



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES – FES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE



PROJET DE FIN D'ETUDES

Licence en Sciences & Techniques :
Sciences Biologiques appliquées et Santé

**Identification des germes isolés au
niveau de pus**

Présenté par : Oumayma Chajai

Encadré par :

Pr. sbiti Mohamed: hopital Moulay Ismail Meknès

Pr. Sanae Guissi : FSTF

Soutenu le : 16 /06/ 2015

Devant le jury composé de :

Pr .Sanae Guissi : Encadrante.

Pr.Sbiti Mohamed : Encadrant.

Pr.Squalli Hakima : Examinatrice.

Année Universitaire : 2014-2015

Remerciements :

C'est avec une profonde gratitude et de sincères sentiments que je dédie ce modeste travail de fin d'étude à toute ma chère famille et à tous mes amis pour leur présence, leur soutien et leurs encouragements durant tout mon cursus universitaire.

Au terme de mon stage que j'ai effectué au sein de **l'hôpital Moulay Ismail de Meknès**, j'aimerais remercier vivement le directeur de l'hôpital qui m'a accueillie au sein de son laboratoire médical.

Mes vifs remerciements s'adressent également à monsieur le professeur **Lhoussine Louzi , Dr Rochdi et Dr. sbiti** pour leur aide précieuse, et pour les informations et les conseils qu'ils m'ont fournis, ainsi que pour leur disposition et leur générosité.

Je remercie aussi bien mon encadrante, le professeur **Sanae Guissi**, professeur de biologie moléculaire à la FST, pour sa disponibilité, ses conseils, son suivi et son aide si précieuse.

A l'ensemble du personnel et des techniciens de l'hôpital, pour leur chaleureux accueil et leur soutien tout au long de la période de mon stage, qu'ils trouvent, eux aussi, l'expression de ma profonde reconnaissance.

J'adresse mes remerciements également à tous les enseignants de FST qui ont contribué à ma formation pendant cette année et particulièrement aux enseignants de la licence SBAS.

Enfin, je remercie vivement Mme le professeur **Squalli Hakima**, d'avoir accepté d'assister à l'exposition du projet et de juger ce modeste travail.

Description de lieu de stage :

Mon stage a été effectué au laboratoire de biologie médicale de l'hôpital Militaire Moulay Ismail-Meknès ; cet hôpital polyvalent a une capacité de 294 lits et comporte plusieurs services à savoir la chirurgie, la médecine interne et la réanimation.

Le laboratoire comprend une salle d'accueil des patients et quatre salles de prélèvements et il prend en charge les analyses des patients de l'hôpital et des patients externes dans les services suivants:

- Transfusion
- Biochimie
- Hématologie
- Bactériologie
- Parasitologie-mycologie
- Sérologie-immunologie

Les prélèvements proviennent des patients hospitalisés et aussi des externes (militaires et leurs familles ainsi que les civils), après le remplissage du bon de demande d'examen et les documents obligatoires.

Liste des figures :

Figure 1 : Vue microscopique de *Staphylococcus aureus* :
Grossissement (X100) : 12

Figure 2 : vue microscopique de *streptococcus* grossissement (X100) : 13

Figure 3 : milieux de développement des anaérobies : 16

Figure 4 : Classifications des bactéries anaérobies strictes : 17

Figure 5 : exemple d'antibiogramme d'une souche sensible et une résistante : 18

Figure 6 : les différents récipients utilisés pour le prélèvement de pus : 21

Figure 7 : milieu Chapmanensemencé : 23

Figure 8 : gélose au sangensemencée : 24

Figure 9 : test d'oxydase : 25

Figure 10 : schéma de déroulement de certains tests pour l'identification biochimique 26

Figure 11 : schéma d'une galerie API : 26

Figure 12 : Schéma de l'ECB de pus : 27

Figure 13 : fréquence de l'infection purulente enregistrée chez les patients : 28

Figure 14 : répartition des patients internes et externes : 29

Figure 15 : Répartition des patients selon le sexe : 29

Figure 16 : histogramme de la répartition des germes selon les services : 30

Figure 17 : répartition des germes purulents : 31

Sommaire :

Introduction	1
Partie 1 : Bibliographie	
I. Définition de pus.....	1
II. Genèse de pus.....	2
III. Origine de pus.....	2
1) Les pus ORL.....	2
2) Les pus cutanés	2
3) suppuration abdominale et autres localisations viscérales	3
4) Abscesses du cerveau	3
IV. germe recherché dans le pus	3
1- staphylocoques	3
1.1- Définition	3
1.2- Pouvoir pathogène.....	4
2- streptocoques	5
2.1- définition	5
2.2- classification	5
2.3- pouvoir pathogène	6
3- entérobactéries	6
3.1- caractéristique.....	6
3.2- pouvoir pathogène	7
4- Pseudomonas aeruginosa	7
5- les anaérobies.....	7
5.1-classification.....	9
5.2- habitat et pouvoir pathogène.....	9
V. antibiogramme	10
Partie 2 : matériel et méthode	
I. Matériel.....	12
1) Fiche de renseignements	12
II. Méthode.....	12
1) prélèvement de pus.....	12
1.1) conditions de prélèvements.....	13
1.2) transports	13
2) examen cyto bactériologique de pus.....	14
2.1) examen macroscopique.....	14
2.2) examen microscopique	14
Partie 3 : résultats et discussion	

1) Résultats	20
2) Discussion.....	24
Conclusion	25
Annexes	26
Références bibliographiques	28

But de stage

Ce stage, qui s'inscrit dans la formation de la licence SBAS m'a permis d'aborder des situations nouvelles en découvrant le monde du travail. Ainsi, il m'a aidé à concrétiser les connaissances acquises pendant ma formation en pratiquant plusieurs techniques d'analyses microbiologiques, dont l'analyse cyto bactériologique de pus qui fera l'objet de notre travail.

En effet, ce travail va porter sur l'identification des germes présents dans le pus de certains patients souffrant de différentes infections et qui se sont présentés à l'hôpital militaire Moulay Ismail de Meknès.

Introduction :

La bactériologie est la science qui a pour but d'identifier les bactéries, les classer et étudier leurs différentes interactions.

La bactériologie médicale a pour but la mise en évidence éventuelle des souches qui sont la source d'infections de l'homme.

L'examen bactériologique nécessite un échantillon prélevé de l'organisme (prise de sang, biopsie, etc.). Cet échantillon peut s'agir du sang, du pus, des crachats, d'excrétion, d'urines

Le prélèvement réalisé est tout d'abord examiné à l'aide du microscope puis coloré pour identifier les cellules comme les globules blancs. L'examen microscopique autorise également la mise en évidence de certaines bactéries.

Une coloration spécifique appelée Gram donne la possibilité d'établir la distinction entre les bactéries Gram positives et Gram négatives.

Partie 1 : Etude bibliographique

I- Définition du pus :

Le pus est un liquide épais de coloration blanche ou jaunâtre qui peut s'accumuler puis s'écouler au niveau des zones subissant une infection. Il est composé d'un mélange de globules blancs, de débris de cellules mortes et de bactéries. [1]

Le pus englobe toutes les suppurations qu'elles soient superficielles ou profondes. Il existe des suppurations primitives et des suppurations post chirurgicales ou post-traumatiques. [1]

Les prélèvements de pus sont très fréquents et constituent la majeure partie de l'activité d'un laboratoire de bactériologie.

Le pus résulte de la lutte de l'organisme contre l'invasion microbienne. Le microbe pyogène est généralement à l'origine de la suppuration. Il possède la capacité de provoquer une accumulation locale de polynucléaires neutrophiles dont la multiplication s'active en cas d'infection.

Une infection suppurée localisée peut être présente dans n'importe quel région ou organe du corps.

Elle peut être due soit à :

- ✓ Un traumatisme suivi d'une contamination bactérienne.
- ✓ Une modification des conditions locales qui rendent un tissu sensible aux bactéries de la flore normale locale.
- ✓ Une extension d'une lésion contiguë ou une greffe métastatique du germe propagé par le sang ou la lymphe [1]

II- Genèse du pus :

La formation du pus est l'un des signes les plus caractéristiques d'une infection.

Le pus est constitué de cellules à activité phagocytaire (en général des polynucléaires neutrophiles altérées) et de bactéries.

Ces cellules sont attirées au foyer infectieux par diverses substances constitutives de la paroi des bactéries : la muréine joue le rôle le plus actif, mais d'autres polysaccharides possèdent aussi cette propriété.

Les germes dont la paroi est la plus riche en muréine (staphylocoques, streptocoques) attirent massivement les polynucléaires et dans ce cas, le pus devient abondant. Il s'agit des germes pyogènes.

Les phagocytes subissent ensuite, au foyer infectieux, certaines dégradations dues à l'action de substances sécrétées par les bactéries [2].

