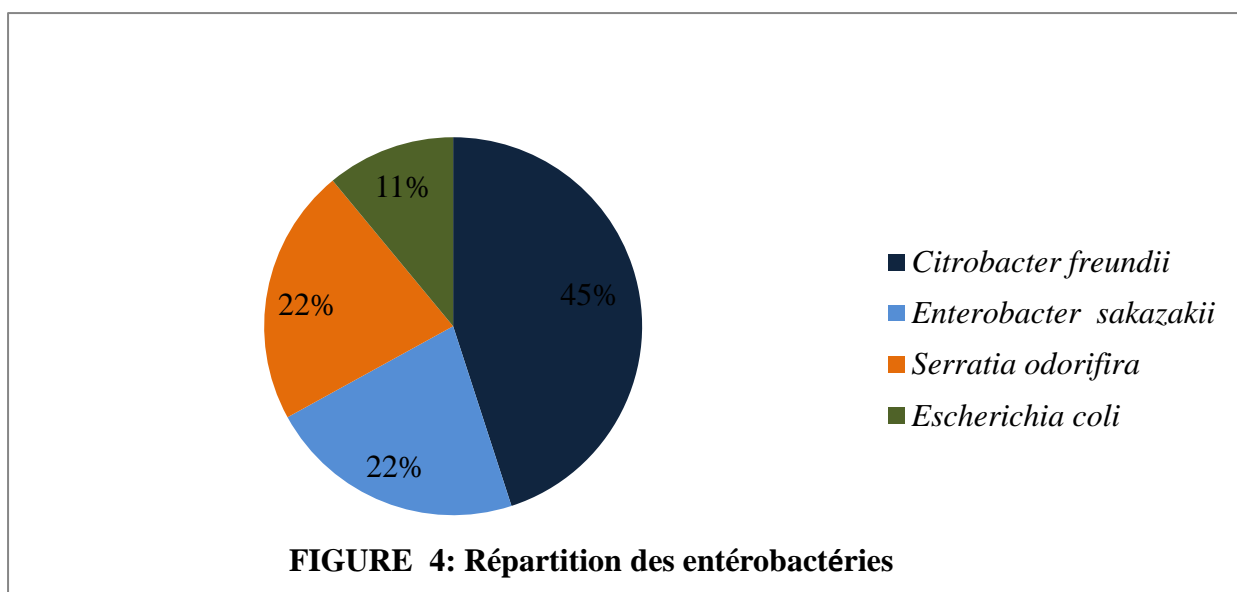
Un total de 18 isolats a été identifié. Les testes biochimiques et la Galerie Api20E ont permis l'obtention de 4 profils comme montré sur le tableau 2:

Tableau 2 : Profil biochimique des entérobactéries identifiées :

Profil. Biochimique Souches identifiées	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
<i>Serratia odorifera</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Enterobacter sakazakii</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

ONPG: Orthonitrophényl-β-galactoside; ADH: Arginine; dihydrolase; LDC: Lysine; Décarboxylase ; CIT: Citrate; TDA: Tryptophane désaminase; IND: Indole; VP: Voges-Proskauer; GEL : Gélatine; GLU : Glucose; MAN: Mannose; INO: inositol; SOR: Sorbitol; RHA: Rhamnose; SAC: Saccharose; MEL: Mélasse; AMY: Amygdaline; ARA: Arabinose; OX: Oxydase.

L'identification biochimique a révélé une prédominance de *Citrobacter freundii* (45%), suivi d'*Enterobacter sakazakii* (22%) et les *Serratia odorifera* (22%) et *Escherichia coli* (11%). La figure 4 représente les résultats obtenus.



Cependant *Escherichia coli* possède le pouvoir le plus pathogène qu'il exprime dans certaines circonstances (pathogène opportuniste) :

Par pénétration par voie urétrale ascendante (contiguïté) dans l'arbre urinaire, à l'origine de cystite (infection limitée à la vessie, sans fièvre) et de pyélonéphrite (infection du rein avec fièvre et bactériémie) ou par essaimage à point de départ digestif : cholécystite suppurée, péritonite, septicémie.

Mais les autres bactéries possèdent aussi un pouvoir pathogène :

_ *Citrobacter freundii* s'agit d'une bactérie opportuniste qui peuvent provoquer des infections du système nerveux central (SNC) chez les nourrissons, notamment des méningites susceptibles d'entraîner la formation d'abcès cérébraux.

_ *Enterobacter sakazakii* est considéré comme un pathogène néonatal et sa présence dans les produits d'alimentation infantile, peut occasionner des méningites et autres graves infections, principalement chez les nouveau-nés

-*Serratia odorifera* souches sont responsables d'infections nosocomiales (infections urinaires, suppurations diverses, septicémies, endocardites...).

