

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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

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



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Biologie

Spécialité : Santé, Eau et environnement

11/4 97

570. 235

Thème

Les Infections Nosocomiales

Présenté par : Amiar Manel
Bendjama Ibtissem

Devant le jury composé de :

President : Mr. Atoussi Sadek (M.A)
Examinateur : Mr. Djakoun Mohamed (M.A)
Encadreur : Mr. Houhamdi Moussa(Pr)

Juin 2011

Remerciement

Tout d'abord nous tenons à exprimer nos gratitude à « Dieu » qui nous donné le courage et la force de mener à bien ce modeste travail

Nos vifs remerciements s'adressent à notre encadreur monsieur Kouhnamé Moussa: professeur au département de biologie à l'université de Guelma; qui a accepté d'orienter et guider ce mémoire;

Nos remerciements s'adressent ainsi à monsieur Djekoun maître de conférence au département de biologie à l'université de Guelma d'avoir honneur la présidence du jury

Nos exprimons notre reconnaissance à madame Tourche Assma maître assistant au département de biologie à l'université de Guelma; d'avoir examiné ce mémoire

Sans oublier les personnels de l'hôpital: El-Hakim-Okbi et les personnels de la direction de la santé de Guelma;

En fin. Nous tenons à remercier tout le personnel du département de biologie de l'université de 08 Mai 1945 Guelma.

Sommaire

Remerciement	
Liste de tableau	
Liste de figure	
Liste d'abréviation	
Introduction	1
I. partie bibliographique	
Généralités sur les infections nosocomiales	
1-Définition	2
2-chaine de l'infection.....	2
2-1-Réservoirs (source)	2
• Réservoir humain	2
• L'environnement	3
2-2-Les vecteurs.....	3
• Les modes de transmissions	3
a)- Auto-infection	4
b)- Hétéro infection	4
c)- Xéno-infection	4
d)- Exo-infection	4
2-3-l'hôte.....	5
➤ La pénétration.....	5
• Les voies d'entrée.....	5
• La dose administrée.....	5
➤ L'état de réceptivité.....	5
3-les principales infections nosocomiales	6
3-1- Infection urinaire.....	6
3-2-Les infections postopératoires.....	6
3-3-Les infections respiratoires	7
3-4-les infections sur cathéter.....	8
3-5-septicémies.....	8
3-6-Autre infections nosocomiales.....	8
4-Facteurs de risque infectieux.....	9
A-Les facteurs liés au malade.....	9
B-Les facteurs liés aux techniques diagnostiques et thérapeutiques.....	10
5-Les principaux micro-organismes responsables d'LN	10
5-1-Les champignons	10
• Aspergillus.....	10
• Candida.....	11
5-2-Les virus.....	11
5-3-Les parasites.....	12
5-4-Les bactéries.....	12
5-4-1- Les bactéries Gram négatif	12
5-4-2-Les bactéries Gram positif.....	14

6-Mécanisme d'action et résistance bactérienne aux antibiotiques.....	15
6-1-Mécanisme d'action.....	15
6-2-résistance bactérienne.....	15
6-3-BMR impliquées dans les infections nosocomiales.....	16
6-4-type de résistance.....	16
a- La résistance naturelle.....	17
b- La résistance acquise.....	17
7-La prévention des infections nosocomiales.....	18
7-1-Le respect strict des règles d'hygiène.....	18
7-2-La stérilisation, la désinfection et l'antisepsie.....	20
7-3-L'antibioprophylaxie.....	21

II. Partie pratique

Chapitre 1: Matériels et méthodes

1-cadre d'étude.....	22
2-prélèvement et l'enrichissement.....	22
2-1-prélèvement de pus.....	22
2-2-prélèvement à partir des surfaces.....	22
2-3.l'enrichissement.....	23
2-4-prélèvement a partir de l'atmosphère hospitaliere.....	23
3-Recherche et identification des germes.....	24
3-1-l'isolement.....	25
3-2-Méthode d'identification.....	25
3-2-1-L'identification macroscopique.....	25
3-2-2-identification microscopiques.....	25
3-2-3-Etudes des caractères biochimiques.....	27
❖ Les entérobactéries.....	27
A- La galerie biochimique classique.....	27
B- La galerie API 20E.....	28
❖ les pseudomonas.....	30
A- Test d'oxydase.....	30
B- ensemencement de milieux sélectif.....	30
❖ Les staphylocoques.....	31
A- Test staphylocoagulase.....	31
B- Test catalase.....	32
C- Mannitol.....	32
D- La galerie API Staph.....	33
4-Antibiogramme.....	34
A- Intérêt de l'examen.....	34
B- Principe général.....	34
C- Préparation de l'inoculum.....	34
D- Ensemencement.....	35
E- Application des disques d'antibiotiques.....	35

F- Incubation.....	35
G- Lecture.....	35

Chapitre 2 : résultats et discussions

1--Résultats de l'enrichissement.....	36
2- Aspect macroscopique des colonies après l'isolement.....	36
3- Examen microscopique.....	39
4- Identifications biochimiques.....	41
4-1-pour les entérobactéries.....	41
➤ Résultat de la Galerie Api 20	41
➤ Résultats des galeries biochimiques classiques.....	41
4-2-pour les staphylocoques.....	43
➤ Résultat de la galerie Api Staph	43
➤ Résultat de la fermentation du mannitol et le test staphylocoagulase et le test catalase.....	44
4-3- pour les <i>pseudomonas</i>	46
➤ Résultats de l'oxydase et des milieux sélectifs.....	46
5-Antibiogram des germes isolés	47
-Conclusion	
-Résumé	
-Abstrat	
ملخص	

Produced with Scantopdf

Listes des figures

N°de figure	Titre	page
Figure N°01	Transmission de l'infection nosocomiale	5
Figure N°02	répartitions d'IN selon les types d'infections	9
Figure N°03	les mécanismes de résistance des BMR aux antibiotiques	16
Figure N°04	Schéma représentant les sites et les modes de prélèvement	23
Figure N°05	schéma explicatif le protocole de notre travail	24
Figure N°06	Galerie Api 20E	29
Figure N°07	Fiches technique des résultats de l'Api 20E	30
Figure N°08	Lecture de l'oxydase	30
Figure N°09	lecture des milieux sélectifs de <i>pseudomonas</i> après l'incubation	31
Figure N°10	Lecture de la coagulase	32
Figure N°11	lecture de la catalase	32
Figure N°12	lecture de mannitol	33
Figure N°13	Galerie Api Staph	34
Figure N°14	Résultat de l'enrichissement	36
Figure N°15	Les colonies obtenues à partir de l'air	36
Figure N°16	culture sur Chapman à partir de l'échantillon (2)	38
Figure N°17	culture sur G.N à partir de l'échantillon (2)	38
Figure N°18	culture sur Mac à partir de l'échantillon (2)	38
Figure N°19	culture sur Chapman à partir de l'échantillon (7)	38
Figure N°20	culture sur G.N à partir de l'échantillon(8)	38
Figure N°21	Observation microscopique des Bacilles Gram(+)	40
Figure N°22	Observation microscopique des cocci Gram (+)	40
Figure N°23	Observation microscopique des Bacille à Gram (-)	40
Figure N°24	Observation microscopique des champignons	40
Figure N°25	Les galeries Api 20 E après l'incubation à partir de l'échantillon (2) et (6)	41
Figure N°26	Galerie biochimique classique pour <i>Providencia</i> à partir de l'échantillon(1)	42
Figure N°27	Galerie biochimique classique pour <i>E. coli</i> à partir de l'échantillon(2)	42
Figure N°28	Galerie biochimique classique pour <i>Citrobacter freundii</i> à partir de l'échantillon (4)	43
Figure N°29	Galerie biochimique classique pou <i>Acénitobacter</i> r à partir de	43

	l'échantillon(7)	
Figure N°30	Galerie Api Staph après l'incubation à partir de l'échantillon (8)	44
Figure N°31	le test mannitol de l'échantillon (2)	45
Figure N°32	le test mannitol de l'échantillon (7)	45
Figure N°33	le test Coagulase de l'échantillon (2)	45
Figure N°34	le test coagulase de l'échantillon (7)	45
Figure N°35	le test catalase de l'échantillon(3)	45
Figure N°36	le test Oxydase de l'échantillon (5)	46
Figure N°37	test King A après l'incubation	46

Liste des tableaux

N° de tableaux	Titre	page
Tableau N° 01	principaux virus responsables des infections nosocomiales virales	12
Tableau N°02	principaux bactéries responsables d'infections nosocomiales selon leur fréquence relative, localisation des infections, réservoirs, et le mode de transmission	15
Tableau N°03	Les différentes familles d'antibiotiques activités, mécanismes d'action, et de résistance	18
Tableau N°04	numéro des sites et les services des prélèvements effectués	23
Tableau N°05	les buts et les méthodes d'examen microscopiques	26
Tableau N°06	Composition de la galerie biochimique classique	27
Tableau N°07	Les caractères différentiels des Entérobactéries	28
Tableau N°08	caractéristiques des souches de Staphylocoque les plus fréquemment isolées	33
Tableau N°09	Résultat de l'isolement des différents prélèvements effectués	37
Tableau N°10	Résultat de l'examen microscopique à l'état frais et après coloration	39
Tableau N°11	résultat de la galerie API E	
Tableau N°12	résultats des galeries biochimiques classiques	42
Tableau N°13	résultat de la galerie API Staph	43
Tableau N°14	Identification des staphylocoques à partir des différents prélèvements	44
Tableau N°15	identification des <i>pseudomonas aeruginosa</i>	46

Liste d'abréviations

BGN : Bacilles à Gram négatif

BLES : *Entérobactéries* productrices de β lactamase a spectre élargi

BMR : Bactéries multi résistantes

Chap. : Chapman

DMI : Dose minimale infectante

E : *Escherichia*

GN : Gélose nutritive

IN : Infections nosocomiales

INF : Infections nosocomiales fongiques

MC: Mac Conkey

MI: Millilitre

Mm: Millimètre

PARC : *pseudomonas aeruginosa* résistant a céftazidime

PH : Potentielle hydrique

RM : Rouge de méthyle

S : Staphylocoque

SARM : *staphylococcus* résistant à la méticilline

SHA : solution hydro-alcoolique

UV : Ultraviolet

VHB : Virus de l'hépatite B

VHC : Virus de l'hépatite C

VRS : Virus respiratoire syncitial

Produced with ScanTOPDF

Introduction

Produced with ScantOPDF

Introduction

N'importe quel malade, quel que soit son statut immunitaire peut être infecté dans le milieu hospitalier, même si le risque d'infection varie d'un établissement à l'autre, mais il reste toujours possible et effroyable.

Les infections nosocomiales (IN) représentent vraisemblablement un problème de santé publique majeur, elles génèrent une morbidité et une mortalité importante et un surcoût économique.

Les environnements sanitaires sont, bien évidemment, les plus exposés au risque d'infections croisées par la présence de conditions favorisant la prolifération et la diffusion de micro-organismes pathogènes (les virus, les bactéries, les parasites et les champignons). La microflore hospitalière compte une grande variété d'espèces bactérienne qui ne cessent de changer au cours du temps.

Nous pensons que les maladies nosocomiales constituent un objet intéressant pour l'étude de l'image de l'hôpital telle qu'elle est maintenant véhiculée dans notre société et, de manière plus générale, de la perception et des attentes des individus face au système de santé.

La gravité des infections peut être exacerbée par antibiotiques administrés sans raison valable sont la cause principale des infections nosocomiales. En effet, ils rendent certains micro-organismes résistants et contribuent à la sélection des souches hospitalières multirésistantes qui peuvent se transmettre d'un patient à l'autre.

Le but de notre travail est l'isolement et l'identification des microorganismes de l'environnement hospitalier et l'étude des sensibilités des souches aux antibiotiques.

Partie bibliographique

Produced with Scantopdf

1-Définition :

Une infection est dite « nosocomiale » lorsqu'elle est acquise ou contractée à l'hôpital ou tout établissement de soins et qu'elle apparaît après un délai de 48 heures après l'admission. Pour les infections du site opératoire, on considère comme nosocomiales les infections survenues dans les 30 jours suivant l'intervention, ou s'il y'a mise en place d'une prothèse ou d'un implant, dans l'année qui suit l'intervention. le mot nosocomiale vient du grec (nosos): maladie et (komien):soigner et par extension du latin nosocomiaux :hôpital.[1] Les mots (contractée al 'hôpital) excluent les malades existants ou en incubation à l'entrée ils incluent certaines infections s'exprimant après la sortie, la victime peut être non seulement le malade mais éventuellement le personnel hospitalier. [2]

Cette infection est caractérisée par une prolifération microbienne par conséquent des réactions cellulaires tissulaires ou générale; se traduisant le plus souvent par syndrome.L'infection nosocomiale concerne les patients mais aussi les personnels qui travaillent au contact de malades contagieux. .(Mergoude , 2004).

2-Chaine de l'infection :

Pour que l'infection se développe chez un malade à l'hôpital il faut que trois éléments se réunissent :

- Une source d'infection autrement dit le milieu contaminé par des microorganismes.
- un vecteur transporteur des germes de la source vers l'hôte (malade).
- un malade ayant une réceptivité à l'infection du fait des soins qu'il reçoit. (Otmane, 2003)

2-1-Réservoirs (source):

- **Réservoir :**
- Site où le micro-organisme se maintient et se multiplie.

- **Source :**
- Lieu de contact entre le micro-organisme et l'hôte.

- **Réservoir humain :**

Il est triple :

1. Le malade lui-même est porteur de germes. L'infection est d'origine endogène. Les réservoirs endogènes peuvent être primaires (flore commensale) ou secondaires (flore commensale hospitalière).

Lorsque le germe responsable provient de la flore saprophyte du malade et devient pathogène pour diverses raisons :

- ❖ diminution des défenses de l'hôte.
- ❖ sélection de souches résistantes par une antibiothérapie prolongée et à large spectre.
- ❖ contamination par un acte médical ou chirurgical.

2. Les autres malades, parmi lesquels se trouvent des malades infectés, constituent un risque pour chaque patient hospitalisé. La contamination peut être directe ou indirecte, par l'intermédiaire du personnel soignant (médecin, infirmier, manipulateur)

3. les visiteurs : ce potentiel n'est pas à dédaigner (Otmane, 2003).

- **L'environnement :**

L'environnement hospitalier joue le rôle de réservoir de germes :

- rarement pathogène pour l'homme.
- souvent réservoir de germes opportunistes qui se développent sur terrain déficient.
- très fréquemment réservoir temporaire de germes rejetés par l'homme. Pour y subsister, il leur faut alors des conditions favorables de température (germes psychrophiles, mésophiles ou thermophiles), d'humidité et de milieu nutritif. Certains, dans l'environnement sont très résistants (entérobactéries, staphylocoque), ou y survivent aisément (*Pseudomonas*, *Serratia*).