III- Origine du pus :

1- Les pus ORL :

Dans ce type de pus, on distingue 3 origines :

➤ Pus oculaire :

Il provient de l'infection de la conjonctivite, de la cornée ou du canal lacrymal. Dans ce type de pus, sont présents très souvent, des *streptococcus pneumoniae*, *heamophilus*, *streptococcus* des groupes : A, C, G, B. Aussi, il peut y avoir des Entérobactéries et des *Pseudomonas*. [1,3]

➤ Pus de sinusites :

Les germes abondants dans ce pus sont les *staphylococcus aureus*, *streptococcus* et les bactéries anaérobies. [1,3]

➤ Pus de l'oreille :

Il accompagne l'inflammation du conduit auditif au cours des otites externes. Les agents étiologiques sont les même que ceux de l'œil. [1,3]

2- Les pus cutanés :

➤ Infection à bactéries pyogènes :

Staphylococcus aureus et *streptococcus* du groupe A se partagent la majorité des infections cutanées, les lésions bulbeuses de l'impétigo, les infections des folliculites infectieuses et le furoncle. [1,3]

➤ Infections des plaies :

Une plaie se forme lorsque le revêtement cutané ou muqueux est altéré sur une plus ou moins grande surface. Cette altération constitue déjà en elle-même un facteur favorisant l'infection.

Ainsi, la formation d'une plaie s'accompagne de saignement et donc de la constitution de caillots ; dans ce cas, les cellules les plus superficielles sont nécrosées. Les produits de cette nécrose et les caillots forment des substrats utilisables par les bactéries.

Le développement microbien ne sera pourtant durable que si les défenses de l'organisme sont diminuées : une infection de plaie s'installera et persistera facilement sur des plaies dont la résistance à l'infection est plus ou moins perturbée, en particulier, du fait d'une diminution de l'irrigation et de l'oxygénation des tissus lésés.

Ainsi, les germes isolés des prélèvements de plaie appartiennent presque toujours à l'environnement immédiat de la lésion : *Staphylococcus*, Entérobactéries (*E. coli*, *Proteus*), *Pseudomonas* mais aussi *Streptococcus*. [1,3]

3- Suppuration abdominale et autres localisations viscérales :

Elles peuvent apparaître à la suite d'une opération chirurgicale de l'abdomen. Les bactéries de la flore intestinale sont à l'origine de ces complications. On retrouve presque toujours dans une suppuration abdominale une association de plusieurs bactéries dont une au moins est anaérobie.

E. coli est la plus abondante dans ces prélèvements mais on peut rencontrer également d'autres bactéries aérobies ou bien l'association de plusieurs germes (aérobies et anaérobies).

Les abcès hépatiques spléniques peuvent être présents à partir d'un abcès abdominal. [1,3]

4- Abcès du cerveau :

Les germes anaérobies sont les plus recherchés. [1,3]

IV- Les germes recherchés dans le pus :

1- les staphylocoques :

1.1- définition :

Ce sont des bactéries du genre coques (cocci) à gram positif, groupées en amas et ayant la forme de grappes de raisins. Elles sont des commensales de la peau et de la muqueuse de l'homme et des animaux.

Les staphylocoques sont non sporulés, immobiles et habituellement non capsulés. Ils sont aussi aérobies, anaérobies facultatifs et se cultivent facilement sur les milieux ordinaires [4].

Actuellement, 50 espèces sont mises en évidence. *Staphylococcus aureus* (staphylocoque doré) est le germe le plus pathogène. La production d'un pigment jaune doré par cette espèce le caractérise par rapport aux autres staphylocoques dits blancs [5].

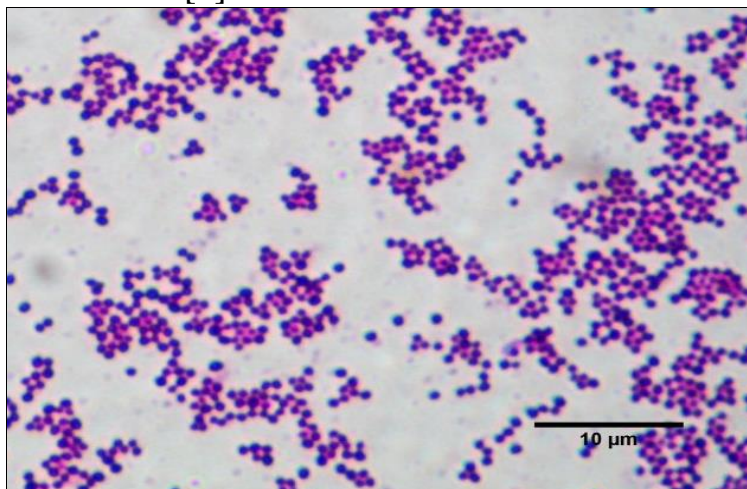


Figure1 : Vue microscopique de *Staphylococcus aureus* :
Grossissement (X100)

Le *S.aureus* est dit microbe de la suppuration, il fut démasqué à la fin du 19^{ème} siècle. L'observation au microscope fut apparaitre des amas de grains dans le pus de furoncles.

D'abord observé par Robert Koch en 1878, il fut reconnu par Louis Pasteur deux ans plus tard en 1881. Alexander Ogston est le chercheur qui isola la bactérie à partir d'abcès post opératoire. [5-6]

1.2- pouvoir pathogène :

Il résulte de plusieurs sécrétions particulières :

a) Enzymes :

La lipase : produite par 80% des souches, cette enzyme semble constituer un facteur de virulence dans les abcès.

La désoxyribonucléase : c'est un facteur de destruction des noyaux cellulaires et intervient dans la formation des lésions tissulaires.

La fibrinolyse : est caractéristique des souches pathogènes humaines. En activant la plasminogène en plasmine, elle provoque la septicémie et la localisation septique secondaire. [7]

b) Toxines :

Il existe 5 principales toxines dont l'importante est l'alpha hémolysine. Elles sont dermonécrotiques et létales. Leur pouvoir nécrotique est très apparent dans certaines lésions staphylococciques, car elles sont capables d'agglutiner les plaquettes. Elles sont actives sur les macrophages et inactives sur les polynucléaires. [5]

- Les toxines ne sont pas présentes dans toutes les souches. La présence de l'alpha hémolysine est un caractère essentiel des souches pathogènes chez l'Homme.

2- les streptocoques :

2.1- définition :

La famille des *streptococcaceae* comprend sept genres dont *streptococcus* et *enterococcus* qui regroupent la plupart des espèces responsables d'infections humaines. Les caractéristiques communes à toutes ces espèces sont : cocci gram- positives, non sporulées, immobiles, dépourvues de catalase et d'oxydase, ne réduisant pas les nitrates et résistants aux aminosides. Elles sont également aérobies, anaérobies mais poussent mieux en milieu enrichi, en anaérobiose [4].

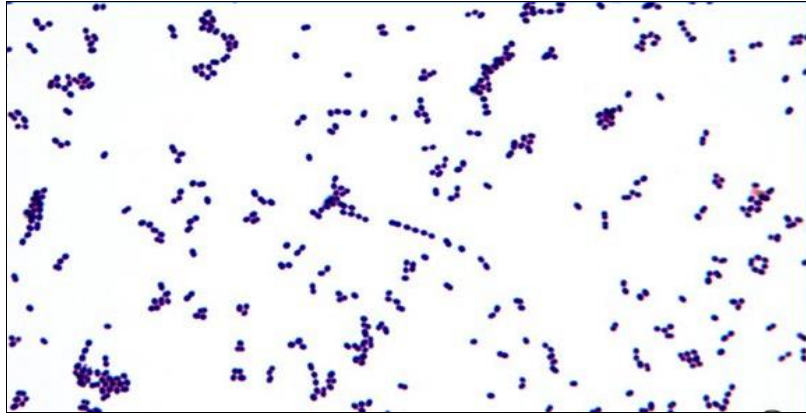


Figure 2 : vue microscopique de *streptococcus grossissement*(X100)

Ces germes exigent des milieux enrichis par du sang et plusieurs facteurs de croissance pour leur multiplication.

Les groupes A, C, G, F caractérisent l'espèce hémolytique le plus pathogène, mais ils existent certains streptocoques commensaux.

2.2- classification :

La classification des streptocoques est basée d'une part sur le pouvoir hémolytique en faisant la culture sur une gélose au sang et d'autre part sur les antigènes pariétaux de la paroi. [8]

***pouvoir hémolytique :**

Les streptocoques qui provoquent une hémolyse incomplète sont des streptocoques alpha hémolytiques. Les bêta hémolytiques sont responsables de l'hémolyse complète et les streptocoques non hémolytiques ne provoquent pas d'hémolyse.

***équipement antigénique :**

L'antigène C de la paroi est présent chez la plupart des streptocoques sauf les non groupables. Sa nature est variable suivant les groupes ; il s'agit de polysaccharides pour certains ou d'acide lipotoïque pour d'autres.

2.3- Pouvoir pathogène

Les streptocoques sont après les staphylocoques, les bactéries pyogènes numéro deux. Les plus pathogènes d'entre eux sont les streptocoques bêta hémolytiques du groupe A, appelés *streptococcus pyogènes*. Ils sont responsables de la majorité des infections provoquées par ce genre.

Les réactions immunologiques de l'hôte infecté par cette espèce, sont beaucoup plus complexes que celles observées lorsqu'il est infecté par un *S.aureus*. Elles peuvent conduire à la formation d'anticorps spécifiques à taux élevé et d'auto anticorps. [9]

3- Entérobactéries :

Les entérobactéries sont des bacilles à gram négatif, dont la plupart sont mobiles. Ils sont très hétérogènes en ce qui concerne leur pathogénie et leur écologie. Les espèces qui composent cette famille sont soit parasites (*shigelle*, *yersinia*, *salmonella*) soit commensales (*E.coli*, *Proteus*, *klebsiella*, *providantia...*) [4].