Discussion

Parmi les facteurs de risque des maladies d'origine alimentaire ou Toxi-infection alimentaires (TIAC), les pratiques de manipulation inappropriées des aliments occupent une place importante [19]. En effet, le manque d'hygiène personnelle chez les manipulateurs d'aliments est l'une des pratiques les plus fréquemment rapportées qui contribuent aux maladies d'origine alimentaire [20].

Dans ce contexte, nous avons mené une série des contrôles microbiologiques sur 20 prélèvements des mains des manipulateurs dans un restaurant.

Nous avons noté la présence des germes dans 17 cas, ce qui correspond à un pourcentage de contamination de 85%. En effet, Van Tonder et al ont noté que 90,63% des mains analysées étaient porteurs des certaines bactéries pathogènes. Ce pourcentage qui est très important peut être reporté à un manque d'hygiène et pourrait tirer la sonnette d'alarme sur le mode d'entretien appliqué aux restaurants [21]. Shojaei et al ont noté que pour avoir une réduction de la contamination des mains, une intervention simple, qui comprenait une éducation sanitaire sur le lavage strict après chaque manipulation ou utilisation des sanitaires, est impérative pour que l'élimination des microorganismes pathogènes transitoires soit assurée [22].

L'identification des germes isolés des mains a montré la prédominance des bactéries à Gram positif par rapport aux bactéries à Gram négatif (soit un pourcentage de 63% des Grams positifs et de 37% des Grams négatifs). Notre résultat concorde avec les résultats trouvés par Salehian et al qui ont noté la prédominance des bactéries à Gram positif (46%) par rapport aux bactéries à Gram négatif (29,2 %) [23]. Y'anez et al ont trouvé 53,3% des bactéries à Gram positif et 22,8% des bactéries à Gram négatif [24].

L'identification biochimique des bactéries à Gram positif a montré une prédominance de *staphylocoque* à coagulase négative (70%) par rapport au *Staphylococcus aureus* (30 %). Nasrolahei et al ont détecté *Staphylococcus aureus* avec un pourcentage de 46% [23]. *Staphylococcus aureus* est très fréquent à l'état commensal et pathogène, il peut devenir pathogène et être responsable d'infections cutanées : furoncles, panaris, abcès, impétigo... Et de certaines infections ORL(oto-rhino-laryngologie): angines, otites, sinusites... il est impliqué aussi dans les infections nosocomiales [23]. Nasrolahei et al avait noté aussi que les manipulateurs de nourriture peuvent facilement contaminer les aliments avec *S. aureus*.

Même si la cuisson complète de la nourriture juste avant la consommation élimine le risque de nombreuses bactéries [23], Jablason et al; Kishimoto et al ont démontré que la protection contre certains pathogènes comme les *Staphylococcus* est crucial [25, 26].

En outre, les produits, habituellement consommés à froid ou non cuits ou sans cuisson supplémentaire, tels que les crèmes, les légumes, les fruits, les salades etc... peuvent être contaminés par les manipulateurs et peuvent présenter un vrai danger pour le consommateur [27]. Le portage des gants est donc important lors des manipulations.

L'identification biochimique des bactéries à Gram négatif a montré une prédominance de *Citrobacter freundii* (45%), suivi par *Enterobacter sakazakii* (22%) et *Serratia odorifera* (22%), *Escherichia coli* est isolé avec 11%.

Ces résultats ne concordent pas avec les résultats trouvés par Nasrolahei et al qui ont noté une prédominance d'*Escherichia coli* (29,2%) [23]. Cependant *Escherichia coli* peut aussi devenir un agent pathogène responsable de différents types d'infections : infections urinaires, diarrhées, cholécystites [23]. Il peut aussi être impliqué dans des infections nosocomiales. Néanmoins, pour notre cas, les coliformes fécaux ou coliformes thermo-tolérants peuvent être considérés comme des bactéries tests d'hygiène générale et plus particulièrement comme un indice de contamination fécale. On suppose qu'il existe un manque d'hygiène, un manque et/ou une inefficacité des opérations de nettoyage et de désinfection [28, 29].

Conclusions, Recommandations et Perspectives

Au terme de ce travail, les résultats des analyses microbiologiques ont révélé la présence des entérobactéries en particulier *Escherichia coli*, et de staphylocoques : *Staphylococcus aureus* et SCN. Cette contamination est due essentiellement à un manque des bonnes pratiques d'hygiène.

Cette étude a permis donc de mettre en évidence l'importance du contrôle microbiologique dans le domaine de restauration, et de s'avoir le degré de contamination des mains de manipulateur des aliments.

Compte tenu du rôle central de l'hygiène des mains en restauration collective, des améliorations peuvent être apportées à savoir la formation du personnel, des protocoles et des procédures peuvent être aussi rédigées par exemple:

- ✚ Formation de personnel sur les règles de sécurité, méthode et mode d'emploi qui doivent être pratiqués dans la restauration collective.
- ✚ Lavage hygiénique des mains avant et après la manipulation des aliments
- ✚ portage des gants pendant l'exercice des différentes activités.