Exemple de réservoirs temporaires : les tenues professionnelles, matériel médico-chirurgical, l'air, l'eau. [3]

2-2-Les vecteurs :

La transmission peut se faire par contact direct ou indirect, par l'intermédiaire de vecteurs tels que :

- les mains du personnel, médical et infirmiers.
- les équipements: le linge, la literie.
- le matériel courant : aiguilles, sondes vésicales, cathéters; à cet égard, l'emploi de matériel à usage unique diminue considérablement les risques.
- le matériel difficile à stériliser : appareils endoscopiques, respirateurs,
- les aliments ,l'eau et l'air.(Otmane, 2003).

- **Les modes de transmissions :**

On distingue plusieurs formes d'infections nosocomiales qui relèvent des modes de transmission déférente :

a)- Auto-infection :

C'est lorsque le malade s'infecte soit par ses propres germes appartiennent à sa microflore originale soit à partir de l'environnement immédiat (surface de la peau, vêtement, lit). Ces infections sont dues généralement aux germes saprophytes qui deviennent pathogènes à la suite d'une antibiothérapie itérative ou d'un traitement immunosuppresseur. Les complications infectieuses respiratoires liées au décubitus et ses conséquences sur le drainage des voies aériennes peuvent être des auto-infections. (samou 2004).

b)- Hétéro infection :

On parle d'hétéro-infection lorsqu'un agent infectieux est transporté d'un malade à un autre provoquant une infection dite croisée ou hétéro-infection.

L'agent infectieux est rarement transmis par contact direct ou par voie aérienne.

Le plus souvent le vecteur est le personnel soignant par ses mains, et ou ses instruments de travail. On parle d'infection manu portée ou d'infection transmise par le matériel d'exploration ou de soin. C'est le mode de contamination majeure lors de nombreuses épidémies et probablement le plus sensible aux mesures prophylactiques. (Samou, 2004)

c)- Xéno-infection :

Ce sont des infections qui sévissent sous forme endémique ou épidémique dans la population extrahospitalière. Les agents infectieux sont importés à l'hôpital par les malades, le personnel soignant, ou les visiteurs qui en sont atteints ou qui sont en phase d'incubation. Ils se transmettent par voie aérienne, par contact direct ou indirect et trouvent à l'hôpital des victimes particulièrement réceptives et des conditions de transmission facilitées. Lorsque la maladie infectieuse est le seul motif d'hospitalisation, les mesures

immédiates d'isolement peuvent être prises. Mais dans certains cas l'infection est indépendante du motif d'hospitalisation. (Samou, 2004)

d)- Exo-infection :

Cette infection est liée à des avaries techniques (stérilisation inefficace, filtre à air non stérile, eau polluée). Les matériaux à usage paramédical ou domestique sont utilisés auprès des malades. Ils sont susceptibles d'être contaminés et peuvent ainsi provoquer des infections nosocomiales souvent épidémiques. (samou 2004)

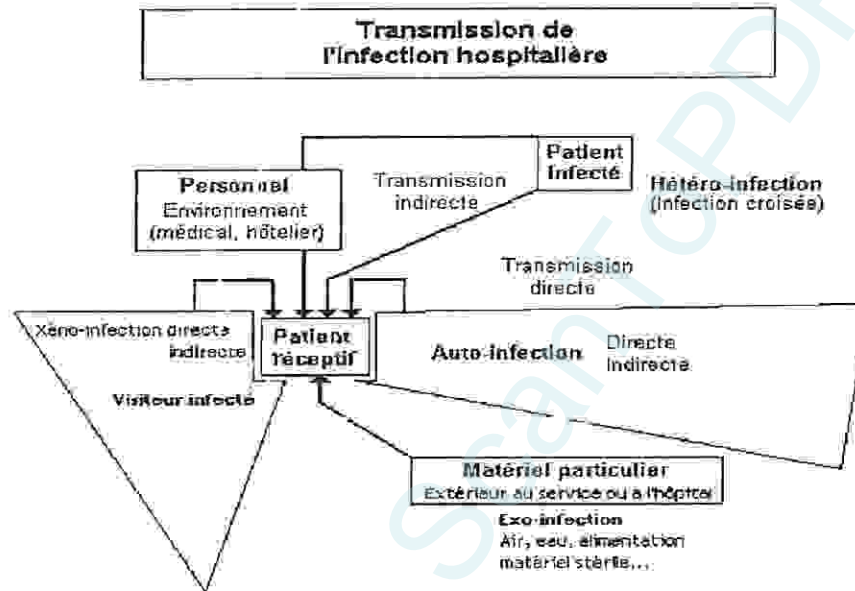


Figure 01 : Transmission de l'infection nosocomiale. [4]

2-3-l'hôte :

Il faut considérer deux éléments :

➤ La pénétration

• Les voies d'entrée :

- la voie respiratoire est la principale dans les infections pulmonaires.
- la voie sanguine.
- la voie cutané-muqueuse par les excoriations, les plaies.
- la voie entérique ou digestive, par les aliments ou les mains.
- la voie génitale.
- la voie parentérale.

• La dose administrée :

- pour qu'il y ait infection, une dose minimale infectante (D.M.I) est nécessaire elle est élevée pour les bactéries (de l'ordre de 1 million) et faible pour les virus (dizaine ou centaine)
- la D.M.I. varie en fonction de la voie de pénétration (plus faible par voie sanguine) et de l'état immunitaire du malade.

➤ L'état de réceptivité dépend :

- des défenses et donc de l'état d'immunité du patient (en centres, on rencontre de plus en plus de malades fragiles immunodéprimés, âgés),

- des facteurs de risque présentés par l'individu (Broncho-pneumopathie Chronique Obstructive, asthme, intervention, cancer). [5]

3-les principales infections nosocomiales :

On distingue cinq types d'infections nosocomiales:

3-1- Infection urinaire :

Les infections urinaires contractées à l'hôpital sont déclenchées dans près de 75% des cas par un catharisme des voies urinaires et par la mise en place d'une sonde à demeure. Dans le cas d'un cathétérisme isolé, les bactéries de l'urètre antérieur ou celles des mains de l'opérateur peuvent être introduite directement dans la vessie.

Pour la mise en place des sondes à demeure, même lorsque le geste opératoire a été accompli rigoureusement, on estime que près de 25% des personnes vont présenter une infection urinaire dans les deux premières semaines suivant le sondage avec un maximum de fréquence entre le 5^{em} et les 11^{em} jours (Diakaria, 2001)

elles sont beaucoup plus fréquentes chez les femmes, les vieillards et l'immunodéprimé. (Mergoude, 2004)

Les germes les plus fréquents sont :

Bacilles Gram négatif : *Escherichia coli*, *proteus*, *Klebsiella*, *staphylococcus*

(Stamm, 1986)

a-infection urinaire: Bactériurie asymptomatique :

Une uroculture quantitative positive ($\geq 10^5$ micro-organismes/ml) si le patient a été sondé (sondage vésical à demeure) pendant la semaine précédant le prélèvement. (Comite, 1997).

b- infection urinaire : Bactériurie symptomatique :

Fièvre (>38 °C) sans autre localisation infectieuse et/ou envie impérieuse et/ou dysurie et/ou pollakiurie et/ou tension des sous pubienne (Jepseno, 1986).

3-2-Les infections postopératoires:

Les infections bactériennes provoquées par l'acte opératoire représentent près de 23% des infections nosocomiales (Dikaria, 2001).

Les éléments permettant le diagnostic d'infection de la plaie opératoire sont fonction de la localisation de l'infection. Les bactéries responsables sont les cocci gram négatif .

- **Infection superficielle :**

C'est une infection survenant dans les trente (30) jours suivant l'intervention, et affectant les tissus sous-cutanés ou situés au-dessus de l'aponévrose et la peau ou les muqueuses. Elle est diagnostiquée par un écoulement purulent de l'incision ou du drain ou par

l'isolement d'un germe à la culture de l'écoulement d'une plaie fermée ou par une ouverture par le chirurgien en présence de l'un des signes suivants : douleur ou sensibilité à la palpation, tuméfaction localisée, rougeur, chaleur (sauf si la culture du prélèvement de la plaie est négative). Le diagnostic est établi par le médecin ou le chirurgien. (Samou, 2004).

- **Infection profonde :**

C'est une infection qui survient dans les trente (30) jours suivant l'intervention, ou dans l'année, s'il y a eu mise en place d'un matériel étranger, intéressant les tissus ou espaces situés au niveau ou au dessous de l'aponévrose. Elle se traduit par un écoulement purulent

provenant d'un drain sous aponévrotique ou par la déhiscence spontanée de la plaie, ou l'existence d'un abcès ou d'autres signes d'infection observés lors d'une intervention chirurgicale ou d'un examen histologique, ou par la nécessité pour le chirurgien de ré-intervenir en cas de fièvre $>38^{\circ}\text{C}$, douleur localisée et sensibilité à la palpation. Le diagnostic d'infection est établi par le chirurgien. (Diakaria, 2001).

• **Infection de l'organe ou du site:**

Elle survient elle aussi dans les trente (30) jours suivant l'intervention, ou dans l'année, s'il y a eu mise en place d'un matériel étranger, impliquant les organes ou espaces (autres que l'incision) ouverts ou manipulés durant l'intervention, authentifiée par la présence de pus, ou d'un germe isolé au niveau de l'organe ou du site, ou de signes évidents d'infection impliquant l'organe ou le site ou l'espace, observés lors d'une ré intervention chirurgicale ou d'un examen histopathologique. (Samou2004).

3-3-Les infections respiratoires:

Les infections respiratoires sont surtout observées dans les unités de réanimation ou de soins intensifs représentant près de 15% des infections, les pneumonies nosocomiales se distinguent des localisations précédemment citées par la forte mortalité qu'elles entraînent (20 à 50%).

Les principaux microorganismes répertoriés sont les bacilles à Gram négatif (BGN) de près de 60% et les staphylocoque de 40% de pneumonies nosocomiales. (Mergoude, 2004).

3-4-les infections sur cathéter :

La technique de la pose et la localisation du cathéter jouent un rôle important sur la fréquence des infections les cathéters posés par voie percutanée sont moins infectés que les cathéters posés après abord chirurgical Les cathéters périphériques sont plus rarement infectés que les cathéters centraux. Les germes en cause sont très souvent des bactéries de la flore cutanée tels que *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* (50 à 70%) et les bacilles à Gram négatif. (Samou, 2004).

3-5-septicémies :

De nombreuses études publient d'ailleurs deux taux de septicémies, celui observé chez les patients cathétérisés (9,6%) et celui observé chez les autres patients (4,2 %) les germes les plus rencontrés : bacille à Gram négatif, *S.aureus* et *S.epidermidis*. (Diakaria, 2001)

3-6-Autres infections nosocomiales :

De très nombreuses autres localisations infectieuses sont possibles (15 à 25% des infections nosocomiales). On peut citer notamment

- les infections du système nerveux central (méningites d'inoculation ou post opératoire, abcès cérébraux).
 - infection de la peau (abcès sous cutanés ou musculaires après infections).
 - infection du tube digestif (diarrhées épidémiques à *Salmonelles* ou *Escherichia coli* enteropathogènes)
 - infection des régions buccale et périmuqueuse (au cours de leucémies en aplasie).
- (Diakaria, 2001)

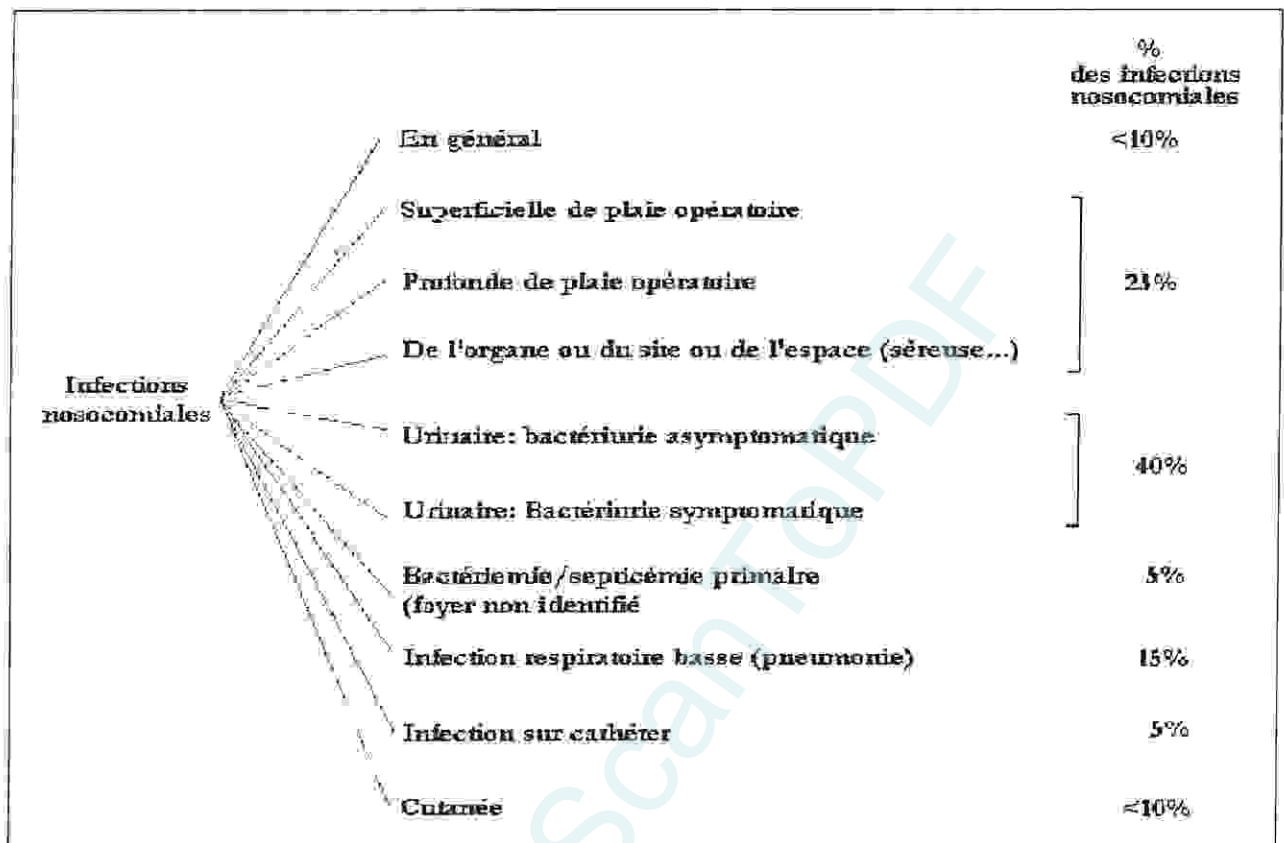


Figure 02 : répartitions d'IN selon les types d'infections. [4]

4-Facteurs de risque infectieux:

Les facteurs de risque peuvent être distingués en 2 catégories :

A- Les facteurs liés au malade

1-Les pathologies préexistantes :

- Diabète
- Insuffisance rénale
- Insuffisance hépatique
- Incontinence urinaire (facteur de risque d'infection urinaire nosocomiale)
- Leucopénie, cancer (Immunodépression). [6]

2- la pathologie à l'origine de l'hospitalisation :

- Polytraumatisme (Accident de la circulation, chute d'une hauteur)
- Brûlures étendues

3- L'état nutritionnel non satisfaisant : la dénutrition est un facteur favorisant important des infections nosocomiales car elle provoque une atrophie de toutes les muqueuses..