- En 1879, Theodor Escherich (1857-1911) découvre un bacille qu'il dénomma *Bacterium coli* dans des selles de nourrissons. [10]
- En 1904, cette même bactérie a été isolée à partir d'une infection urinaire. [10]
- En 1919, Castellani et Chalmers donne le nom d'*Escherichia coli* à cette bactérie [10].

3.1- caractéristiques :

- Aérobies –anaérobies facultatifs
- Fermentent le lactose
- Oxydase –
- Catalase +
- Nitrate réductase + [4]

3.2- Pouvoir pathogène :

***pathogènes opportunistes :**

Les entérobactéries opportunistes ne sont pas capables de déclencher une pathologie chez une personne saine. Cependant, elles sont susceptibles de déclencher une infection chez un sujet immunodéprimé.

Généralement, elles sont présentes dans l'intestin et font partie de la flore commensale telle qu'*E. Coli*. [11]

***pathogènes strictes :**

Ils sont à l'origine de diverses infections dès leur présence dans l'organisme. Introduites par un aliment contaminé, ces bactéries provoquent des troubles intestinaux graves. Les symptômes se caractérisent souvent par des diarrhées importantes suivies de déshydratation. Par exemple :

- L'espèce *Salmonella typhi* responsable de la fièvre typhoïde ;
- l'espèce *Shigella dysenteriae* est l'agent responsable de la dysenterie bacillaire ;

- l'espèce *Escherichia coli* entérotoxique responsable de gastro-entérite infantile ou GEI ;
- l'espèce *Yersinia pestis* responsable de la peste. [11]

4- *Pseudomonas aeruginosa* :

Il s'agit d'un petit bacille , mobile grâce à son flagelle simple , non sporulé. Il s'agit d'un germe ubiquitaire.

Pseudomonas aeruginosa est facilement mis en évidence dans un laboratoire. Il a une forme droite et légèrement incurvée. Il est responsable d'un grand nombre d'infections nosocomiales [12].

Pseudomonas aeruginosa a été longtemps associé à la maladie de la peau. En 1882, ce germe fut isolé pour la première fois par Gessard dans une plaie cutanée [13].

La difficulté retrouvée concernant ce germe, est qu'il est capable d'infecter presque tous les sites anatomiques. Il a également une remarquable capacité de résister à plusieurs types d'antibiotiques.

5- les anaérobies :

Les anaérobies sont des microorganismes incapables de se développer et se multiplier en présence d'oxygène, avec différents degrés.

- **Les anaérobies obligatoires** qui meurent lorsqu'ils sont exposés à du dioxygène à teneur atmosphérique, et peuvent indifféremment utiliser la fermentation ou la respiration anaérobie. (ex : *clostridium*)
- **Les anaérobies facultatifs** peuvent utiliser le dioxygène présent dans le milieu de culture. En présence d'oxygène, ces organismes peuvent utiliser la respiration aérobie, alors qu'en absence d'oxygène, une partie de ces organismes fermentent et la seconde effectue une respiration anaérobie.
- **Les organismes aérotolestants** peuvent survivre en présence de dioxygène, mais sont anaérobies par nature, car ils n'utilisent pas le dioxygène comme accepteur final d'électrons. Ils utilisent exclusivement le mode fermentation.

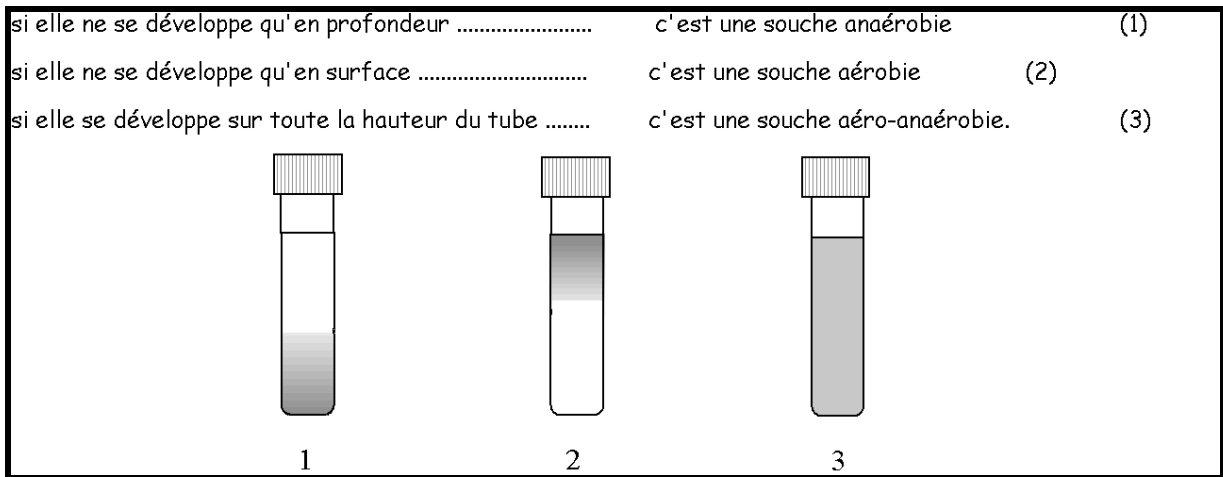


Figure 3 : milieux de développement des anaérobies

Donc, les anaérobies stricts sont incapables de se multiplier en présence d'air. Elles sont aussi dépourvues d'enzyme du métabolisme respiratoire (oxydases, catalase, peroxydase ...). Elles tirent leur énergie de réactions de fermentation. Elles sont responsables d'une grande variété d'infections localisées ou généralisées.

La plupart de ces bactéries se développent lentement et leur mise en évidence reste toujours délicate.

Un certain nombre d'indices permettent de suspecter leur présence :

- ✓ Mauvaise odeur des échantillons, présence de gaz dans la lésion.
- ✓ Localisation de la suppuration (abcès cervical).

5-1 classification :

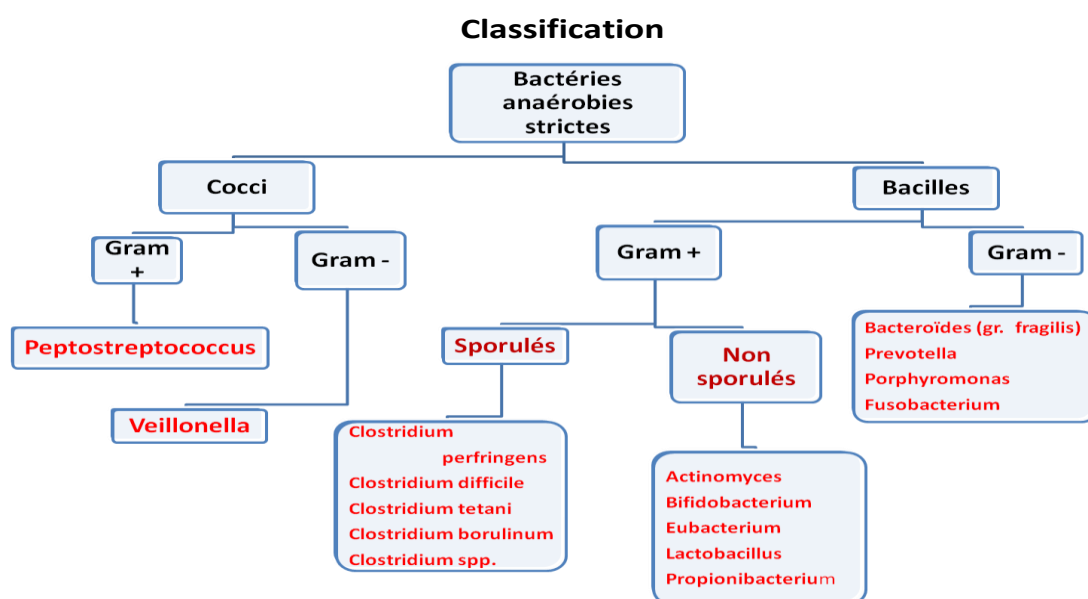


Figure 4 : Classification des bactéries anaérobies strictes

5-2 Habitat et pouvoir pathogène :

Certaines bactéries anaérobies strictes survivent dans l'environnement sous forme sporulée et constituent la flore exogène comme le genre *Clostridium*. Elles deviennent pathogènes quand elles pénètrent accidentellement dans l'organisme par effraction cutanée ou intestinale. Elles y retrouvent leur forme végétative et y produisent leur toxine.

D'autres font partie de la flore endogène et ont pour habitat les cavités naturelles de l'homme et des animaux. Elles y survivent en commensales car elles y sont associées à des aérobies facultatifs qui consomment l'oxygène ; elles se comportent comme des opportunistes. Les cocci à gram positif et négatif, les bacilles à gram négatif, les bacilles à gram positif sporulés et non sporulés et quelques *Clostridium* constituent cette flore.