Référence bibliographique

[1] Zhang, Y et al., (2014). Self-reported hand washing behaviors and food borne illness: a propensity score matching approach. *Journal of Food Protection*, 77. (3), 352-358.

[2] Allwood, P et al., (2004). Hand washing compliance among retail food establishment workers in Minnesota. *Journal of food protection*, 67. (12), 2825-2828.

[3] Gould, D et al., (2008). Hand hygiene technique. *Nursing standard*, 22. (34), 42-46.

[6] Walker, E et al., (2003). Hazard analysis critical control point and prerequisite programme implementation in small and medium size food business food control. 169–174.

[7] McSwane, D et al., (2003). *Essentials of food safety and sanitation*. New Jersey: Pearson Education, 23. (4), 169–196.

[9] Semprebom, K et al., (2005). Analyse de la structure physique, opérationnelle et organisationnelle d'une Unité de Alimentation et Nutrition d'une Institution Geriátrica, Maringá. *Nutrire*, 30. (12), 53-65.

[13] Gassama, D (2002). Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale dans les filets de sole : étude comparative des méthodes d'analyse et des résultats de deux laboratoires, Université cheikh anta diop de dakar, 46pages.

[14] Elmund, GK et al., (1999). Comparison of *Escherichia coli* total coliform and fecal coliform populations as indicators of wastewater treatment efficiency. *Water Environ*, 71. (8), 332-339.

[15] Edberg, SC et al., (2000) *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology*, 88. (25), 106S-116S.

[16] Williams, RE et al., (1963). Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacterial Rev*, 16. (10) 56-71.

[17] Wertheim, HF et al., (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*, 83. (19), 751-62.

[18] Greig, JD et al., (2007). Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of food borne disease. Description of the problem, methods, and agents involved, 17. (5) 52-61.

[19] Clayton, D et al., (2002). Food handlers beliefs and self-reported practices. *International Journal of Environmental Health Research*, 12. 25–39.

[20] Cogan, T et al., (2002). Achieving hygiene in the domestic kitchen: The effectiveness of commonly used cleaning procedures. *Journal of Applied Microbiology*, 92. 885–892.

[21] Van Tonder, I et al., (2005). The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. *Food Control*, 18. (12), 326–332.

[22] Shojaei, H et al., (2006). Efficacy of simple hand-washing in reduction of microbial hand contamination of Iranian food handlers. *Food Research International*, 39.(5), 525–529.

[23] Salehian, M et al., (2016). Bacterial assessment of food handlers in Sari City, Mazandaran Province, north of Iran. *Journal of Infection and Public Health*, **xxx**. xxx-xxx

[24] Y´anez, N et al., (2016). Evaluation of Prerequisite Programs Implementation and Hygiene Practices at Social Food Services through Audits and Microbiological Surveillance. *Food Microbiology & Safety*, 81.(16), 231-269.

[25] Jablasone, J et al., (2005). Interactions of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* plants cultivated in a *gnotobiotic* system. *International Journal of Food Microbiology*, 99.(1), 7–18.

[26] Kishimoto, M et al., (2004). Ribotyping and a study of transmission of *Staphylococcus aureus* collected from food preparation facilities. *Journal of Food Protection*, 67.(6), 1116–1122.

[27] Castro, A et al.,(2016). Food handlers as potential sources of dissemination of virulent strains of *Staphylococcus aureus* in the community. *Journal of Infection and Public Health*, 9. (2), 153–160.

[28] Lues, R et al., (2007). ‘The Occurrence of Indicator Bacteria on Hands and Aprons of Food Handlers in the Delicatessen Sections of a Retail Group’, *Food Control*, 18.(4), 326–32.

[29] Abouda, Yahia et al., Evaluation de La Qualité Bactériologique Des Aliments Servis à l’hôpital de Sousse (Tunisie) Entre 2005 et 2010’, *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 28.(3), 164–70.

Webographie

[4] Institut nationale de recherche et de santé (2015).

www.umih.fr/export/sites/default/.content/media/pdf/guides-inrs/ed6075.pdf. (Consulté le 38/03/2017).

[5] Centre de gestion de l’Oise de la formation publique territoriale.

http://www.cdg60.com/sites/default/files/guide_bonnes_pratiques__restauration_collective_1999. (Consulté le 24/04/2017).

[8] L’afnor. www.boutiqueformation.afnor.org//qualite/methodes-et-outils-de.../c0075-2017. (Consulté le 26/04/2017).

[10] Centre de coordination de la lutte contre les infections associées aux soins. *Hygiène des mains.com*, guide de bonnes pratiques, décembre 2001. (Consulté le 26/04/2017).

[11] Fleurette J (1995). Les flores microbiennes commensales de la peau et de la muqueuse
antisepsie et désinfection

socialsante.gouv.fr/.../Guide_de_bonnes_pratiques_pour_la_prevention_des_infection.

(Consulté le 19/04/2017).