4- L'âge : Avant 1 an et après 65 ans, le risque infectieux est majoré.

B- Les facteurs liés aux techniques diagnostiques et thérapeutiques :

La nature et la qualité des soins influent sur le taux d'infections nosocomiales :

- Certains traitements agressifs tels les perfusions, cathétérismes, sondes, endoscopie constituent des portes d'entrée faciles pour l'agent infectieux.
- L'encombrement du service, le défaut d'isolement des malades infectés.

- Les erreurs dans l'organisation des soins.

- l'antibiothérapie à l'aveugle : l'utilisation des antibiotiques à large spectre sélectionne les bactéries multi résistantes aux antibiotiques et diminue l'effet barrière de la flore commensale.
- la désinfection insuffisante.
- la stérilisation de mauvaise qualité.
- asepsie insuffisante. [6]

5-Les principaux micro-organismes responsables d'LN :

L'infection nosocomiale, acquise au sein d'un établissement de soins, peut être liée à divers agents, bactéries, virus, champignons ou parasites. Les patients peuvent s'infecter par des germes dont ils sont porteurs (saprophytes ou pathogènes). On parle de germes endogènes. Ces germes contaminent le patient le plus souvent lors de soins (sonde urinaires, infection du site opératoire) ou peuvent s'infecter par des germes liés à l'environnement hospitalier. On parle de germes exogènes. Ces germes contaminent le patient soit par des routes inanimées (eau, air, aliment) ou animées (patients, personnels). [7]

5-1-Les champignons :

Les infections nosocomiales fongiques (INF) (causées par des champignons) sont une préoccupation majeure des établissements de santé, elles sont peu fréquentes et touchent les personnes sévèrement immunodéfaillants.

En milieu hospitalier, quelques espèces de moisissures peuvent s'avérer responsables de mycoses invasives, maladies graves, ces infections sont pour l'essentiel des infections nosocomiales consécutives au traitement anticancéreux et immunosuppresseurs sont causées par des champignons de l'environnement notamment *aspergillus* et *candida*. (Cordonnier 2000)

- **Aspergillus:**

Aspergillus sp. représente une faible proportion des champignons filamenteux (moisissures), 200 espèces, seule une trentaine est pathogène pour l'homme ; les plus représentées : *Aspergillus fumigatus* et *A.flavus*. Ubiquitaire de l'environnement (végétaux, sol, l'air, poussières...). Leur mode de contamination est aéroportée, Contamination inter-humaine exceptionnelle, Cas sporadiques ou cas groupés, au cours de travaux (rénovation et/ou construction) Le risque de contamination va dépendre du terrain du patient, de la maladie et de son stade évolutif, ainsi que de son traitement et des facteurs environnementaux. [8]

- **Candida:**

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

Les candidas sont souvent responsables d'infections nosocomiales systémiques qui peuvent être la conséquence de contamination nosocomiales exogènes, souvent chez les patients ayant des cathéters intra vasculaires, ou bien ils peuvent être responsables d'infections consécutives au passage vers les organes profonds endogène. [9]

5-2-Les virus:

La fréquence des infections nosocomiales virales (INV) est estimée à environ 5 % de l'ensemble des infections nosocomiales. Les populations à risque se sont les services de pédiatrie, de gériatrie, de pathologies chroniques, aussi les immunodéprimés.

Types de viroses:

Selon leurs modes de transmission on distingue :

-Rotavirus: de transmission féco – orale par aliments et eaux souillés, et par contact humain, responsables de diarrhées infantiles

- Virus respiratoire syncytial (VRS) : de Transmission aérienne ce virus entraîne des atteintes ORL et pulmonaires chez l'enfant.

-Le Virus de la grippe : atteint surtout les Sujets âgés dans les centres médicalisés ; il se transmet par voie aérienne et entraîne des atteintes du rhinopharynx, de la trachée et des bronches

- Les Virus de l'hépatite B (VHB), de l'hépatite C (VHC), de l'immunodéficience humaine (VIH), des fièvres hémorragiques, sont incriminées dans les services d'hémodialyse, lors des transfusion sanguine et greffes d'organes.

-Autres : varicelle, rougeole sont aussi incriminés chez les PVVIH[10]

Tableau n°01 : principaux virus responsables des INV [11]

Virus	Incubation	Principaux signes cliniques (%: valeurs moyennes)
Rotavirus	1 -3 jours	- diarrhée aqueuse: 98 % - fièvre: 86 % - vomissements: 51 % - déshydrations : 72 % des hospitalisations
Calicivirus	12-48 h	diarrhée: 66 % fièvre: 37 %

5-3-Les parasites:

Le parasite est animale ou végétal qui pendant toute sa vie ou une partie de sa vie se nourrit au dépend d'un organisme vivant.

Les parasites sont particulièrement pathogènes pour les sujets immunodéprimés. Les traitements immunodépresseurs sont parfois responsables de l'évolution grave voire mortelle de certaines parasitoses. Il s'agit le plus souvent d'une toxoplasmose. Certaines observations montrent une toxoplasmose antérieure, d'autre la transmission par un organe transplanté.[12]

5-4-Les bactéries :

Les germes nosocomiaux rencontrés sont souvent des bactéries. Elles sont dominées par les staphylocoques, les entérobactéries et les bactéries du genre *Pseudomonas*. Ces bactéries nosocomiales sont souvent caractérisées par leur multi-résistance. [7]

5-4-1-Les bactéries Gram négatif:

Représentent 60 à 70 % des agents responsables d'infections hospitalières

- ***Pseudomonas*:**

C'est l'exemple type de bactéries nosocomiales opportunistes. A l'hôpital, ce germe est répandu dans les environnements humides (robinets, siphons, lavabos, douches, nébuliseurs, humidificateurs, ...), qui peut ainsi contaminer le matériel hospitalier, hôtelier médicale ou chirurgical, les solutions antiseptiques, les solutés injectables, des produits médicamenteux. Dans la majorité des cas, l'infection à *Pseudomonas* elle survient chez les patients fragilisés (opéré récent, patient sous assistance respiratoire, chimiothérapie,...). Cette bactérie peut-être responsable d'infections graves (pulmonaires, septicémiques, urinaires) nécessitant l'utilisation d'antibiotiques coûteux et le plus souvent en association. La transmission se fait à partir des sources environnementales, soit directement, soit par l'intermédiaire de matériels lavés ou rincés à l'eau du réseau. Elle peut aussi être interhumaine à partir d'un sujet colonisé. La pression de sélection des antibiotiques dans le milieu hospitalier augmente probablement le risque de colonisation. L'espèce la plus pathogène c'est le *Pseudomonas aeruginosa*, ont une fréquence élevée dans certains services : réanimation, long séjour, pneumologie. *P. aeruginosa* possède une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques. [12]

- **Les entérobactéries :**

les Entérobactéries sont dominées par l'espèce *Escherichia coli* responsable d'infections urinaires et bactériémies nosocomiales, mais parmi les bactéries constituant cette famille, on retrouve aussi les genres *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, qui appartiennent normalement à la flore digestive habituelle et peuvent contaminer l'eau ou des circuits supposés. [12]

- ***Escherichia coli* (*E. coli*) :**

C'est l'espèce dominante de la flore aérobie du tube digestif. *E. coli* ou colibacille est habituellement une bactérie commensale, représente 80 de la flore intestinal aérobie de l'adulte, il se réprend dans la nature: sol et eaux. Les infections à *E. coli* sont deux types: des infections opportunistes, touchant principalement l'arbre, urinaire, les voies génitales et biliaires, et l'autre volet des manifestations pathologiques sont constituées des infections du tractus digestif. (Naucliel.2001)

- ***Citrobacter* :**

Citrobacter est une bactérie aérobie, Gram-négative, appartenant aux entérobactéries. Généralement nosocomiale, touchant le tractus gastro- intestinal, l'arbre urinaire, les poumons, les plaies, les tissus mous, l'os et les méninges. La présence de *Citrobacter* dans le sang est fréquemment associée à des bactériémies poly microbiennes chez des patients avec une pathologie sous-jacente. [13]

- ***Acinetobacter*:**

Cette bactérie est responsable d'infections nosocomiales, essentiellement dans les services accueillants des patients fragilisés (réanimation par exemple). Sa transmission se fait par contact avec les mains. En général, cette bactérie ne provoque pas de maladies chez les personnes bien portantes. En revanche, chez les patients fragilisés, elle peut être la cause d'infections sévères (infections pulmonaires, septicémie, notamment). C'est une bactérie fréquemment résistante à de nombreux antibiotiques. [14]

➤ ***Shigella:***

Les *Shigella* sont des bactéries intestinales rencontrées seulement chez l'homme. Celui-ci les élimine par ses selles et les disperse dans le milieu extérieur (sol, eau) où elles ne survivent pas longtemps. La contamination se fait par voie digestive, la transmission interhumaine s'opère facilement, elle peut être directe, par les mains, ou indirecte par l'ingestion d'aliments ou d'eaux contaminés. Elle est responsable de dysenterie bacillaire, et de syndrome diarrhéique chez les enfants. [15]

5-4-2-Les bactéries Gram positif:

▪ ***Staphylocoques:***

Bien que *Staphylocoque* contamine largement les surfaces, l'air et l'eau, l'homme en est le principal réservoir, qu'il soit malade et porteur de lésions, ou bien porteur sain (30 à 50% de la population) surtout au niveau des fosses nasales, de la peau et de ses annexes glandulaires (aisselles, périnée). Les staphylocoques, en particulier les espèces *S. aureus* et *S. épidermidis*, ont un rôle majeur dans l'infection nosocomiale surtout cutanéomuqueuses qui peuvent être graves (septicémies secondaires). Elle peut être transmise directement par un simple contact direct comme un toucher de main ou indirectement via des surfaces ou des objets touchés par un porteur de **staphylocoque**. A l'hôpital, 30 à 40% des *S. aureus* sont résistants à plusieurs familles d'antibiotiques, ce qui réduit les moyens de traitement possible de ces infections [16]

▪ ***Streptocoques:***

Les bactéries appartenant au genre *Streptococcus* sont des cocci à Gram positif. Se disposant en chaînettes plus ou moins longues.

Les streptocoques sont fragiles et vivent à l'état commensal au niveau des téguments ou des muqueuses de l'homme. La présence normale de streptocoques au niveau cutanéomuqueux explique qu'ils peuvent contaminer fréquemment des prélèvements et constituer des souillures.

On distingue des espèces pathogènes, des espèces commensales et des espèces saprophytes. Beaucoup d'individus sont porteurs sains et hébergent des streptocoques pathogènes sans présenter les signes de la maladie. [17]

Tableau N°2 : principales bactéries responsables d'infections nosocomiales selon leur fréquence relative, localisation des infections, réservoirs, et le mode de transmission. [18].

Les bactéries fréquemment mis en causes dans les infections nosocomiales

Bactérie responsable	Localisations des infections	Réservoir	Mode de transmission	Fréquence
<i>Staphylococcus aureus</i>	Plaies, peau, sang	Peau, nez	Mains, air ambiant, cathéters	10 %
<i>Staphylocoques coagulase</i>	Cathéters, sang	Peau, nez	Mains, air ambiant, cathéters	2 %
<i>Entérocoques</i>	Urines, plaies	Intestin	Mains, air ambiant, sondes urinaires	9 %
<i>Escherichia coli</i>	Urines, sang	Intestin	Mains, sondes urinaires	19 %
<i>Klebsiella</i>	Appareil respiratoire	Intestin	Mains, liquides	8 %
<i>Enterobacter</i>	Plaies	Intestin	Mains, liquides	4 %
<i>Proteus</i>	Urines	Intestin	Mains, liquides	7 %
<i>Pseudomonas</i>	Urines, sang, plaies, appareil respiratoire	Milieux humides	Matériel médical, mains	9 %

6-Mécanisme d'action et résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance des bactéries aux antibiotiques constitue un problème majeur de santé publique. La dissémination des bactéries multi résistantes (BMR) entre les patients hospitalisés, souvent fragilisés, est à l'origine d'une augmentation considérable de la mortalité, de la morbidité, les BMR représentent 20 à 30% des cas des infections nosocomiales [19]

6-1-Mécanisme d'action :

Les antibiotiques interagissent avec les bactéries au niveau des cellules cibles qui sont spécifiques soit d'un antibiotique, soit d'une famille de celui-ci [19]

6-2-résistance bactérienne :

Une souche bactérienne résiste à un antibiotique quand elle peut croître en présence d'une concentration plus élevée de cet antibiotique que la concentration tolérée par les autres bactéries de la même souche. (leguyon, 1960)

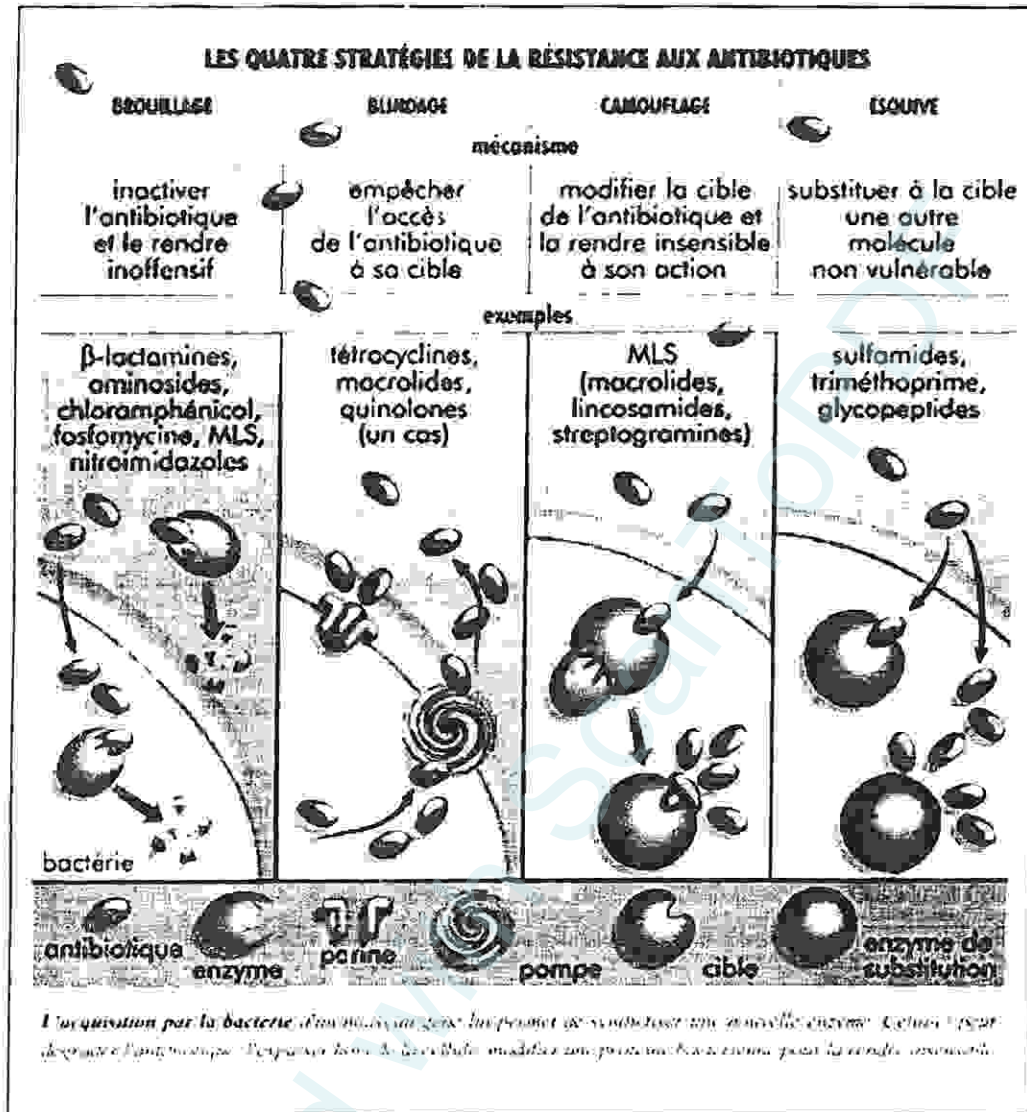
• Le mécanisme de cette résistance peut être due a :

-Modification de la molécule bactérienne qui constitue la cible de l'antibiotique :

L'antibiotique ne se fixe plus sur la structure qui représente son site d'action.