Les espèces anaérobies sont pathogènes quand elles se multiplient d'une façon exagérée dans un site normal et y deviennent dominantes et aussi, quand elles colonisent un organe ou une cavité normalement stérile (cerveau). Elles sont presque toujours associées à des bactéries aéro-anaérobies facultatives. Elles sont surtout impliquées dans les septicémies, les infections abdominales, gynécologiques et pleuro-pulmonaires, les sinusites et otites chroniques, les abcès pulmonaires, cérébraux ou intra-pelviens, les gangrènes cutanées ou tissulaires et les syndromes diarrhéiques.

Les facteurs de pathogénicité sont les exotoxines qu'elles produisent, les lipopolysaccharides de leur paroi, leur capsule les protégeant des phagocytoses, des enzymes favorisant leur diffusion ou altérant les fonctions de défense de l'organisme telles que les protéases qui dégradent les immunoglobulines ou les facteurs du complément. [14]

V- L'antibiogramme :

L'antibiogramme est un test qui permet de mesurer la capacité d'un antibiotique à inhiber la croissance bactérienne in vitro. Il renseigne, par conséquent, sur la sensibilité des germes vis-à-vis des agents anti infectieux. [15]

Les antibiotiques sont utilisés dans la lutte contre les infections bactériennes depuis la découverte de la pénicilline en 1929 et des sulfamides en 1935. Les nouvelles molécules sont d'abord utilisées en médecine humaine puis leur emploi est étendu à la médecine vétérinaire.

L'utilisation de ces antibiotiques s'accompagne inéluctablement de l'apparition de résistances acquises, par les souches d'origine humaine ou animale, rendant l'efficacité des thérapeutiques plus aléatoire.

Pour évaluer le degré de résistance d'une bactérie, différents tests de sensibilité ont été mis au point, ayant pour but la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB).

La première désigne la plus faible concentration de l'ATB capable d'inhiber toute croissance bactérienne visible en 18 – 24 heures. La deuxième est la concentration de l'antibiotique la plus faible permettant de détruire 99.99% des bactéries présentes au départ. [16]

- Notion de sensibilité et résistance :

1- La sensibilité:

- Sensibilité n'est pas une valeur quantifiable. La valeur mesurable, de référence est la CMI

2- La résistance :

- Il existe deux types de résistance une est naturelle et l'autre est acquise.

La résistance naturelle est une caractéristique propre à une espèce bactérienne. Elle correspond à la capacité de résister en présence d'un antibiotique. Par contre la résistance acquise est une résistance développée par quelque souche d'une espèce. Cette dernière correspond à la capacité de supporter une concentration d'antibiotique beaucoup plus élevée que celle supportée par les autres souches de la même espèce.

Elle peut s'acquérir soit par mutation chromosomique, soit par acquisition de matériel génétique exogène.

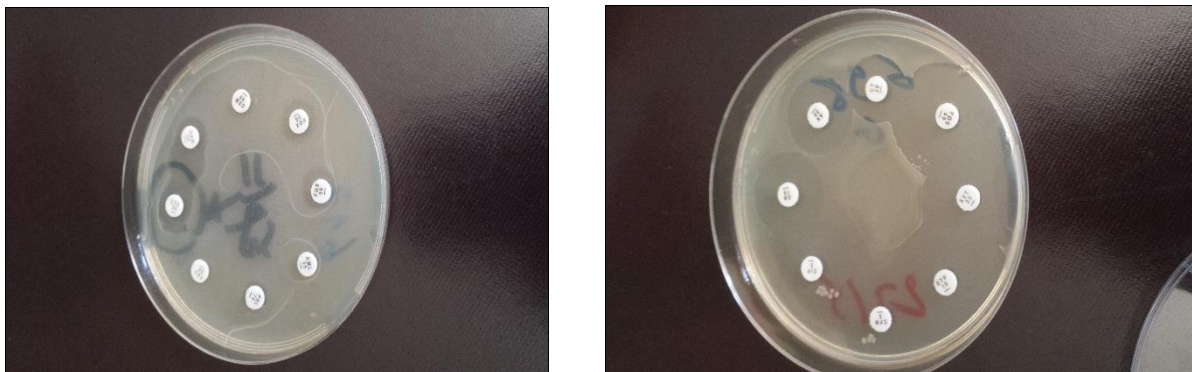


Figure 5 : exemple d'antibiogramme d'une souche sensible et une résistante

I. Matériel :

Les patients qui font l'objet de notre étude se représentent au laboratoire de l'hôpital pour un prélèvement de pus, ils sont de différents âge et de différentes provenances. Le prélèvement de pus est réalisé soit par un écouvillon soit une seringue. L'acte de prélèvement se fait par une infirmière qui doit tout d'abord remplir une fiche de renseignements.

1- Fiche de renseignements :

En pratique, avant tout examen cyto bactériologique de pus, il faudra procéder à l'interrogatoire du malade pour remplir une fiche de renseignements sur laquelle seront notés :

- Nom, Prénom, Age, Service.
- Type de prélèvement.
- Localisation du prélèvement.
- Renseignements cliniques.
- Demande de recherche bactérienne spécifique (mycobactéries anaérobies, ...etc.).

II. Méthodes :**1- Prélèvements de pus :**

Les prélèvements sont d'origine très diverse. La mise en évidence des bactéries pathogènes dépend de la localisation de la suppuration (proche ou non d'une flore commensale), du mode de prélèvements (écouvillon, seringue, biopsie) et du mode de transport. Ils peuvent être séparés en trois classes :

Classe 1 : zones profondes fermées, normalement stériles : liquide pleural, liquide articulaire, abcès du cerveau. Ce sont les plus simples à réaliser. Ils sont obtenus soit au cours d'un acte chirurgical, soit par ponction à travers la peau ou la muqueuse.

Classe 2 : zones profondes communiquant avec des surfaces présentant une flore commensale. Ce prélèvement est presque identique à ceux de la classe précédente, tout en essayant de le réaliser le plus profondément possible. Ce prélèvement peut être réalisé au niveau des communications externes, pour cela, il faut bien nettoyer l'orifice externe avec une solution iodée et y introduire ensuite, un cathéter monté sur une seringue pour le recueil, le plus profondément possible.

Classe 3 : zones superficielles possédant une flore commensale. Ces prélèvements sont toujours contaminés (escarres, brûlures). Dans ce cas, la flore de la surface et les débris tissulaires et cellulaires doivent d'abord être enlevés par lavage avec une solution non bactéricide.

1.1- Conditions de prélèvement :

Pour réussir un bon prélèvement, il faut veiller à ce que ce dernier soit réalisé avant toute prise d'antibiotique. Les règles d'hygiène, ainsi que le délai d'acheminement au laboratoire doivent être respectés. Certains prélèvements se font dans un milieu spécialisé, et par un personnel qualifié.



Figure 6 : les différents récipients utilisés pour le prélèvement de pus

1.2-Transport :

Les prélèvements de pus doivent arriver rapidement au laboratoire (<20 min à température ambiante), pour être ensemencés dans le plus bref délai et pour éviter la prolifération bactérienne de la flore commensale, ainsi que la mort des bactéries pathogènes fragiles. Dans le cas contraire, le prélèvement est conservé à 4 °C pour empêcher la multiplication microbienne. Cette conservation doit être de courte durée pour éviter l'altération des cellules d'accompagnement.

2- Examen cyto bactériologique de pus :

2.1- Examen macroscopique :

La couleur, la consistance, l'aspect et l'odeur du prélèvement reçu, sont examinés par un technicien et permettent l'orientation :

- La couleur : la couleur de pus est jaune-verte. La couleur rouge brune peut être éventuellement présente et elle est due à un mélange avec du sang.

- La consistance : la consistance de pus peut varier d'un liquide trouble à une matière épaisse et collante. Le pus peut aussi être épais visqueux, élastique, mélangé ou non avec du sang. La présence des grains peut témoigner d'une actinomycose.
- L'odeur : Le pus peut être inodore ou avoir une odeur fécaloïde ou fétide ou très putride. Ce dernier cas, témoigne de la présence de bactéries anaérobies.

2.2- Examen microscopique :

➤ Examen direct:

a) Examen à l'état frais :

Une goutte du prélèvement est déposée entre lame et lamelle puis observée au microscope optique, au grossissement (X40). Cet examen permet de distinguer les cellules d'accompagnement (soit des polynucléaires ou des lymphocytes) et d'identifier leur état (intactes ou altérés). Aussi, il permet d'observer la morphologie et la mobilité des bactéries si elles sont présentes.

b) examen après coloration :

La coloration de gram est fondamentale dans l'examen bactériologique. Pour la réaliser, le violet de gentiane, le Lugol, l'alcool, la fuchsine de ziehl diluée sont utilisés. Cette coloration permet de classer les bactéries en deux grandes catégories : Gram positif ou Gram négatif. (Voir annexe 2)

En effet, certains germes, après avoir fixé le violet de gentiane, elles ne se décolorent pas par l'alcool. Ils apparaissent au microscope, colorés en violet, ils sont Gram positifs. D'autres au contraire, sont décolorés par l'alcool et seraient invisibles sur les frottis, sans l'action de la fuchsine qui les colore en rose, ce sont des bactéries Gram négatives.

Pour bien décrire la réaction cellulaire, une coloration de bleu de méthylène doit être réalisée.