-production d'une enzyme capable d'inactiver la molécule de l'antibiotique (acetylase, adénylase, phosphorylase pour les aminosides) ou de l'hydrolyser (pénicillinaes, cephalosporinase pour les bêta-lactamines).

La modification de la pénétration de l'antibiotique dans la bactérie, il n'atteint pas son site d'action (perméase). (Ferron, 1983)



Les quatre stratégies de la résistance aux antibiotiques

Source : La Rivière, novembre 1998

Figure03 : les mécanismes de résistance des BMR aux antibiotiques. [20]

6-3-BMR impliquées dans les infections nosocomiales :

- staphylococcus* résistant a la méticilline SARM.
- Entérobactéries* productrices de β lactamase a spectre élargi BLES.
- Entérobactéries* résistantes aux β lac amines par hyperproduction de céphaosporinase.
- Acinetobacter* résistante a la céftazidime et/ou imipenem
- pseudomonas aeruginosa* résistant a céftazidime PARCet/ou imipenem
- entérocoque résistant aux glycopéptides. [21]

6-4-Type de résistance :

Deux types de résistance sont habituellement décrits :

a- La résistance naturelle :

Le spectre d'un antibiotique représente l'ensemble des germes pour lesquels cet antibiotique est sensible. Certains germes peuvent, de manière spontanée, ne pas réagir à

cet antibiotique. On dit alors qu'il y a une résistance naturelle. Elle est due soit à une absence de cibles pour l'antibiotique, soit à une imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique, soit à une sécrétion naturelle par les germes d'une enzyme qui détruit l'antibiotique. Ce type de résistance est stable. Elle doit être connue pour chaque antibiotique afin de diriger la prescription à chaque fois que l'antibiogramme n'est pas disponible au moment de la mise en route du traitement. [22]

b- La résistance acquise :

Certains germes qui jusque là étaient sensibles à un antibiotique donné, peuvent acquérir une résistance après un certain temps plus ou moins long. On parlera alors de résistance acquise. Celle-ci admet dans son déterminisme soit un mécanisme de mutation, soit un mécanisme de transfert de gènes. [22]

Tableau N°03 : Les différentes familles d'antibiotiques : activités, mécanismes d'actions et de résistances

Antibiotiques	Activité	Mechanism d'action, cible	Mécanisme de résistance
β -lactames	Gram+ Gram- anaérobies	inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne	- modification de la cible - production de β -
Glycopeptides	Gram +	inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne	lactamase - modification de la cible
Aminoglycosid es	Gram-	inhibition de la synthèse des protéines, ribosomes	- modification de la cible - production d'un inhibiteur
Tetracyclines	Gram+ Gram-	inhibition de la synthèse des protéines, ribosomes	- modification de la cible - mécanisme de reflux
Macrolides et Lincosamides	Gram+ Gram-	inhibition de la synthèse des protéines, ribosomes	- modification de la cible - imperméabilité de la paroi gram-
Quinolones	Gram+ Gram-	inhibition de la réplication de l'ADN, ADN gyrase	- modification de la cible
Rifampin	Gram+	inhibition de la synthèse de l'ARN, ARN polymérase	- modification de la cible
Trimethoprim et Sulfonamides	Gram+ Gram-	inhibition de la synthèse des acides nucléiques, enzyme	- modification de la cible

7-La prévention des infections nosocomiales :

En médecine, le risque zéro n'existe pas. Pour cette raison, il n'est pas toujours possible d'éviter les infections nosocomiales. Il est par contre tout à fait possible d'en limiter la fréquence et la gravité, en respectant quelques règles d'hygiène.

Les préventions des infections hospitalières consistent :

- d'une part à poser un certain nombre de (barrière) dans le but d'empêcher la transmission des germes d'un patient à un autre, du personnel au patient du patient.

D'autre part à traiter les malades infectés avec un antibiotique adéquat pour réduire le réservoir. (Acaret, 1997).

7-1-Le respect strict des règles d'hygiène :

L'application des règles d'hygiène est le premier moyen de lutte contre les infections nosocomiales. Ces règles s'appliquent à trois niveaux :

- l'hygiène des mains
- le respect des règles d'asepsie
- l'environnement.

- **l'hygiène des mains :**

L'hygiène des mains du personnel est une règle fondamentale. À l'hôpital, la transmission des germes se fait essentiellement par les mains du soignant. En effet, soumises à de nombreux contacts (malades, objets, surfaces contaminées), les mains sont, par nature, des relais contaminants. Le lavage des mains, en permettant de réduire le nombre de germes localisés sur les mains du soignant, constitue la mesure de prévention la plus simple et la plus efficace. Il doit être pratiqué avant et après chaque soin potentiellement contaminant. C'est pourquoi les services disposent d'un nombre important de lavabos à commande non manuelles équipés de distributeurs de savon et d'essuie-mains à usage unique.

On distingue :

- le lavage simple (avec un savon doux),
- le lavage désinfectant (plus long et avec un savon antiseptique),
- la désinfection avec une solution hydro-alcoolique (SHA) elles contiennent de l'alcool à 70°.

Le lavage simple est insuffisant pour certains gestes et pour la prévention de la transmission des BMR. [24]

- **Le respect des règles d'asepsie :** autrement dit l'ensemble des mesures destinées à empêcher tout apport extérieur de germes, représente un autre moyen de prévention incontournable. Beaucoup d'infections nosocomiales sont dues à des gestes de soin qui introduisent involontairement des germes infectieux dans le corps. On parle d'actes de soin invasifs parce qu'ils traversent la peau du patient. C'est le cas des perfusions, des sondages urinaires, de la ventilation artificielle ou d'opérations chirurgicales. La première préoccupation est bien sûr toujours de déterminer si l'état de santé du patient nécessite de tels gestes de soin. Il faut comparer le risque d'infection encouru au bénéfice attendu de ces gestes, afin de ne pratiquer que les gestes indispensables à la santé du patient. [24]

- **Ces règles reposent sur :**

-la préparation de la peau ou des muqueuses du malade avant tout geste invasif (intervention chirurgicale, pose d'une perfusion, d'une sonde urinaire...) avec les antiseptique.

- l'emploi de matériels et instruments stériles ou ayant subi un nettoyage suivi d'une désinfection.

-l'emploi d'un matériel dont la conception permet d'en limiter les manipulations.

[23]

- Le port de gants

Il est nécessaire lors de tout contact avec un liquide biologique (sang, urines, ...) afin de prévenir le risque infectieux et de protéger le personnel soignant. Le port de gants n'exclut pas le lavage des mains avant et après leur utilisation. Ils doivent être changés entre chaque patient et entre chaque soin.

Ainsi, la prévention concerne aussi le personnel, en particulier pour les risques liés au sang : port de gants obligatoire lors des prélèvements sanguins, protocoles de soin du personnel lors des piqûres accidentelles (trithérapie antirétrovirale en cas de contact avec du sang VIH positif).

- Les isolements des malades contagieux :

La prévention de la transmission nécessite un isolement du malade afin d'éviter la diffusion des germes à son entourage

Ces précaution d'isolement ne sont nécessaires que pour 2(pour 100) des malades admis l'hôpital.

De nos jours, dans la plupart des hôpitaux, on utilise un système d'isolement par catégories, ce système est basé sur la classification des maladies selon leur mode probable de dissémination et comprend un ensemble de procédures bien codifié

7-2-La stérilisation, la désinfection et l'antisepsie :

On ne peut concevoir la prévention des infections nosocomiales sans parler de :

Stérilisation, désinfection et antisepsie, terme recouvrant des notions différentes.

Lorsqu'un objet peut être traité de telle façon que tous les micro-organismes y compris les spores soient éliminés, cet objet est appelé (stérile), donc la stérilisation est la mesure (absolue) qui en l'éradication totale et définitive de tout agent infectieux. Différentes techniques de stérilisation sont utilisées :

- La stérilisation par la chaleur sèche (Poupinel)
- exposition à la vapeur dans un autoclave.
- stérilisation gazeuse.
- immersion dans une solution de glutaraldéhyde.
- utilisation des rayons U.V.

Certains objets ne peuvent pas être stériles et ne requièrent qu'une élimination partielle des micro-organismes. A cet effet des solutions désinfectantes, des antiseptiques et d'autres solutions de nettoyage peuvent être utilisées.

La désinfection s'applique avant tout au matériel médical inerte (endoscope).

L'antisepsie s'applique aux tissus vivants et est effectuée à l'aide de produit, applicable sur la surface de la peau ou de muqueuses (Acaret, 1997)

7-3-L'antibioprophylaxie :

C'est l'administration d'antibiotique avant la contamination bactérienne potentielle liée à l'acte opératoire. Elle a pour objectif la réduction de la fréquence des infections chirurgicales superficielles au niveau des sites opératoires. Elle est réservée aux interventions associées à une fréquence élevée d'infection postopératoire ainsi qu'aux interventions dont les complications septiques, bien que rares, ont des conséquences vitales ou fonctionnelles graves. (Samou, 2004).

Produced with ScanTOPDF

Partie pratique

Produced with ScantOPDF

Chapitre I :

Matériels et méthodes

1-cadre d'étude :

Notre travail a pour but l'isolement et l'identification des micro-organismes responsables d'une infection a partir de l'environnement hospitalier et des patients hospitalisés au niveau de deux services service chirurgie femme et service d'orthopédie de l'hôpital El-Hakim O'kbi Guelma. Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de la micro biologie du Département de biologie de l université de Guelma.

2-Prélèvement et enrichissement:❖ **Matériel de prélèvement :**

- Ecouillons stériles.
- Eau distillée stérile.
- Boîtes de Pétri.
- Gélose nutritive (G.N).
- Glacière.
- Etiquettes.

❖ **Matériel d'enrichissement :**

- tubes à essai.
- Bouillon nutritif.
- Etuve.

2-1-Prélèvement de pus:

Les prélèvements de pus sont effectués au niveau des plaies infectées de deux patients hospitalisés au sien de service d'orthopédie par des écouillons stériles dans des conditions d'asepsie rigoureuse.

2-2-Prélèvement à partir des surfaces :

Les prélèvements ont été réalisés à l'aide des écouillons stériles préalablement humidifié avec l'eau distillée que l'on frottait au niveau du lit de malade, des sols, des instruments médicaux stériles, des mains d'une infirmière, mur, chariot de soins et du four Pasteur.

Remarque : Les prélèvements sont étiquetés : date, site de prélèvement et service.

-Les sites de prélèvements ont été choisis dans l'objectif de couvrir plus au moins l'ensemble de l'environnement hospitalier.

Tableau N°04 : numéro des sites et les services des prélèvements effectués

Numéro de prélèvement	Site de prélèvement	Service
-----------------------	---------------------	---------

(1)	Pus d'un homme de 52 ans	-Service d'orthopédie
(2)	Pus d'un homme de 40 ans	-Service d'orthopédie
(3)	Main d'une infirmière	-Service d'orthopédie
(4)	Lit de malade	-Service chirurgie femme
(5)	Chariot de soin	-Service chirurgie femme
(6)	Sol	-Service chirurgie femme
(7)	Atmosphère aérienne	-Service chirurgie femme
(8)	Mur	-Service chirurgie femme
(9)	Instruments médicaux	-Service d'orthopédie

2-3.Enrichissement:

Après avoir effectués les différentes prélèvements, les écouvillons sont introduits dans des tubes de bouillon nutritif .Les tubes sont ensuite acheminés au laboratoire ou ils seront incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures jusqu'a l'apparition trouble dans le milieu.

2-4-Prélèvement a partir de l'atmosphère hospitalière :

Une boîte de Pétri contenant de la Géllose Nitritive (G.N) a été placée ouverte dans la salle de soin pendant 24 heures avant d'être acheminer au laboratoire pour l'incubation à 37°C pendant 24 heures .Les sites et les modes de prélevement sont résumés comme suit :

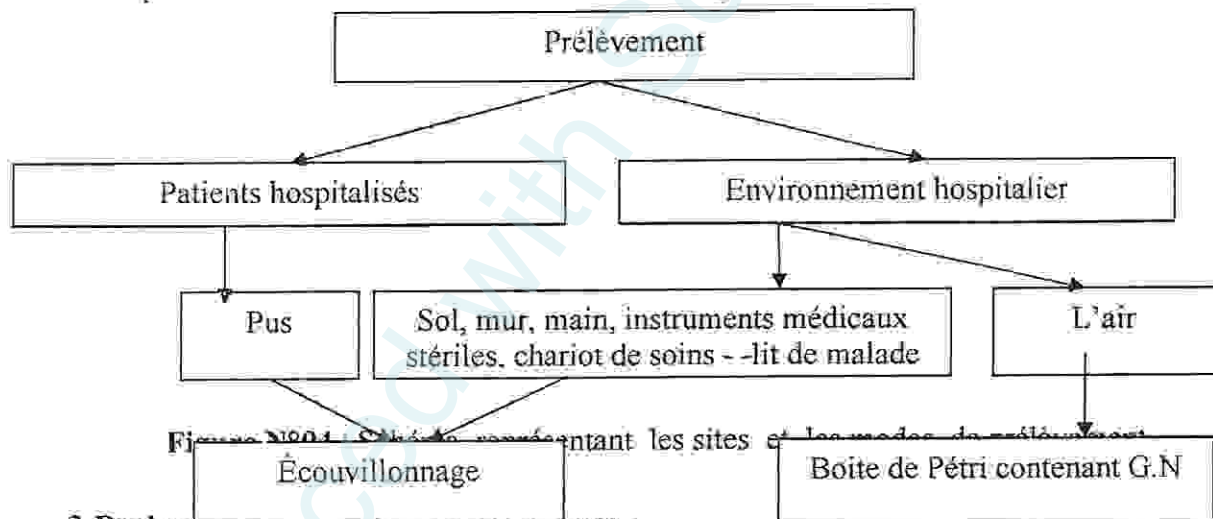


Figure 2.004 - Schéma représentant les sites et les modes de prélèvement

3-Recherche et identification des germes :

En peut résumer le Protocole de notre travail dans le schéma suivant :

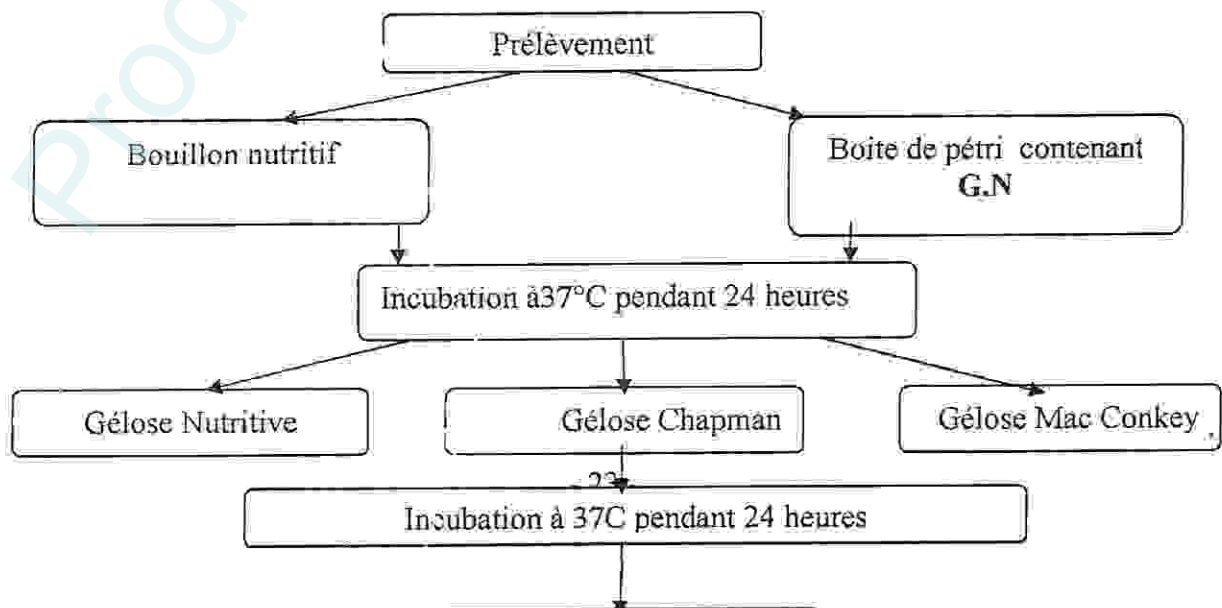


Figure N°05 : schéma explicatif le protocole de notre travail

3-1-l'isolement:

❖ Matériel d'isolement :

- Anse de platine.
- Gélose Chapman.
- Gélose Mac Conkey.
- Gélose nutritive.
- Boîtes de pétri.
- Bec Bunsun.

❖ Méthode d'ensemencement sur gélose :

L'ensemencement se fait par des stries sur des boîtes de Pétri contenant les géloses Chapman, Mac Conkey, Gélose Nutritive. L'inoculum est prélevé avec l'anse de platine dans les conditions d'asepsie rigoureuses à partir des milieux d'enrichissement et des colonies à partir de la boîte de Pétri (prélèvement de l'air) est déposé sur un point périphérique de la gélose puis disséminé par des stries sur toute la surface, les boîtes sont marquées puis incubées à 37°C pendant 24 heures.

3-2-Méthode d'identification :

3-2-1-Identification macroscopique :

L'identification macroscopique des germes basée sur l'observation à l'œil nu, l'aspect des colonies obtenues à partir des différents milieux d'isolement. Cette observation servira de moyen d'orientation pour une identification plus approfondie.

3-2-2-Identification microscopiques :

❖ **Matériel :**

- Microscope optique.
- Lames porte objet bien propre et lamelles.
- Bec Bunsen.

❖ **Les réactifs consommables :**

- Violet de Gentiane.
- Liquide Lugole.
- Bleu de Méthylène.
- Alcool-acétine.
- Eau stérile (eau distillée).
- Fuchsine.
- l'huile de cèdre.

À partir des colonies suspectes sur les milieux précédents on réalise un examen direct à l'état frais et après coloration. Les buts et les méthodes d'examen microscopiques peuvent être résumés dans le tableau suivant.

Tableau N°05 : les buts et les méthodes d'examen microscopiques

	Examen direct a l'état frais	Examen direct après coloration	
Le but d'examen	-Une préparation à l'état frais permet d'examiner la mobilité et la formes des bactéries ainsi que leur mode de groupement	Coloration au bleu de méthylène	Coloration de Gram
		-Pour observer la cytologie de prélèvement analysée (présence des polynucléaires lymphocytes et monocytes) ainsi que la présence éventuelle des germes (forme et groupement)	-Permet de diviser les germes en deux partie les bactéries à Gram positif colorées en violet foncé et les bactéries à Gram négatif colorées en rose. on peut aussi observer la disposition des germes et leur morphologie (cocci, bacilles-coccobacille).

La méthode	<ul style="list-style-type: none"> -Déposer une petite goutte d'eau stérile sur une lame propre. -Prélever une fraction de colonies sur gélose (ou prélever une petite goutte de bouillon. -faire une suspension dans la goutte d'eau. -Recouvrir d'une lamelle en évitant d'enfermer des d'aire -observer rapidement. (X40). 	<ul style="list-style-type: none"> -avant tout coloration il faut réaliser un frottis. -Déposer sur une lame propre une goutte d'eau stérile. -prélever à l'aide de l'anse de platine une clone bactérienne. -Mélanger a fin d'obtenir une suspension homogène. -Réaliser le frottis en partant du centre de la lame en décrivant avec l'anse des mouvements circulaires de façon à obtenir un étalement. -Sécher et fixer le frottis au dessus de la flamme du bec bunsen. 	
	<ul style="list-style-type: none"> -Après la préparation d'un frottis. -traiter par le bleu de méthyle pendant une minute. -Laver abondamment à 1 minute la l'eau de robinet séché entre deux papiers buvard -Observer au microscope (X100). l'alcool 	<ul style="list-style-type: none"> -Réaliser un frottis et le fixer -Recouvrir le frottis de violet de gentiane pendant 1 minute -Rincer à l'eau courante. -Incliner la lame versée l'alcool -acétone jusqu'a la disparition du reflet bleu -Rincer à l'eau courante - Recouvrir le frottis par La Fuchsines pendant 30 secondes. -Rincer à l'eau courante égoutter puis sécher -Observer au microscope à immersion après avoir déposer une goutte de l'huile de cèdre au centre de lame. 	

3-2-3-Etudes des caractères biochimiques:

❖ Les entérobactéries :

A- La galerie biochimique classique :

Tableau N°06 : Composition de la galerie biochimique classique

milieu	Mode l'ensemencement	Caractères recherchés	Résultats attendu
TSI (triple Agar)	<ul style="list-style-type: none"> -ensemencer abondamment la surface par stries serrées puis le culot par simple pique. -mettre à l'étuve 24heures à 37C°. 	<ul style="list-style-type: none"> -utilisation du glucose -utilisation du sa saccharose -utilisation du lactose -production H₂S -production du gaz 	<ul style="list-style-type: none"> -virage de la couleur vers le jaune -formation de tache noire.

Citrate de Simmons	-la pente est ensemencée par une strie longitudinale. -mettre à l'étuve 24heurs à37°C.	-utilisations du citrate comme seule source de carbone.	Virage de l'indicateur de pH ou bleu
Clark et lubs	-ensemencer largement -incuber 24h à température Optimal *test VP : Ajouter 10 gouttes d'alpha naphтол et le même volume de soude concentrée (on de potasse) Attendre quelque min à 1 heure. *Test RM Ajouter 2à3 gouttes de rouge de méthyle -la lecture est immédiate.	-production de l'acétone -mise en évidence de la voie des fermentations d'acide mixte par le test RM (au rouge de méthyle)	Test VP rouge : VP+ jaune : VP- test RM rouge : RM+ jaune : RM-
Mannitol mobilité	-Ensemencer par piqure centrale à l'aide d'un fil droit. -incuber 24 heures à température optimale.	-mannitol -mobilité	Caractère mannitol -milieu jaune -la mobilité : les bactéries mobiles peuvent se déplacer dans la gélose molle : Etude de la mobilité.
Urée indole	-Ensemencer largement. -incuber 24 h à température optimale. *test d'indole : après incubation on ajoute à la culture les réactifs à l'indole de Kovacks	-Uréase. -formation d'indole	-Apparition de couleur rose. -test positif : Apparition d'un anneau rouge à la surface.

Tableau N°07 : Les caractères différentiels des Entérobactéries

	Mobilité	Mannitol	H ₂ S	Uréase	RM	VP	Citrate de Simmons	Indole	Saccharose
<i>E. coli</i>	+	+	+	-	+	-	-	+	D
<i>Salmonella</i>	+	+	+	-	+	-	+	-	-
<i>Shigella</i>	-	D	-	-	+	-	-	D	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	+	+	-	+
<i>Proteus vulgaris</i>	+	-	+	+	+	-	D	+	+

(+): Positif; (-): Négatif; D: Variable.

B- La galerie API 20E :

➤ But :

La Galerie API 20E prêt à l'emploi permettant de réaliser 20 tests biochimiques afin d'identifier des bacilles Gram – appartenant à la famille des Entérobactériaceae.

➤ Principe :

La galerie API 20E comporte 20 micros tubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanées ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification.

➤ Mode opératoire :

L'opération s'effectue selon les étapes suivantes :

- On Réunit fond et couvercle d'une boîte d'incubation et on répartit environ 5 ml d'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.
- On remplit les tubes et cupules des tests CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne.
- On remplit uniquement les tubes (et non les cupules) des tests.
- On crée une anaérobiose dans les tests ADH, LDC, ODC, H₂S, en remplissant leur cupule avec l'huile de paraffine.
- La galerie sera incubée à 37°C pendant 18 à 24 heures.

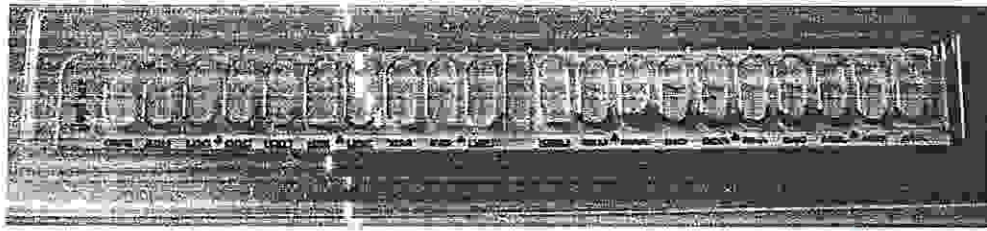


Figure N°06: Galerie Api 20E

➤ **Résultats :**

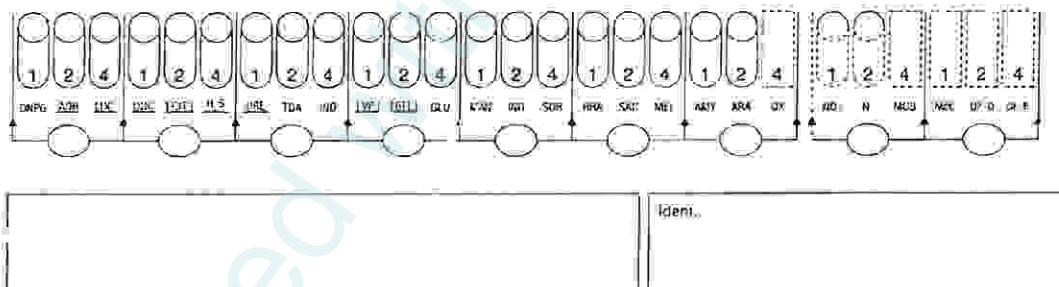
Noter sur la fiche de résultats tous les réactions spontanées, ensuite réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs : test VP, TDA, IND.

➤ **Identification :**

-Avec le tableau d'identification, on compare les résultats affichés sur la fiche des résultats avec celles du tableau ; chaque cellule de ce tableau contient le pourcentage de positivité.

-Avec le catalogue analytique : les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1 ou 2 ou 4) est positive suivant l'ordre de l'emplacement de la cupule dans le groupe, ensuite on obtient un nombre de 7 chiffres qui sert de code d'identification.

Api 20 E



Figure°07 : Fiches technique des résultats de l'Api 20E.

❖ **les Pseudomonas :**

A-Test d'oxydase:

La recherche d'oxydase s'effectue avec des disques prêts à l'emploi du commerce.

-On humidifie avec deux gouttes d'eau distillée le disque d'oxydase sur une lame bords propres.

-On écrase avec effilure de pipette pasteur une colonie sur le disque.

-La présence d'une oxydase se traduit par l'apparition d'une coloration violacée.