Dans un pus, si la cytologie révèle une majorité de lymphocytes, la recherche des mycobactéries s'impose. Une coloration de Ziehl à la recherche de BAAR sera alors nécessaire avec une culture sur milieu approprié.

➤ Culture :

Pour la culture, deux milieux permettant l'isolement des colonies recherchées sont utilisés :

1) Gélose Chapman : il s'agit d'un milieu sélectif des bactéries halophiles et plus particulièrement fermentant le mannitol. C'est un milieu semi synthétique.
- Il est utilisé pour l'isolement des *Staphylocoques*. Une teneur élevée en Na Cl permet la sélection des bactéries halophiles et inhibe la grande majorité des autres bactéries. (Voir annexe 3)

- Un critère de différenciation : la fermentation du mannitol révélée grâce au virage de l'indicateur coloré de pH : le rouge de phénol qui permet une orientation vers certaines espèces (comme l'espèce *Staphylococcus aureus*).

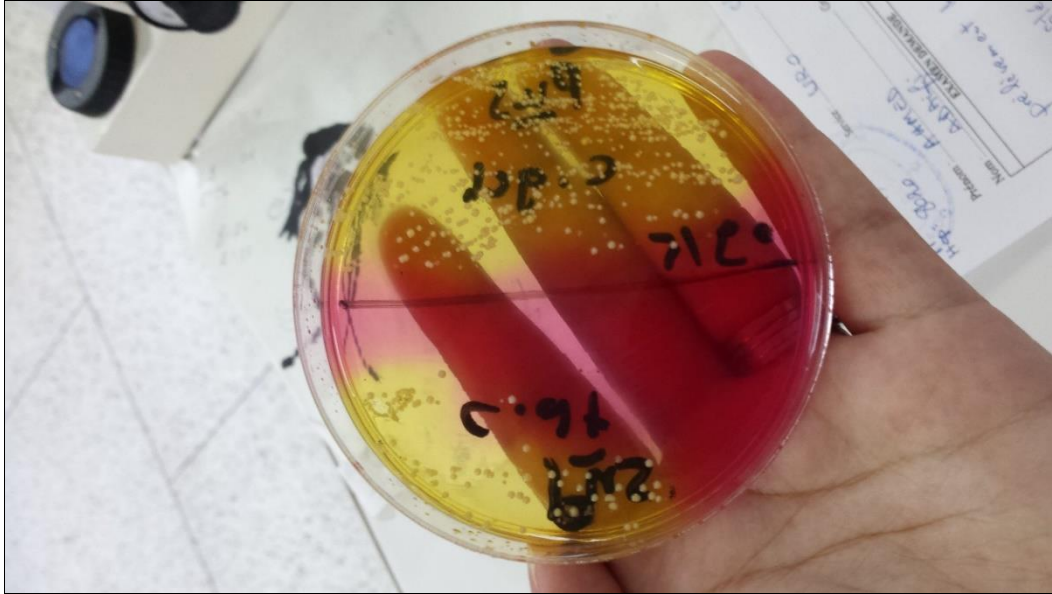


Figure 7 : milieu Chapmanensemencé

2) Gélose au sang : C'est une gélose rouge vif contenant des globules rouges. Elle est peu sélective, cependant, elle permet d'apprécier l'hémolyse qu'effectuent certaines bactéries. Les bactéries capables de détruire complètement les globules rouges (hémolyse bêta) formeront des colonies entourées d'une zone claire facilement visible sur la gélose rouge. Si l'hémolyse est incomplète (hémolyse alpha), la zone d'hémolyse sera moins claire. Une hémolyse complète est visible entre autres dans le cas des Streptocoques du groupe A. (Voir annexe 3)



Figure 8 : gélose au sang ensemencée

➤ **Incubation :**

Les deux milieux sont incubés pendant une durée de 24h à 48h, à une température de 37°C, en anaérobiose.

Après incubation, les résultats de l'examen direct, de la coloration de gram et de la culture, nous donnent une idée sur le genre responsable de l'infection.

Aussi, après la culture, une coloration de gram est réalisée pour les différentes colonies.

En cas d'infection bactérienne, la détermination de l'espèce en cause nécessite une identification biochimique.

➤ **Identification biochimique :**

1) **Test d'oxydase :**

Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram négatif. Il permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase des bactéries, à partir de leur culture en milieu gélosé.

Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diméthylparaphénylène diamine. Le réactif peut se trouver sous deux formes :

- En solution : un carré de papier filtre imbibé d'une solution fraîchement préparée de réactif est déposée sur une lame de verre.
- Sous la forme d'un disque pré imprégné par le réactif.

Dans les deux cas, une colonie de germes à étudier est écrasée avec une effilure de pipette Pasteur sur ce papier (instrument n'oxydant pas le réactif).

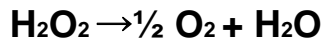
Le test est positif lorsqu'une tâche violette apparaît sur le disque.



Figure 9 : test d'oxydase

2) Test de catalase :

Un test de catalase consiste en la recherche de la catalase qui est une enzyme catalysant la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) chez les bactéries.



Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram positif.

- Sur une lame propre et sèche, une goutte d'eau oxygénée est déposée.
- l'inoculum bactérien est ensuite ajouté à l'aide d'un enseigneur et l'observation est immédiatement réalisée.

Un dégagement gazeux veut dire qu'il s'agit du genre *Staphylococcus*. Cette effervescence est causée par le dégagement du dioxygène généré par la lyse de l'H₂O₂ réalisée par la catalase sécrétée par les staphylocoques comme moyen d'autodéfense.

Par contre, les streptocoques sont catalase négatif et la réaction se traduit par l'absence des bulles d'oxygène. Pour savoir, de quel groupe de *streptocoque* s'agit-il, on réalise alors le test d'agglutination.

3) Test d'agglutination :

C'est un test qui permet l'identification des streptocoques des groupes A, B, C, D, F et G, par une réaction d'agglutination des antigènes des streptocoques avec des particules de latex sensibilisées par des immunoglobulines spécifiques, qui agglutinent en présence de l'antigène correspondant.

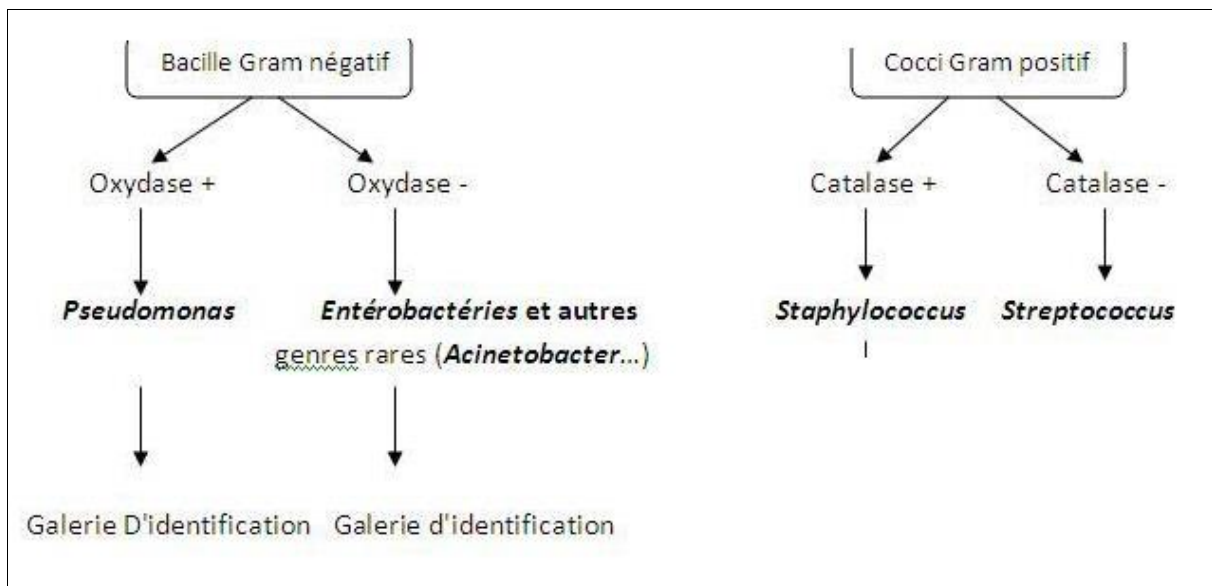


Figure 10 : schéma de déroulement de certains tests pour l'identification biochimique

➤ **Antibiogramme :**

Après identification du germe, un antibiogramme est réalisé afin de tester sa sensibilité vis-à-vis d'un ensemble d'antibiotiques.

La méthode utiliser est la méthode des disques : sur une gélose Mueller Hinton un inoculum est ensemencé et après avoir mis les disques d'antibiotique à tester le milieu est incubé à 37 °C.

L'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque montre que la souche étudiée est sensible à l'antibiotique correspondant.

Dans certains cas on peut utiliser une galerie d'identification qui nous permet de déterminer l'espèce.

➤ **Galerie API:**

Une **galerie API** est un ensemble de petits tubes prêts à l'emploi permettant l'identification de micro-organismes par la réalisation rapide et facile de tests biochimiques miniaturisés. La première galerie apparue dans le monde de la microbiologie a été la galerie Api 20E destinée à l'identification des entérobactéries. Il existe également l'API *streptocoque*, l'API *staphylocoques*...