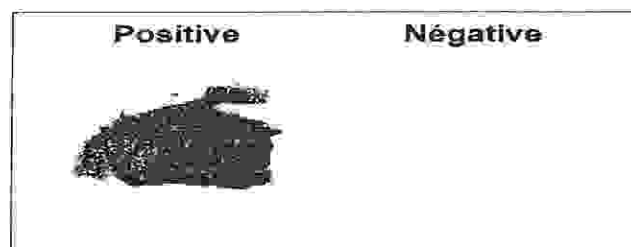


Figure N°08 : Lecture de l'oxydase

B – Ensemencement de milieux sélectif :

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

➤ Principe :

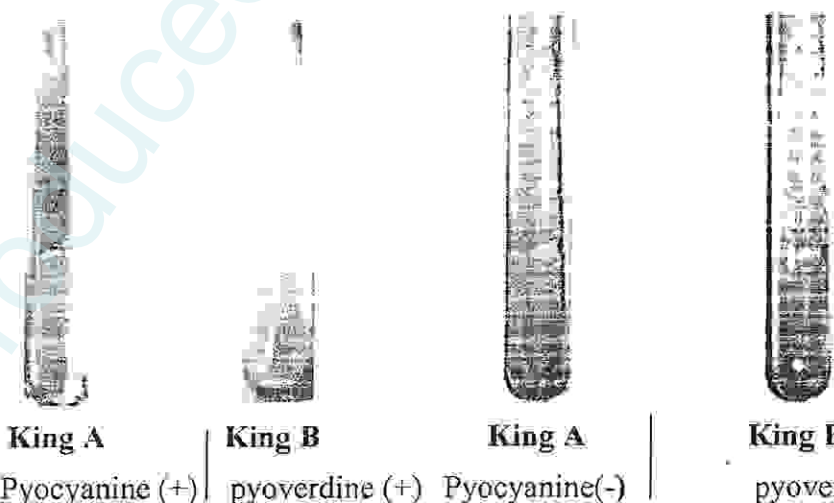
L'élaboration des pigments est influencée par la composition du milieu, ce qui justifie l'utilisation de deux milieux différents : King A et King B.

- la production de pyocanine, 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 sur gélose, ensemercer les milieux King A et King B en faisant une strie à la surface de la gélose avec l'anse. L'incubation à 37°C pendant 24 heures. La présence des 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)
- couleur jaune-vert fluorescent sur le milieu King B (présence de pyoverdine) sous UV.



(+) : la production de pigment est positive. (-) : la production de pigment est négative.

Figure N°09 : lecture des milieux sélectifs de *pseudomonas* après l'incubation.

❖ Les Staphylocoques :

A-Test staphylocoagulase :

Ce test est réalisé selon les étapes suivantes :

- Ensemencer le milieu cœur cerveau (milieu liquide) avec les colonies de staphylocoque pathogène (Colonies Jaunes).
- dans un tube à hémolyse stérile introduire 10 gouttes du plasma de lapin et 10 gouttes d'une culture de 24 heures en bouillon cœur cerveau.
- Considérer que la réaction à la coagulase est positive quand le coagulum occupe plus des trois quart du volume initialement occupé par le liquide.



Figure N°10: Lecture de la coagulase

B-Test catalase :

Sur une lame de verre propre et sèche, déposer une goutte d'eau oxygénée H_2O_2 , puis la mettre en contact avec une colonie isolée, prélevée directement avec une pipette pasteur à usage unique.

- Si formation de bulles, la bactérie possède la catalase.
- Si rien n'est observable, la bactérie ne possède pas l'enzyme.

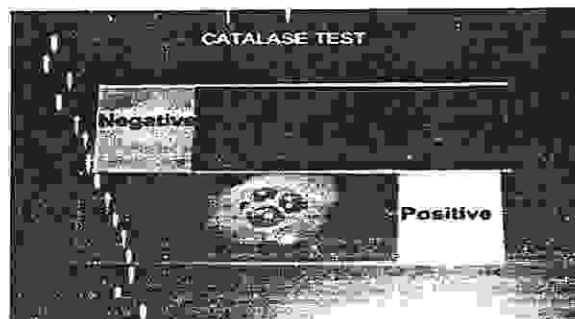
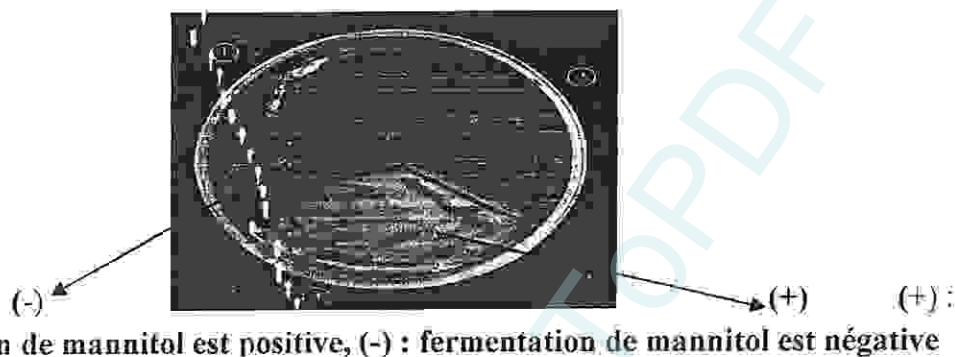


Figure N°11 ; lecture de la catalase

C-Mannitol :

Le milieu Chapman est ensemencé à l'aide d'une anse se platine puis incubé à 37°C pendant 24 heures. Après l'incubation l'apparition des colonies de staphylocoque pathogène et la fermentation du mannitol se traduit par le virage de couleur du milieu au jaune.



Figure°12 : lecture de mannitol

Tableau N°08 : caractéristiques des souches de Staphylocoque les plus fréquemment isolées :

Staphylocoque	<i>aureus</i>	<i>intermedius</i>	<i>epidermidis</i>	<i>Saprophyticus</i>
Catalase	+	+	+	+
Coagulase	+	-	-	-
Mannitol	+	-	-	-

D- La galerie API Staph :➤ **But :**

La Galerie API Staph prêts à l'emploi permettant de réaliser 20 tests biochimiques afin d'identifier le Staphylocoque.

➤ **Principe :**

La galerie API Staph comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les micros tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée en API Staph Medium qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification.

➤ **Mode opératoire :**

L'opération s'effectue selon les étapes suivantes :

- On Réunit fond et couvercle d'une boîte d'incubation et on répartit environ 5ml d'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.
- Introduire la suspension dans les tubes de la galerie en évitant la formation de bulles et on remplit uniquement les tubes (et non les cupules) des tests.
- Pour les caractères ADH, URE, remplir les cupules d'huile de paraffine.
- Incuber 24 heures à 37°C.



Figure N°13 : Galerie API Staph

➤ **Résultats :**

Noter sur la fiche de résultats tous les réactions spontanées, ensuite réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs : test NIT, ZYM, VP.

➤ **Identification :**

- Avec le tableau d'identification, on compare les résultats affichés sur la fiche des résultats avec celles du tableau ; chaque cellule de ce tableau contient le pourcentage de positivité.

- Avec le catalogue analytique : les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1ou2ou4) est positive suivant l'ordre de l'emplacement de la cupule dans le groupe, ensuite on obtient un nombre de 7 chiffres qui sert de code d'identification.

4-Antibiogramme :

A-Intérêt de l'examen :

L'antibiogramme permet d'étudier la sensibilité et la résistance des germes aux antibiotiques, les tests se manifestent à partir d'une culture pure.

Dans notre étude, l'antibiogramme a été réalisé par la méthode de diffusion sur gélose.

B- Principe général :

Pour réaliser l'antibiogramme par la méthode des disques, la culture bactérienne est effectuée à la surface d'une gélose spécialement étudiée, la gélose de Muller-Hinton

Des disques pré imprégnés d'une dose connue d'antibiotique sont déposés à la surface de la gélose. L'antibiotique diffuse à partir du disque en créant un gradient de concentration minimale inhibitrice. Les caractères de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne en seront déduits.

C-Préparation de l'inoculum :

A partir d'une culture pure inoculer suspension bactérienne. On met des colonies dans l'eau physiologie à raison de 10 ml.

D- Ensemencement :

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.

- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche de haut en bas en stries serrées.
- L'opération doit être répétée deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois.

- Dans le cas où on ensemence plusieurs boîtes de pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

E- Application des disques d'antibiotiques :

- Il faut mettre moins de 06 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90mm de diamètre, les disques d'antibiotiques doivent être espacés 24mm, centre à centre.
- Application des disques d'antibiotiques grâce aux distributeurs ou à l'aide d'une pièce.

F-Incubation :

A l'étuve pendant 18 à 24 heures à 37°C.

G-Lecture :

- Mesurer avec précision les diamètres d'incubation à l'aide d'une règle.
 - Classer la bactérie dans l'une des catégories : sensible, intermédiaire ou résistante.
 - Lorsque le diamètre de la souche testée est plus grand que le diamètre critique, la souche est déclarée comme sensible.
 - Lorsque le diamètre de la souche testée est plus petit que le diamètre critique, la souche est déclarée comme résistante.
 - Lorsque le diamètre de la souche testée est égal au diamètre critique, la souche est déclarée comme intermédiaire.
- 1- **Remarque:** Le choix de ces antibiotiques a été fait en fonction de leur spectre d'activité, ainsi que leur disponibilité au niveau des laboratoires de microbiologie.

Chapitre 2 :

Résultats et discussions

Produced by ScanTOPDF

1- Résultats de l'enrichissement :

Les résultats de l'enrichissement apparaissent après une culture de 24 heures. On a constaté un trouble au niveau de tous les tubes à l'exception le tube de l'enrichissement des instruments médicaux stériles.



Figure N°14 : Résultat de l'enrichissement

Sur la boîte de Pétri, ou on a effectué le prélèvement de l'air on remarque une culture riche en colonies de différents types avec la présence d'une colonie de champignon.

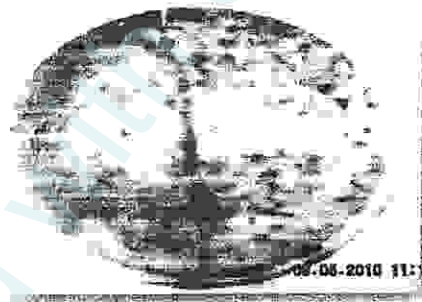


Figure N°15 : Les colonies obtenues à partir de l'air

2- Aspect macroscopique des colonies après l'isolement :

Après un temps d'incubation de 24 heures à 37°C, l'examen macroscopique sur les milieux utilisés Gélose Nutritive (GN), Chapman (Chap) et Mac Conkey (MC) a montré les différents caractères culturaux des colonies obtenus. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau N°09 : Résultats de l'isolement des différents prélèvements effectués

Milieu De prélèvement	GN	MC	Chap.
(1)	-Petites colonies Blanchâtres et blanches	-petites colonies Blanchâtres	-
(2)	- colonies de taille moyenne Blanchâtres. - petites colonies jaunes	-petites colonies rose à rouge. -petite colonies Blanchâtres.	-Petites colonies Jaunes -virage du milieu au jaune
(3)	-petites colonies jaunes	-	-petites colonies jaunes -virage du milieu au jaune
(4)	-petites colonies blanchâtre. -petites colonies jaunes.	Petites colonies roses.	-petite colonies jaunes -virage de milieu au jaune
(5)	-petite colonies blanches -virage du milieu au bleu-vert.	Petites colonies blanches	-
(6)	-petites colonies blanches	-	-petite colonies blanches
(7)	-grandes colonies blanchâtre. -Petites colonies jaunes. -petites colonies blanches.	-grandes colonies blanchâtres	-petites colonies blanches
(8)	-petites colonies jaunes et blanchâtres.	-petites colonies blanchâtres	-petites colonies blanches.

(-); absence de culture.

A partir des échantillons (2) et (7) et (5) qui correspond aux prélèvements à partir de pus et de l'air et chariot de soin, on a obtenu des colonies établies sur les trois milieux gélosés. (Fig. 15, 16, 17, 18,19).



Figure N°16 : culture sur Chapman à partir de l'échantillon (2)

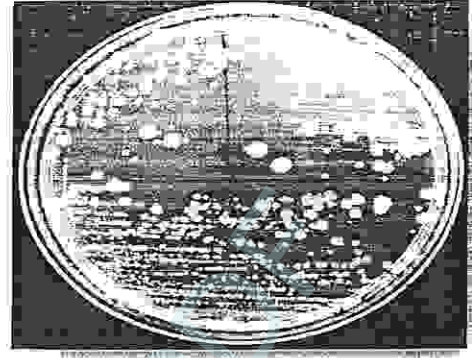


Figure N°17 : culture sur G.N à partir de l'échantillon (2)



Figure N°18: culture sur MacConkey à partir de l'échantillon (2)

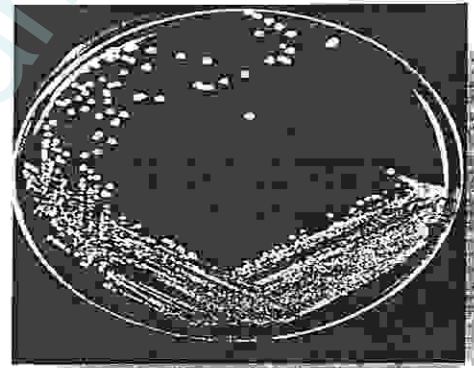


Figure N°19 : culture sur Chapman à partir de l'échantillon (7)



Figure N°20: culture sur G.N à partir de l'échantillon (5)

3- Examen microscopique :

Pour toutes les cultures positives, nous avons réalisés des examens directs à l'état frais et après coloration. Les résultats de la coloration de Gram et l'état frais résumés dans le tableau suivant :

Tableau N°10 : Résultat de l'examen microscopique à l'état frais et après coloration

N° de relèvement	Coloration de Gram	Etats frais
(1)	Coccobacille à Gram(-)	-Bacilles mobiles
(2)	Bacilles à Gram(-) Cocci à Gram(+)	-Bacilles mobiles -Cocci isolés en diplocoque ou en petites chaînettes immobiles
(3)	Cocci à Gram(+)	-Cocci isolés en diplocoques et en grappes de raisin immobiles
(4)	bacilles à Gram(-) Cocci à Gram(+)	-Bacilles allongés mobiles -Cocci isolés en diplocoques et en grappes de raisin immobiles
(5)	Bacilles à Gram(-)	-Bacilles droits très mobiles
(6)	Bacilles à Gram(+)	-Bacilles droits ou incurvés, en haltères et en palissade, immobiles
(7)	Cocci à Gram(+) Bacilles à Gram(-)	-Cocci isolés en diplocoque ou en petites chaînettes immobiles -Bacilles isolés ou groupés en deux ou en chaînes mobiles
(8)	Cocci à Gram(+) Bacilles à Gram(-)	-Cocci isolés en diplocoque ou en petites chaînettes immobiles - Bâtonnets allongés mobiles

Nous avons distingué trois types de cellules bactériennes à partir de toutes les colonies prélevées. (Fig.20, 21,22).