Figure 11 : schéma d'une galerie API

Mode opératoire :

***Préparation de l'inoculum:**

Une seule colonie est prélevée et mise en suspension dans 5 ml d'eau distillée stérile.

***ensemencement de la galerie API :**

La suspension bactérienne est introduite dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile ouverte (ou une seringue), pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles d'air.

Pour certains caractères, le tube est rempli de suspension bactérienne puis recouvert d'huile de paraffine.

***La plaque est fermée et puis incubée à 37°C de 18 à 24 h.**

○ La lecture :

La lecture se fait en révélant les réactions de la galerie par des réactifs spécifiques. Le profil biochimique est transformé en profil numérique à l'aide d'un catalogue, le nom de l'espèce bactérienne est ainsi déterminé. (Voir annexe 4)

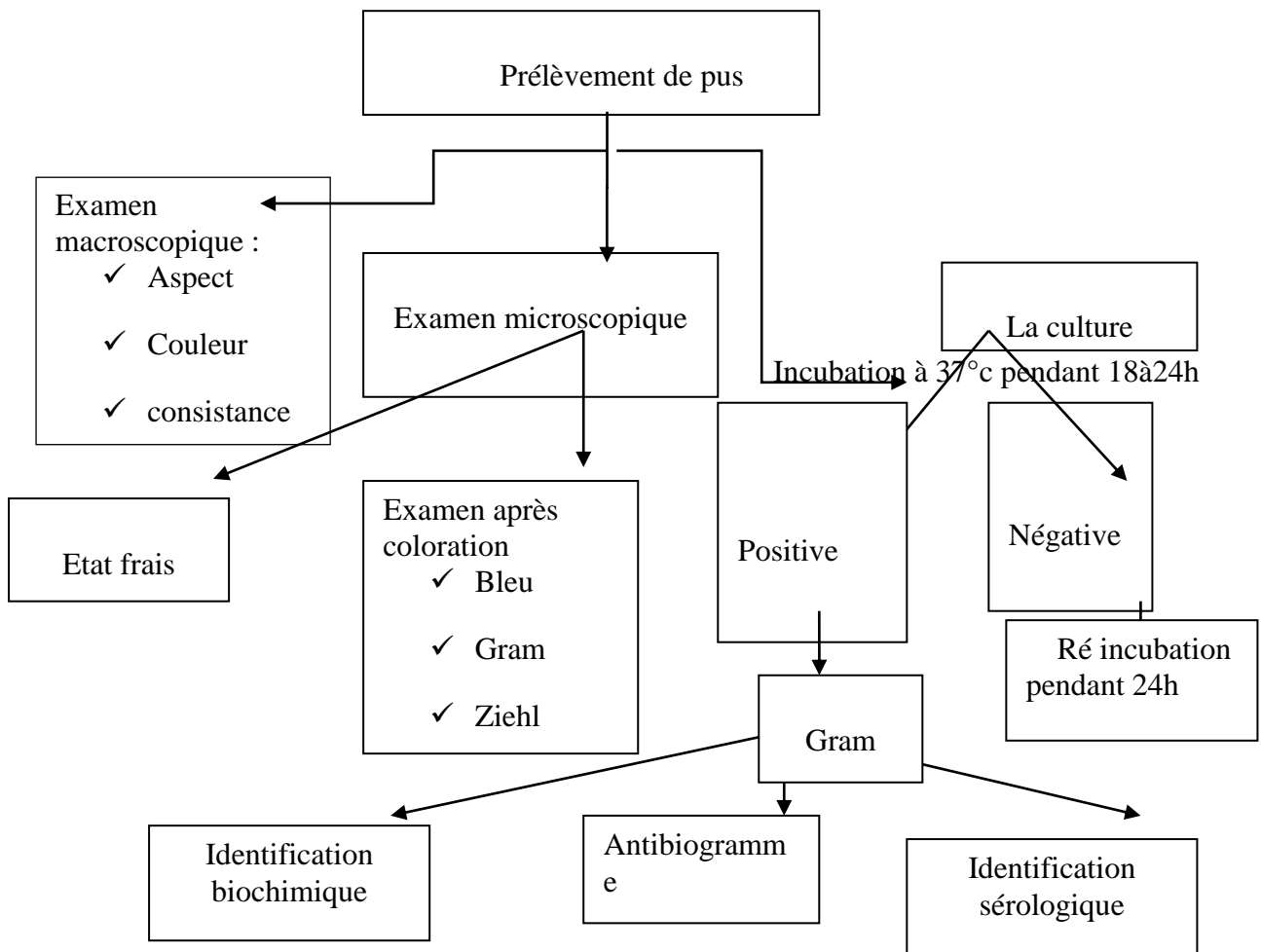


Figure 12 : Schéma de l'ECB de pus

Partie 3 : **Résultats et discussion**

Une étude rétrospective portant sur les prélèvements de pus reçus au laboratoire de l'hôpital militaire Moulay Ismail de Meknès a été effectuée pour une période s'étalant sur 5 mois, du mois de Janvier au mois de Mai 2015.

Cette étude a été réalisée, dans le but de mesurer :

- la fréquence des infections purulentes chez les patients externes et hospitalisés,
- la répartition des germes selon les services,
- la répartition des prélèvements selon l'âge,
- la répartition des germes responsables des infections purulentes.

Les résultats sont ceux du service informatique de l'hôpital.

1) Résultats :

1.1) La fréquence de l'infection purulente chez les patients externes et hospitalisés :

Durant cette période, le laboratoire a reçu 130 prélèvements de pus dont 88 étaient positifs (présence de germes recherchés après culture), ce qui représente un pourcentage de 67,69%

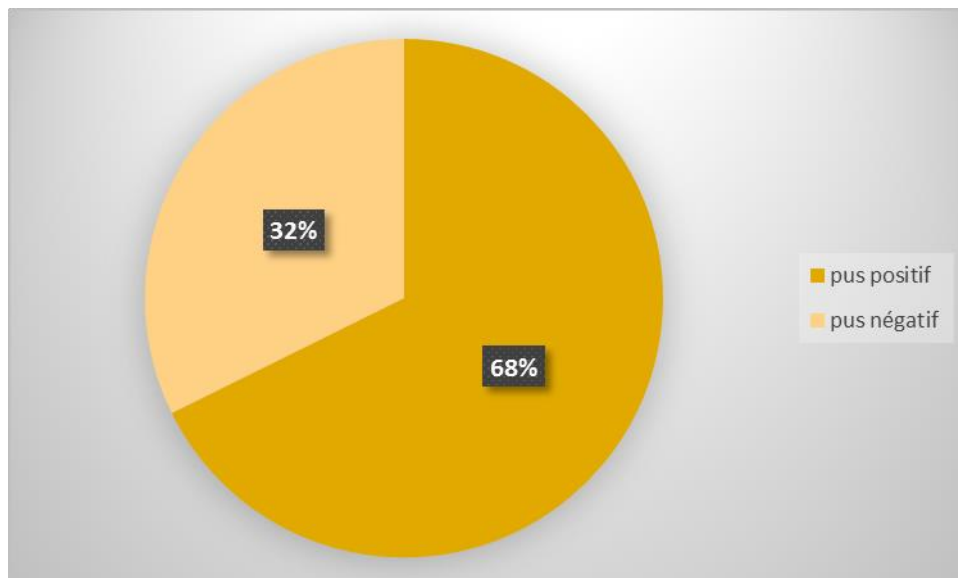


Figure 13 : fréquence de l'infection purulente enregistrée chez les patients

Parmi ces 130 prélèvements, 54 étaient externes et 76 proviennent des différents services de l'hôpital.

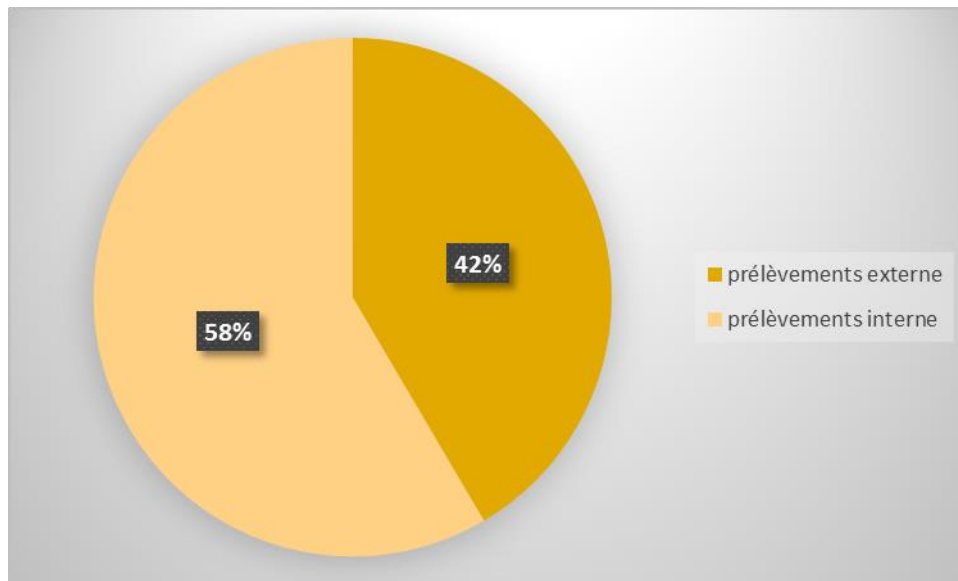


Figure 14 : répartition des patients internes et externes

1.2) La répartition des germes selon les services :

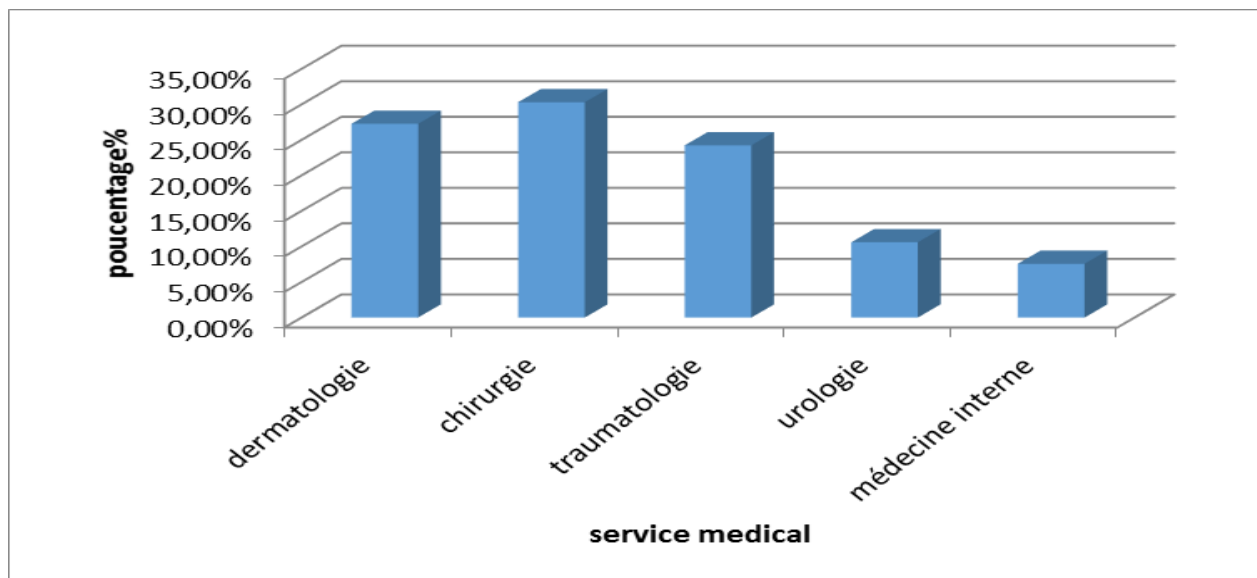


Figure 15: histogramme de la répartition des germes selon les services

Cet histogramme montre que la majorité des prélèvements proviennent du service de chirurgie suivi du service de dermatologie.

Ce résultat peut être expliqué par le fait qu'au moment de l'intervention chirurgicale ou après l'intervention, les patients sont fragiles et présentent un terrain favorable pour l'accumulation de pus. Aussi, ils sont plus disposés à avoir des infections nosocomiales.

Il est également important de noter que les infections cutanées, qu'elles soient superficielles ou profondes, sont très fréquents.

La localisation du prélèvement est en général située sur la fiche de renseignements, l'abcès peut être situé dans les différents organes de l'organisme. Il peut provenir d'un prélèvement de la jambe des personnes diabétiques, d'un prélèvement viscérale, d'un impétigo, d'un furoncle ou d'un ostéolytique.

Cependant, si la localisation n'est pas signalée, le manque de cette information rend le diagnostic difficile.

1.3) La répartition selon le sexe :

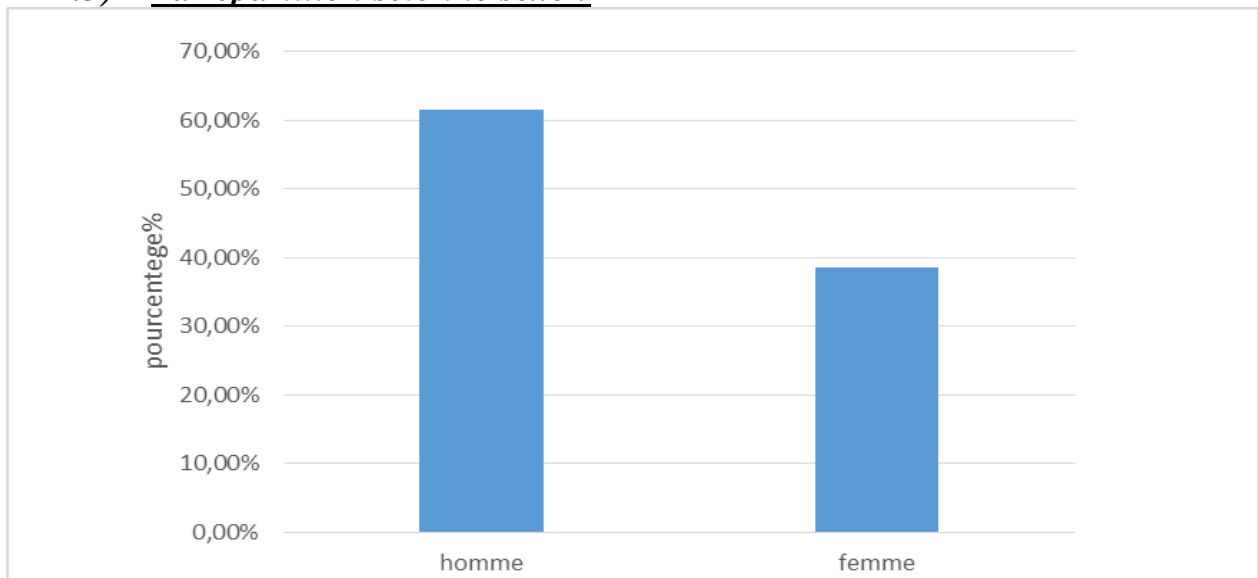


Figure 16: Répartition des patients selon le sexe

La répartition des patients selon le sexe montre que 60% sont des hommes et 40% sont des femmes.

La différence de pourcentage n'est pas énorme, et cette légère différence peut éventuellement être expliquée par le fait que les hommes pratiquent des métiers difficiles où ils peuvent rencontrer beaucoup d'accidents de travail.

1.4) La répartition des germes responsables des infections purulentes :

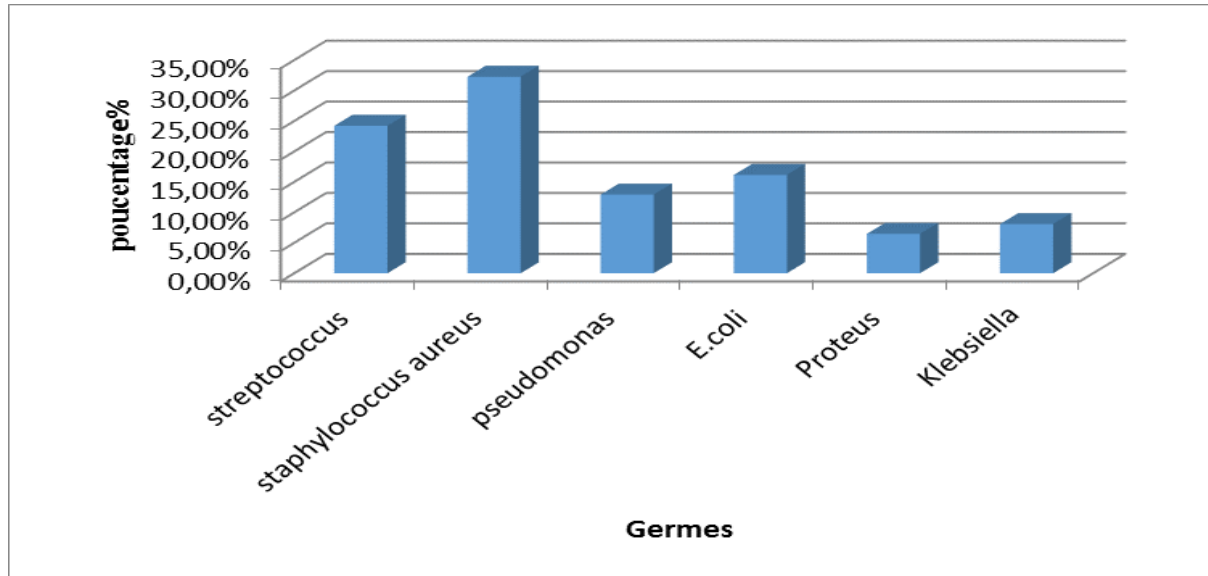


Figure 17 : répartition des germes purulents

Les germes les plus fréquents sont *staphylococcus* et *streptococcus*. Aussi, la présence d'*E. coli* et *Pseudomonas* est significative. Les deux genres *klibsella* et *Proteus* sont représentés avec un pourcentage plu faible.

Différents espèces tels que : *Acenetobacter bumani*. peuvent être rencontrés également.