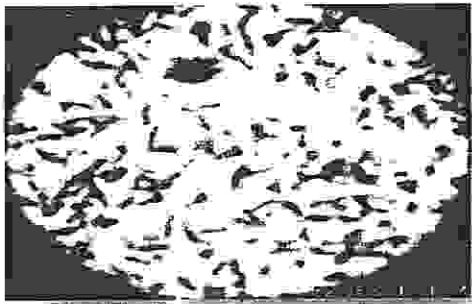


Figure N°21 : Observation microscopique des Bacilles à Gram (-)

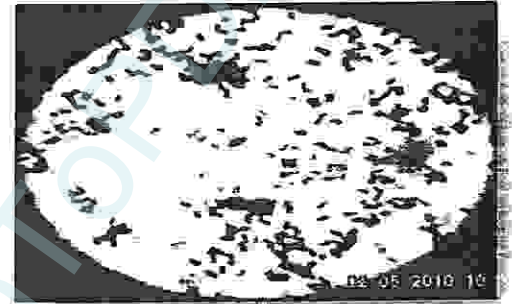


Figure N°22 : Observation microscopique des cocci Gram (+)

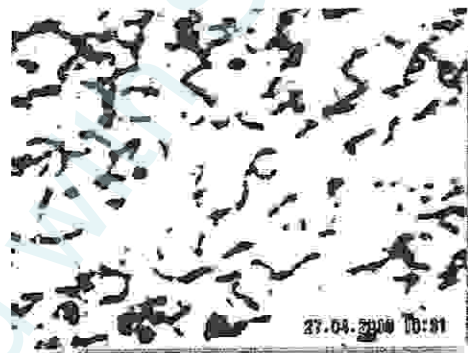
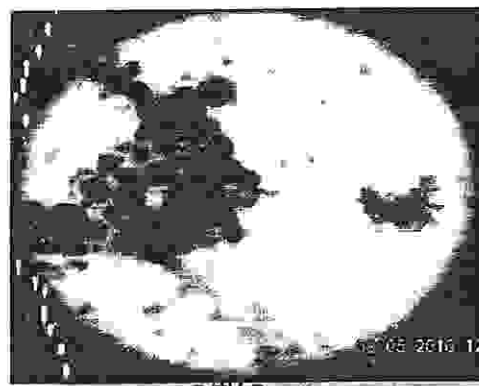


Figure N°23 : Observation microscopique des Bacille à Gram (-)

- Nous avons réalisé une coloration simple avec le bleu de méthylène à partir d'une colonie de l'échantillon (7) et nous avons observé des grandes cellules polynucléaires.



4- Identifications biochimiques :

4-1-pour les Entérobactéries :

➤ Résultat de la Galerie Api 20 :

Tableau N°11 : Résultats de la galerie API 20 E

N° de prélèvement	Code	Espèce
(2)	0736000	<i>Proteus mirabilis</i>
(6)	1614772	<i>Citrobacter freundii</i>

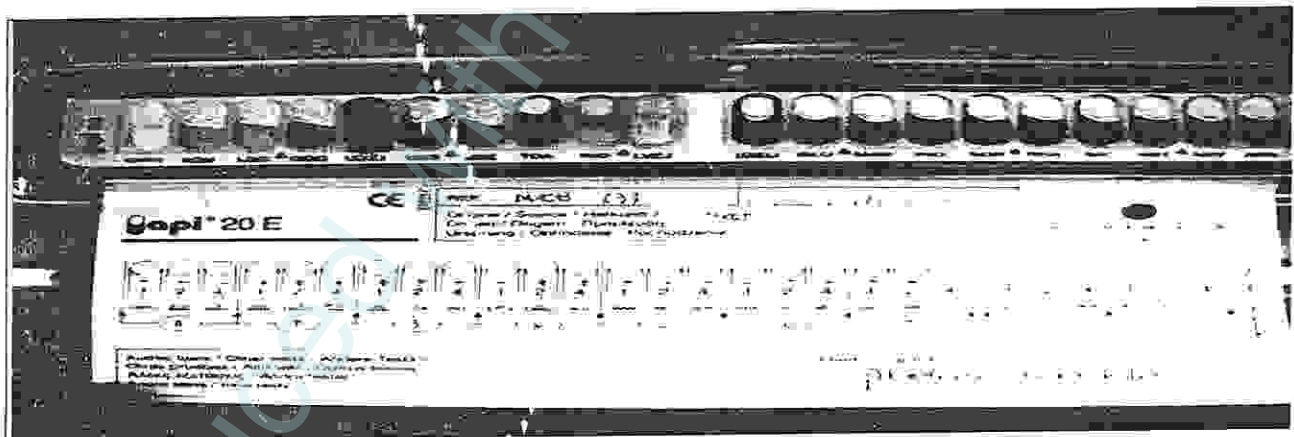


Figure N°25 : Les galeries API 20 E après l'incubation à partir de l'échantillon (2) et (6)

➤ Résultats des galeries biochimiques classiques :

Les résultats des galeries biochimiques classiques pour l'identification des différents types des Entérobactéries sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau N°12 : résultats des galeries biochimiques classiques

Test Germes identifié	TST			Citrate de Simmons	Mannitol-moabite		Urée	Indole	Bouillon nitrate	Clark et lubs	
	H ₂ S	gaz	sucres		mannitol	mobilité				VP	RM
(2) <i>E. coli</i>	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+
(7) <i>Acetobacter</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
(4) <i>Citrobacter freundii</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
(1) <i>Providencia</i>	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+



Figure N°26 : Galerie biochimique classique pour *Providencia* à partir de l'échantillon (1)

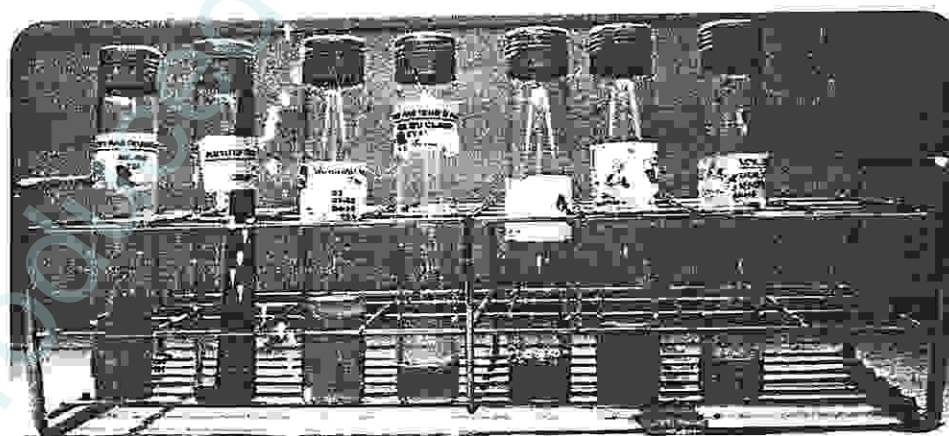


Figure N°27 : Galerie biochimique pour *E. coli* à partir de l'échantillon (2)

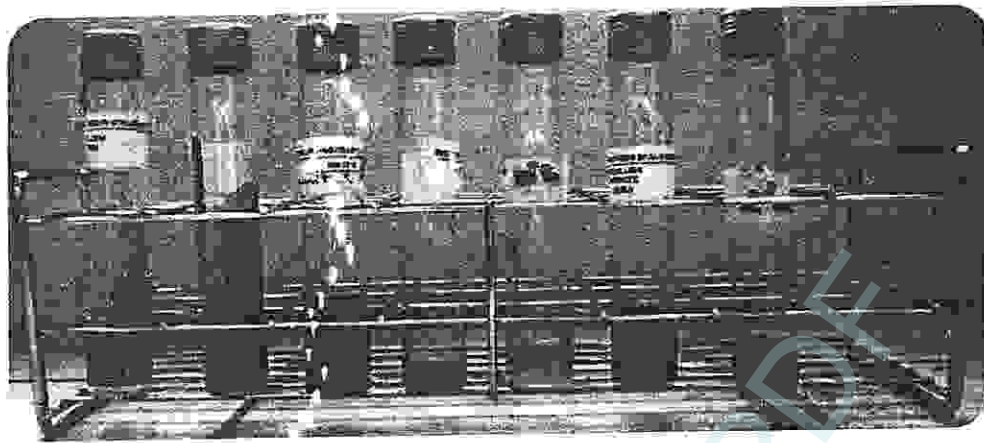


Figure N°28 : Galerie biochimiques classiques pour *Citrobacter freundii* à partir de l'échantillon (4)

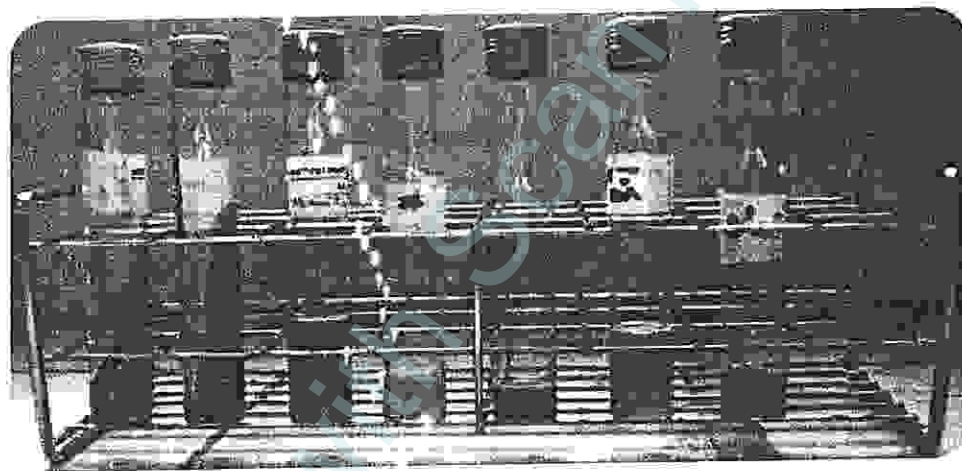


Figure N° 29: Galerie biochimiques classiques pour *Acénetobacter* à partir de l'échantillon(7)

4-2-pour les Staphylocoques :

➤ Résultat de la galerie API Staph :

Tableau N°13 : résulta de la galerie API Staph.

N° de prélèvement	code	espèce
(8)	6706113	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

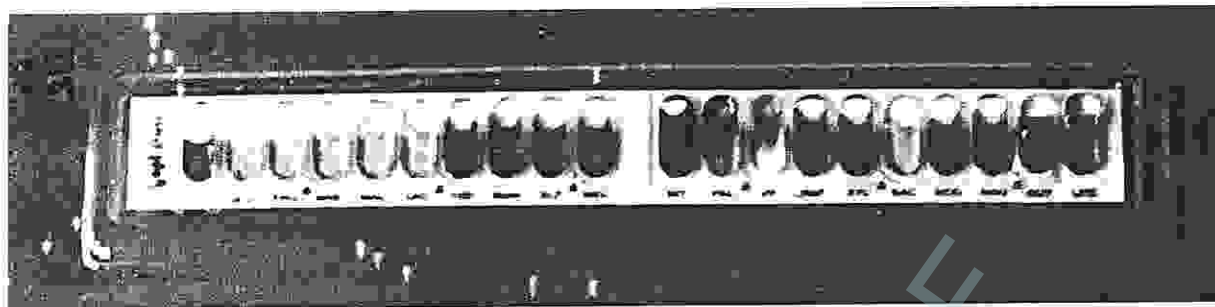


Figure N°30: Galerie API Staph après l'incubation à partir de l'échantillon (8)

➤ **Résultat de la fermentation du mannitol, et du test staphylocoagulase et du test catalase :**

La caractérisation de *staphylococcus aureus* est obtenue par la fermentation du mannitol ensemencé par des colonies présentant une hémolyse et coagulase positive alors que la présence de *staphylococcus epidermidis* est confirmée par une mannitol et coagulose négative. (Tableau I)

Tableau N°14: Identification des staphylocoques à partir des différents prélèvements

test Prélèvement	Fermentation de mannitol	Coagulase	Catalase
(2)	+	+	+
(3)	+	+	+
(7)	-	-	+
(8)	-	-	+

(+) : positif; (-) : négatif

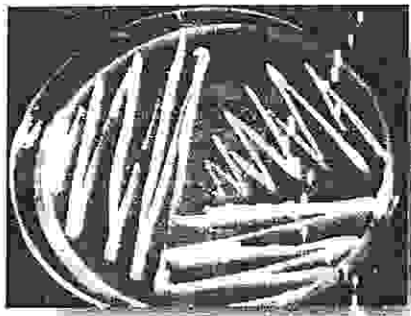


Figure N°31 : le test mannitol de l'échantillon (2)



Figure N°32 : le test mannitol de l'échantillon (7)

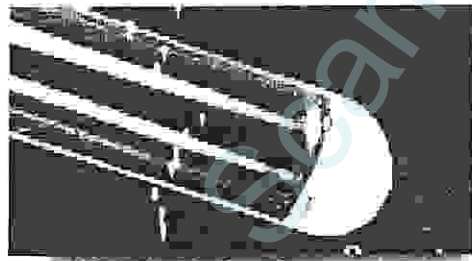


Figure N°33: le test Coagulase de l'échantillon(2)



Figure N°34 : le test coagulase de l'échantillon (7)

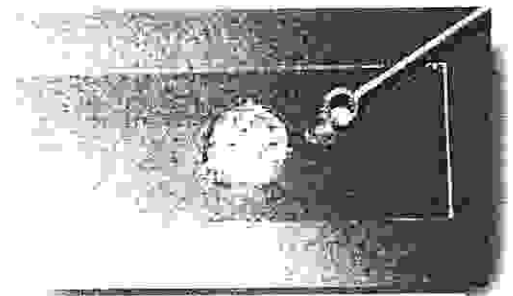


Figure N°35 : le test catalase de l'échantillon(3)

4-3- pour les *Pseudomonas* :

➤ Résultats de l'oxydase et les milieux sélectifs :

Pour la caractérisation de l'espèce du genre *Pseudomonas*, la culture sur King A et King B ainsi que le test de l'oxydase ont permis l'identification de *Pseudomonas aeruginosa* (tab12).

Tableau115: identification des *Pseudomonas aeruginosa*

Test	Oxydase	King A	King B
Prélèvement (5) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+

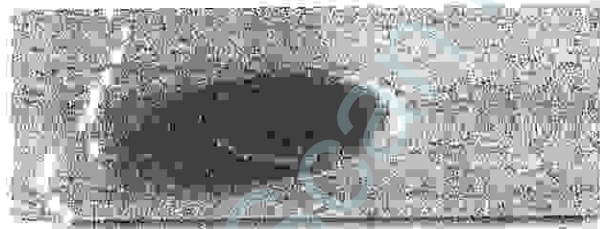


Figure N°36 : le test oxydase de l'échantillon (5)

Après l'incubation du milieu King A à 37°C pendant 24 heures nous avons observé la présence de pyocyanine qui se traduit par la couleur.