2) Discussion :

Les résultats de l'étude rétrospective réalisée dans notre série ne sont pas tous conformes aux autres résultats obtenus par d'autres études sur le même sujet. Cependant, une étude sur le profil bactériologique des germes isolés du pus dans une étude réalisée à l'hôpital universitaire de Gonder à l'Éthiopie, une dominance de *staphylococcus aureus* (75%) a été également notée, suivie par *streptococcus* (11.6%), *Escherichia coli* (9.5%) *Klebsiella* (6.3%). [17]

La non concordance des résultats peut être expliquée par la taille de notre échantillon qui est très petite ainsi que par la durée insuffisante de stage. En effet, l'échantillon de l'étude réalisée à l'Éthiopie comprenait 628 patients et la durée de l'étude a été étalée sur 4 ans (2009 à 2012). [17]

Cette différence peut aussi être expliquée par la qualité des prélèvements qui ne sont pas toujours réalisés dans des conditions stériles, ainsi que le temps d'acheminement des analyses au laboratoire.

Les statistiques trouvées par les 2 études restent très élevées que ce soit par le nombre de prélèvements réalisés ou par le nombre de cas positifs.

En effet, le Maroc et l'Éthiopie sont deux pays qui ne sont pas très développés dans le domaine médical. Les méthodes utilisées pour le diagnostic et le prélèvement ne sont pas assez développées également, ce qui peut expliquer les résultats obtenus.

D'après les remarques et les témoignages des techniciens, un nombre important de prélèvements est reçu sur écouvillons et dans certains cas, ces derniers sont secs ou insuffisants. Ceci ne permet pas alors, la réalisation de la culture Gram. Parfois, même quand le prélèvement est dans une seringue, cette dernière est ouverte et donc elle constitue une source de contaminations, chose qui conduit à l'obtention de faux résultats et par conséquent, une mauvaise interprétation de ces derniers.

En ce qui concerne l'antibiogramme, plus de 60% des souches isolées sont sensibles aux différents antibiotiques testés. Cependant, les souches résistantes sont également présentes et ces dernières posent un problème majeur dans les traitements de pus.

Aussi, le fait que les germes anaérobies sont très difficiles à isoler peut expliquer les cultures négatives dans certains cas.

Conclusion :

Le diagnostic microbiologique de pus est la première étape incontournable de la prise en charge des infections suppuratives.

La mise en évidence du germe après examen direct ou culture, permet un diagnostic de certitude et oriente vers le traitement antibiotique.

D'après notre étude, la majorité des prélèvements analysés proviennent des services de chirurgie et de dermatologie.

Les germes les plus fréquemment isolés sont les *Staphylococcus aureus* et les entérobactéries avec une nette prédominance d'E. Coli. La majorité des souches isolées sont sensibles aux antibiotiques, cependant, le nombre de souches résistantes trouvées reste quand même significatif. Ces germes nécessitent alors, un antibiotique adapté aux données de l'antibiogramme fournies par le biologiste. Le problème de multi résistance rencontré, présente un problème majeur qui menace le traitement des infections purulentes.

Les infections nosocomiales sont également parmi les facteurs qui augmentent la multi résistance bactérienne et constituent par la suite, un vrai problème de santé public sur le plan technique et sur le plan économique. Afin de lutter contre les infections nosocomiales le CLIN a mis en œuvre des guides techniques de recommandations.

Les activités de collecte de données, de surveillance et de stratégies de prévention doivent être menées dans chaque structure de santé, afin de lutter contre les infections nosocomiales, et diminuer la multi résistance. Cette prévention est un marqueur incontournable de la qualité de soin dans les différents services médicaux et particulièrement dans les services prédisposés à ce genre d'infections.

Annexes :

1) Matériel de laboratoire :



2) Coloration de gram

Principe

La coloration de GRAM-Nicolle est une coloration différentielle basée sur la structure de la paroi bactérienne qui est différente selon qu'il s'agisse de bactéries à GRAM positives ou à GRAM négatives.

Mode opératoire

- la préparation est fixée à la chaleur douce.
- la solution est colorée par le violet de gentianine (1minute).
- La solution est rincée abondamment à l'eau.
- Le liquide de lugol est ensuite ajouté (1minute).
- Rinçage à l'eau.
- Une décoloration à l'alcool, suivie d'un rinçage direct à l'eau sont réalisés.
- La coloration avec la solution de fuchsine est ensuite réalisée.
- Enfin, un rinçage à l'eau, un séchage, puis une observation au microscope ($\times 100$) à l'immersion sont effectués.

Lecture des résultats

Les bactéries à Gram positif se colorent en violet, et celles à Gram négatif se colorent en rose.

Le groupement peut être par 2, en amas, en chaînettes...

3) Milieu de culture :

Gélose chapman :

Composition pour la préparation d'un litre de milieu.

- Peptone :..... 10,0 g
 - Extrait de viande de bœuf :..... 1,0 g
 - Chlorure de sodium :..... 75,0 g
 - Mannitol :..... 10,0 g
 - Rouge de phénol :..... 0,025 g
 - Agar-Agar :..... 15,0 g
 - Eau distillée :..... qsp 1 Litre
- pH = 7,4

Gélose au sang :

Composition pour la préparation d'un litre de milieu.

- Mélange spécial de peptones..... 23g
 - Amidon..... 1g
 - NaCl..... 5g
 - Agar..... 10g
 - Sang 50 mL
- pH = 7,3

4) Lecture de l'api :

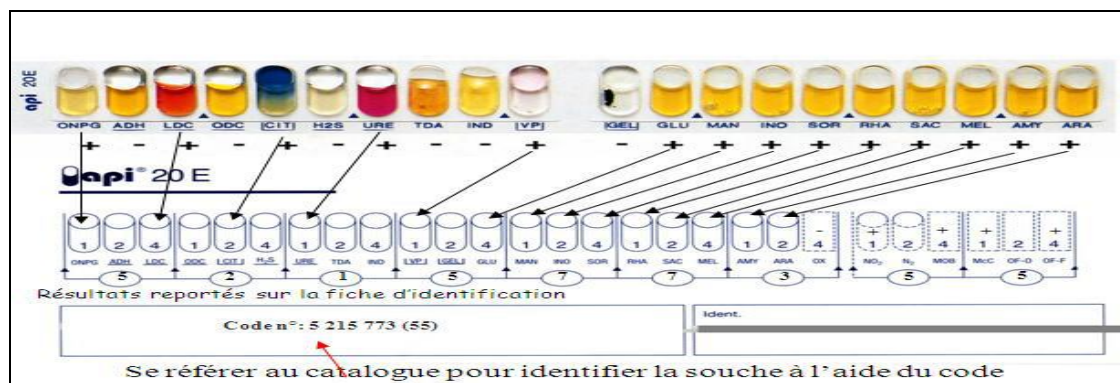


Figure : la galerie api 20E

Références bibliographiques

- 1) **M-C. Poly, F.Denis (2007)** bactériologie médicale (techniques usuelles) p : 165
- 2) **D. TIOUIT. PIEMONT Y, RIEDER C (2012-2013)** EXAMEN CYTOBACTÉRIOLOGIQUE DU PUS
- 3) **Le REMIC** : Examen bactériologique des pus. Référentiel en microbiologie médicale
- 4) **F.Denis, F.Garnier, P.Bidet, E .Bingen (2007)** bactériologie médicale (techniques usuelles) p :253-265-295
- 5) **Eric Beuvier, Nouri Ben Zakour et autres(2012)** Monographie de microbiologie collection dirigée par Jean Paul Laprent (staphylococcus aureus)
- 6) **Raymond Ruimy et Laurence Armand-Lefèvre(2008)** service de bactériologie, CHU Bichat-Claude Bernard (staphylococcus : historique et connaissance actuelles du portage).
- 7) **Pr Jean-Philippe Lavigne- DFGMS2*Infectieux*** staphylocoques
- 8) **Moselio Schaechter, Gerald Medoff, Bary.I.Essentein(1999)** Microbiologie et pathologie infectieuse. P : 198
- 9) **Dr. François Pebret (2003)** : Maladies infectieuses
- 10) **Pr Jean-Philippe Lavigne- DFGMS2*Infectieux*** E. coli
- 11) **Université Pierre et Marie Curie (2002)** : bactériologie
- 12) **Stephen Weber (2001)** : ECTHYMA GANGRENOSUM AND *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
- 13) **P.Weiley, Harly. Sherwood, Klein.Woolverton(2010)** : Microbiologie (3ème édition) P : 139
- 14) **L.Dubreuil (2007)** bactériologie médicale (technique usuelles) p : 523
- 15) **A.Benouda (2008)** : professeur de microbiologie ; hôpital universitaire international Cheikh Zaid-Rabat (antibiogramme : choix, interprétation et limites).
- 16) **PEYROU MATHIEU(2001)** : ANTIBIORESISTANCE DES SOUCHES BACTERIENNES D'ORIGINE EQUINE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE ET EXEMPLE DE L'HOPITAL VETERINAIRE DE ST-HYACINTHE.
- 17) **Muluye D, Wondimeneh Y, Ferede G, Nega T, Adane K, Biadgo B, Tesfa H, Moges F. (2014).** Bacterial isolates and their antibiotic susceptibility patterns among patients with pus and/or wound discharge at Gondar university hôpital. PUB MED