Figure N°37: test King A après l'incubation

5- Antibiogramme des germes isolés :

Les résultats d'antibiogrammes effectués sur deux souches bactériennes et 8 antibiotiques 5 annexes permis d'obtenir les résultats mentionnés dans le tableau ci-dessous :

Antibiotiques / Souches	NI	VA	PT	S	C	DO	CAZ	L
<i>E. coli</i>	I	R	I	S	S	R	I	R
Staphylocoque	I	R	S	S	S	R	R	S

R : Résistant

S : Sensible

I : Intermédiaire

Discussion

Les différents tests effectués à partir de 9 prélèvements au niveau deux services de l'hôpital El Hakim Okbi de Guelma qui sont : chirurgie femme et l'orthopédie ont permis d'identifier des espèces bactériennes pathogènes tel *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, ou pathogènes opportunistes tel *Staphylococcus épidermidis*.

Nous avons mis en évidence dans ce travail émergence de bactéries dans l'environnement immédiat du malade représenté par *Staphylococcus* (*S.aureus* et *S.épidermidis*), *Acinetobacter*, *Citrobacter* et ceci dans le pus, les mains, lit de malade et l'air.

Le lit de malade est contaminé par *Citrobacter freundii* : le même germe à été identifié au niveau du sol de la salle de soins dont le passage est réservé uniquement aux personnels ce qui représente une source majeur de contamination par ce germe.

On note aussi la présence de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau du chariot de soins et des instruments médicaux de soins.

L'absence des germes au niveau de prélèvement des instruments médicaux stériles montre que la stérilisation de ces instruments est efficace.

L'existence de cette variété d'espèces bactériennes au niveau de plusieurs sites plus ou moins en contact direct avec le malade, peut être expliquer par des contaminations croisées dues au mouvement du personnel et au des instruments entre ces différents services.

Conclusion

Produced with ScantOPDF

Conclusion

Dans notre travail basé sur l'isolement et l'identification des germes responsables des infections nosocomiales, les résultats recueillis par notre étude nous montrent que la contamination des deux services « chirurgie femme et orthopédie » par des bactéries relativement pathogènes ce qui expose les malade, dont l'état physiologique est fragile, à une affection non négligeable. L'importance de cette étude est de palier ce problème, en faisant la relation entre l'environnement d'un malade hospitalisé et les germes responsables d'une infection nosocomiale.

L'étude de l'antibiogramme sur les germes isolés a montré que certaines d'entre eux sont résistantes aux antibiotiques et de ce fait il est indispensable de faire un choix judicieux avant l'utilisation des antibiotiques bien sure en fonction du germe identifier.

Enfin nous recommandons que La clé de la prévention de ces infections passe par un contrôle de l'hygiène, au cours des procédures ou des soins effectués chez les malades.

Référence Bibliographique

Produced by ScantOPDF

Référence Bibliographie

Les livres :

- Acar,j.L,Baquero.F,Begue.PetCarbon.C(1997) ; Les cahiers de l'ICCAAC.Paris Pp :30-34.
- Cordonnier C,Herbrecht R.(2000) infection en hématologie ,ed.Arnette.Paris,PP232
- Comité technique nationale des infections nosocomiales (1997) ; Enquête national des prévalences des IN Ministère du travail et des sociales. Paris.Pp :10-12.
- Diakaria thèse de doctorat en pharmacie Pp8-13.
- Ferron .A (1983) ; Bacteriologie médicales .Cet R .Madeleine.p :375
- Jepson.O.B ,Oleson.S,LarsonL,DankertJ,Dashner.F,Gronroos.P.S,Nystam.B,Rotter.M and Sandler .J(1982) ;Urinary tractinfections and bactereamia in hospitalized medical patient Pp:241-252.
- Legyon.R (1960) ;Précis de bacteriologie.Doin etC.PARIS Pp :945.
- Mergoud. Lilia (2004) ; études bactériologiques des bactéries isolées en milieu hospitaliers .Mémoire de magister en Microbiologie appliquée de l'université de Badji Mokhtar Annaba. Pp :2-17.
- Otmane ; cours de l'hygiènes hospitaliers Pp3-7.
- Nauciel C.(2000)Bacteriologie medical,edMasson,Paris pp309
- Samou thèse de doctorat en médecine Pp7-11.
- Stammn .E(1986) ;Nosocomial urinary tract infection Bennt.Rachman.P.Shospital infection .Pp:374-384.

Les sites Web :

- [1] www.groupe-main-provence.com...infections-nosocomiales.pdf (10.02.2011).
- [2] www.samic-inf.com...infections_nosocomiales_cours_de_residanat_2008.pdf (18.03.2011).
- [3] infections_nosocomialewww.ac-paris.frportailjcm脾1...infections-nosocomiales (20.03.2011).
- [4] [http://www.utc.fr/~farges/dess_tbh/99_00/Projets/Infections Nosocomiales IN/transmission_infection.gif](http://www.utc.fr/~farges/dess_tbh/99_00/Projets/Infections_Nosocomiales_IN/transmission_infection.gif) (26.04.2011).
- [5] emc.42t.com...Infections%20nosocomiales%20%5B8-001-F-10%5D.pdf (28.04.2011).
- [6] www.samic-inf.com...infections_nosocomiales_cours_de_residanat_2008.pdf (16.05.2011).
- [7] microcsb.netIMGpdfBoye_Agents_d_Infections_nosocom_texte_EPU.pdf (04.04.2011).
- [8] www.laprovence.com/t/Infections-nosocomiales (02.05.2011).
- [9] toubkal.imist.ma/bitstream/123456789/6679/3/THESE_CHAMI.pdf (03.05.2011).
- [10] www.rhbn.org/attachm ents/035_Vabret.pdf (28.02.2011).
- [11] cat.inist.fr/?aModele=afficheN&epsidt=2650333 (07.03.2011).
- [12] microcsb.netIMGpdfBoye_Agents_d_Infections_nosocom_texte_EPU.pdf (05.05.2011).
- [13] didel.script.univ-paris-diderot.fr/claroline/backends/download.php (17.03.2011)
- [14] <http://www.cns.fr/spip/Acinetobacter-pathogene.html> (16.05.2011).
- [15] www.invs.sante.frsurveillance...agents...fiche_shigella.pdf (29.04.2011).
- [16] www.medix.free.fr/.../staphylocoque-bacteriologie.php (10.05.2011).
- [17] www.sante.gouv.fr/les-infecti ons-nosocomiales.html - (01.03.2011).
- [18] infections_nosocomialewww.ac-paris.frportailjcm脾1...infections-nosocomiales (05.05.2011).
- [19] www.infectiologie.org.tnpdfrevuesrti4bacteries.pdf (09.03.2011).
- [20] www.bergonie.org/fr/l-institut/les.../clin.html (24.02.2011)
- [21] www.samic-inf.com...infections_nosocomiales_cours_de_residanat_2008.pdf - (04.05.2011).

Annexe

Produced with ScantOPDF

ANNEXE 01**➤ Les milieux de cultures :****1-Milieu de Chapman :****Composition :**

-Peptone tryptique de caséine.....	2 gr
-Extrait de viande	1 gr
-Protéose peptone N°3.....	9 gr
-Na Cl.....	75 gr
-Mannitol.....	10 gr
-Agar.....	15 gr
-Rouge de phénol.....	0.025 gr
-Eau distillée.....	1000 ml

Préparation :

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

2-Milieu gélosé de Mac conkey :**Composition :**

-bio-gelytone.....	17gr
-bio- Polytone	3gr
- Agar.....	12gr
-Lactose.....	10gr
-Sel biliaires.....	5gr
-Na Cl.....	5gr
-Rouge neuter.....	0.04 gr
-eau distillé.....	1000ml

Préparation :

Après dissolution tous les ingrédients dans l'eau distillée ajuster le pH à 7.4 et stériliser à 121°C pendant 20mn

3- Gélose nutritive :**Composition :**

-Extrait de viande de bœuf.....	1gr
-Extrait de levure.....	2gr
-Peptone.....	5gr
- chlorure de sodium.....	5gr

-Agar..... 15gr

Préparation :

Après dissolution de tous les ingrédients dans l'eau distillée ; ajuster le Ph à 7.4 et stériliser à 120° pendant 20mn.

4-Milieu King A :

Composition :

-Bacto-peptone..... 20g
 -Agar..... 15g
 -Glycérol C.P..... 10g
 -K₂H₂SO₄ anhydre..... 15g
 -MgCL₂ anhydre 1.4g
 -Eau distillée..... 1000 ml

Préparation :

45 g de poudre par litre, Stérilisation classique, ajouter 10 cm³ de glycérol après autoclavage.

5-King B :

Composition :

-Protéose peptone(Difco)..... 20g
 -Agar..... 15g
 Glycérol C.P..... 10g
 -K₂HPO₄..... 1,5g
 -MgSO₄ anhydre..... 1.4g
 -Eau distillée..... 1000ml

Préparation :

37 g de poudre par litre, Stérilisation classique., ajouter 10 ml de glycérol après autoclavage.

6-Milieu TSI :

Composition :

-Agar
 -Extrait de bœuf
 -Extrait de levure
 -Peptone
 -Lactose
 -Saccharose

- NaCl
- Glucose
- Citrate ferrique
- Thiosulfate de sodium
- Rouge de phénol
- Eau distillée

Préparation :

Après dissolution de tous les ingrédients dans l'eau distillée ; ajuster le pH à 7,4 et stériliser à 121°C pendant 20 mn.

7-Milieu citrate de Simmons :**Composition :**

- Chlorure de sodium
- Sulfate de magnésium 74 O
- Phosphate d'ammonium PO H
- Phosphate di potassique PO HK
- Citrate trisodique
- Solution de bleu bromothymol 1%
- Agar
- Eau distillée

Préparation :

Après dissolution de tous les ingrédients dans l'eau distillée, ajuster le pH à 7-7,2

- Répartir en tube à raison de 7 ml par tube
- Stériliser à 115°C pendant 30 mn

8-Milieu mannitol-Mobilité :**Composition :**

- Peptone pancréatique de viande
- Agar-agar
- Mannitol
- Nitrate de potassium
- Rouge de phénol solution à 1%

Eau distillée

Préparation :

Après dissolution de tous les ingrédients dans l'eau distillée, ajuster le pH à 7,2

- Répartir en tube à raison de 8 ml par tube.

-Stériliser à 110°C pendant 30 mn

9-Milieu de Clark et Lubs :

Composition :

-Peptone tryptique de caséine

-Phosphate bi potassique

Glucose

Eau distillée

Préparation :

-Répartir en tube à raison de 5 ml par tube.

-Stériliser à 115°C pendant 20 mn

10-Milieu urée indole :

Composition :

-L-Tryptophane

-Phosphate mono potassique

-Phosphate di potassique

-Chlorure de sodium

-Urée

-Alcool à 90°

-Solution rouge de phénol à 1%

-Eau distillée

Préparation :

-Stériliser par filtration sur membrane

-Répartir en tube à raison de 15 ml par tube et stoker

11-Eau peptone Exempte d'Indole :

Composition :

-Peptone Exempte d'Indole

-Chlorure de sodium

-Eau distillée

Préparation :

-Mettre 15g de milieu déshydraté dans un litre d'eau distillée

-Mélanger soigneusement jusqu'à complète dissolution

-Ajuster, si nécessaire, le Ph à 7,2, Répartir puis stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 15 mn.

ANNEXE 02 :

➤ Les tableaux de lectures des API :

Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api Staph

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats		
			Négatif	Positif	
0	Aucun	Témoin négatif	Rouge	-	
GLU	D-glucose	Témoin positif	Rouge	Jaune	
FRU	D-fructose	Acidification à partir du carbohydre			
MNE	D-mannose				
MAL	Maltose				
LAC	Lactose				
TRE	D-tréhalose				
MAN	D-mannitol				
XLT	Xylitol				
MEL	D-melibiose				
NIT	Nitrate de potassium				Réduction des nitrates en nitrites
				Incolore rose	Rouge
PAL	β -naphthyl ac.phosphate	Phosphatase alcaline	ZYMA + ZYMB / 10 mn		
			Jaune	Violet	
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétyl méthyl-carbonyl	VP 1 + VP 2 / 10 mn		
			Incolore rose	Violet rosé	
RAF	Raffinose	Acidification à partir du carbohydre	Rouge	Jaune	
XYL	Xylose				
SAC	Saccharose				
MDG	α -méthyl-D- glucosamine				
NAG	N-acétyl-glucosamine				
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange rouge	
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge violet	

Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api 20E

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	Ortho-nitro-phényl-galactoside	Beta-galactosidase	incoloré	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge orangé
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orangé
ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge orangé
CIT	Citrate de sodium	Utilisation du citrate	Vert pâle jaune	Bleu-vert vert
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	incoloré grisâtre	Dépôt noir / fin liséré
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA : Immédiat	
			jaune	Marron foncé
IND	Tryptophane	Production d'indole	IND : 2 mm maxi	
			jaune	Anneau rouge
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétone	VP 1 + VP 2 : 10 min	
			incoloré	Rose-rouge
GEL	Gélatine de Kolm	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	Glucose	Fermentation oxydation	Bleu bleu-vert	Jaune
MAN	Mannitol	Fermentation oxydation	Bleu bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation oxydation	Bleu bleu-vert	Jaune
SOR	Sorbitol	Fermentation oxydation	Bleu bleu-vert	Jaune
RHA	Rhamnose	Fermentation oxydation	Bleu bleu-vert	Jaune
SAC	Saccharose	Fermentation oxydation	Bleu bleu-vert	Jaune
MEL	Melibiose	Fermentation oxydation	Bleu bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation oxydation	Bleu bleu-vert	Jaune
ARA	Arabinose	Fermentation oxydation	Bleu bleu-vert	Jaune
Ox	Sur papier filtre	Cytochrome-oxydase	Ox : 5-10 min	
			incoloré	Anneau violet
NO ₃ -NO ₂	Tube GLL	Production de NO ₂	NIT 1 + NIT 2 : 2-3 min	
		Réduction au stade N ₂	Jaune	Rouge
			Zn	
			Rouge	Jaune
MOB	Microscopie	Mobilité	Immuable	Mobile
MAC	Milieu de MacConkey	Culture sur	Absence	Présence
OF	Glucose	Fermentation : sous voile Oxydation : à l'air	Vert Vert	Jaune Jaune
CAT		Possession d'une catalase	H ₂ O ₂ : 1-2 min	
			Pas de bulles	Bulles

Résumé

Produced with ScantOPDF

Résumé :

La détection des germes responsables des l'infections nosocomiales doivent subis une étude complète de sensibilité et la résistance aux antibiotiques.

Notre étude réalisée au niveau des deux services « orthopédie et chirurgie femme » de l'hôpital El Hakim O'kbi pour à permet d'isoler dans différents microenvironnements (l'air et surfaces sèche) de ces services et chez des patients adultes des bactéries talque : *Pseudomonas*, *Staphylocoques* et *Entérobactéries*

Le test de sensibilité aux antibiotiques par de diffusion sur milieu solide à montré une multi résistance de ces souches.

Mots clés : infections nosocomiales, isolement, identification, environnements hospitaliers, sensibilité et résistances aux antibiotiques.

Produced with ScanTOPDF