I. L'objectif d'étude:

Dans le but d'étudier les infections génitales féminine dans la wilaya de Tébessa ,et leur aspect microbiologique. Nous avons fixé les objectifs suivant :

- Déterminer le type de ces infections génitales chez les femmes dans les différentes communes de la wilaya de Tébessa (Tébessa ,Cheraia, Ber al ater, El kouif ,Bakaria, Morset,Ouenza,Négrine)

II. Cadre de l'étude:

Nous avons réalisé notre étude au laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences exactes et science de la nature et la vie de l'université de Tébessa et à l'unité de dépistage du cancer du col sous-unité : Laboratoire bactériologie dans la polyclinique KHDIRI Lakhal Ben al Tayeb de Tébessa.

Cette polyclinique contient 6 services :

- Consultation généralisée.
- Consultation spécialisée en : (Oncologie,Neurologie,Chiru-neurologie ,Dermatologie)
- Salle de soin.
- Laboratoire biochimie et hématologie.
- Stomatologie.
- Protection maternelle et infantile (PMI).

Plus une pharmacie, des salles d'attentes, une réception et une administration. Les femmes ont été consultées par la sage-femme dans le PMI

II. 1.Durée de l'étude:

Cette étude a été effectué pendant 3 mois et 15 jours, de 15 Janvier jusqu'a 30 Avril 2017.

II. 2.Taille de l'échantillon:

Notre étude a porté sur un total de 150 femmes âgées entre 22-60 ans qui ont subi des prélèvements vaginales provenant de différentes communes de la wilaya de Tébessa. Les raisons de la consultation sont dues soit (démangeaisons, leucorrhées colorées au malodorantes ,douleurs vaginales) qui touches les femmes, ou bien dans le cas de stérilet, ou

pour avoir un bébé in vitro, les femmes ont été envoyé par leur médecin pour confirmer l'absence de certain germes pathogène.

II. 3.Collecte des données:

Pour les besoins de l'étude, la collecte des donnés a été faite sous forme d'un questionnaire individuels (fiche d'enquête) destinée aux femmes concernées. Le formulaire de collecte des données cliniques était complété en deux temps : avant et après l'examen par la sage femme.

La première étape consistait à recueillir les informations sur l'âge, les raisons de la consultation, les comportements sexuels et moyen de contraception...etc. Ces informations étaient documentées sur le formulaire de collecte des données **(Annexe 01).** Après l'examen gynécologique, le formulaire de l'étude était complété par les signes observés au cour de la consultation.

II. 4.Saisie et traitement des données :

La saisie et le traitement des données ont été effectués sur les logiciels Word et Excel version 2010.

III. Matériels et méthodes:

III. 1.Matériels:

III. 1.1.Matériel biologique:

- Deux prélèvements de chaque femme ont été effectué (exocol et endocol) pour la recherche des microorganisme responsables des infections génitales basses et hautes.

III. 1.2.Matériels de prélèvement:

- Une table gynécologique
- Gantes
- Une lampe d'examen
- Des spéculums en inox stérile a usage unique
- Des pinces longuettes en inox stérilisé
- Des écouvillons stérile en tubes

- Des brosses type Cytobrush
- Des spatules d'Ayer en bois a extrémité bifide
- Des seringues stériles
- Lames
- Fixateur des frottis en spray
- Des compresses stériles
- Un antiseptique (Solution de Dakin)
- Des tubes contenant du bouillon nutritif

III. 1.3.Matériels de laboratoires:

- Bec Bunsen
- Tubes à essai +Portoirs
- Lames et lamelles
- Boites de pétri
- Anse de platine
- Bécher
- Eprouvette
- Des flacon en verre 250 ml
- Pince
- Tube à hémolyse
- Autoclave
- Four Pasteur
- Micropipette
- Microscope optique
- Agitateur
- Plaque chauffante
- Etuve à 37°C
- Réfrigérateur.

III. 1.4.Produits chimique et réactifs utilisés:

- Eau physiologique stérile
- Eau distillée
- Sang humain

- Sang de cheval citraté
- Produits de coloration de Gram (Violet de Gentiane, Lugole, Ethanol, Fushine)
- Milieux de culture **(Annexe 02)**
  - Gélose Chromagar
  - Gélose Chromagar *candida*
  - Gélose Chapman
  - Gélose Hektoen
  - Gélose au sang frais
  - Gélose au sang cuit
  - Gélose Columbia
  - Gélose Mueller Hinton
  - Gélose Mannitol mobilité
- Huile a immersion
- Huile de paraffine
- Disques des antibiotiques
- Peroxyde d'hydrogène H_2O_2 à10 volume
- Réactif oxydase
- Papier Watman
- Hydroxyde de potassium KOH
- Coffret Pour Groupage des Streptocoques
- Galerie miniaturisé Api 20 E
- Réactifs de la galerie Api 20E (TDA, Kovacs ,VP1,VP2)

III. 2.Méthodes :

III. 2.1.Prélèvement:

- **Conditions de prélèvement :**

- Dans les 48 heures qui précèdent l'examen la femme ne devra effectuer aucune toilette intime ou traitement local (crème, gels, savons...) ainsi que tout rapport sexuel le jour précédent l'examen. Le prélèvement doit être réalisé avant ou à distance de tout traitement. Il est préférable d'éviter le prélèvement pendant la période menstruelle car la flore est modifiée.

- **Le moment du prélèvement:**

- Avant d'effectuer le prélèvements un questionnaire a été rempli. La femme en position gynécologique.

- Avant de prélever il est important de « moucher » le col, c'est à dire d'enlever la glaire endocervicale avec une compresse imbibée de sérum physiologique montée sur une pince longuette.

- La sage femme nettoie la zone intime par une compresse immergé dans la solution de Dakin, les prélèvements seront pratiqués à deux niveaux : l'endocol et l'exocol avec un écouvillon pour chaque niveau sous contrôle à la vue en utilisant un spéculum.

- Après le prélèvement on doit casser chaque écouvillon à l'intérieur de tube qui contiens le bouillon nutritif stérile. Le bouillon nutritif sert à garder l'état physiologique des microorganismes.

- Un frottis cervico-vaginal est réalisé à l'aide d'une cytobruche pour l'endocol et une spatule d'Ayer pour l'exocol

- Etaler les sécrétions vaginale sur les deux lames, puis les fixer en vaporisant à 30 cm du spray sur les frottis.

- Le prélèvement et frottis cervico-vaginal à partir de l'endocol doit être réalisé au niveau de la zone de jonction entre l'épithélium pavimenteux du col (rose pâle et lisse) et l'épithélium glandulaire (rouge vif, papillaire).

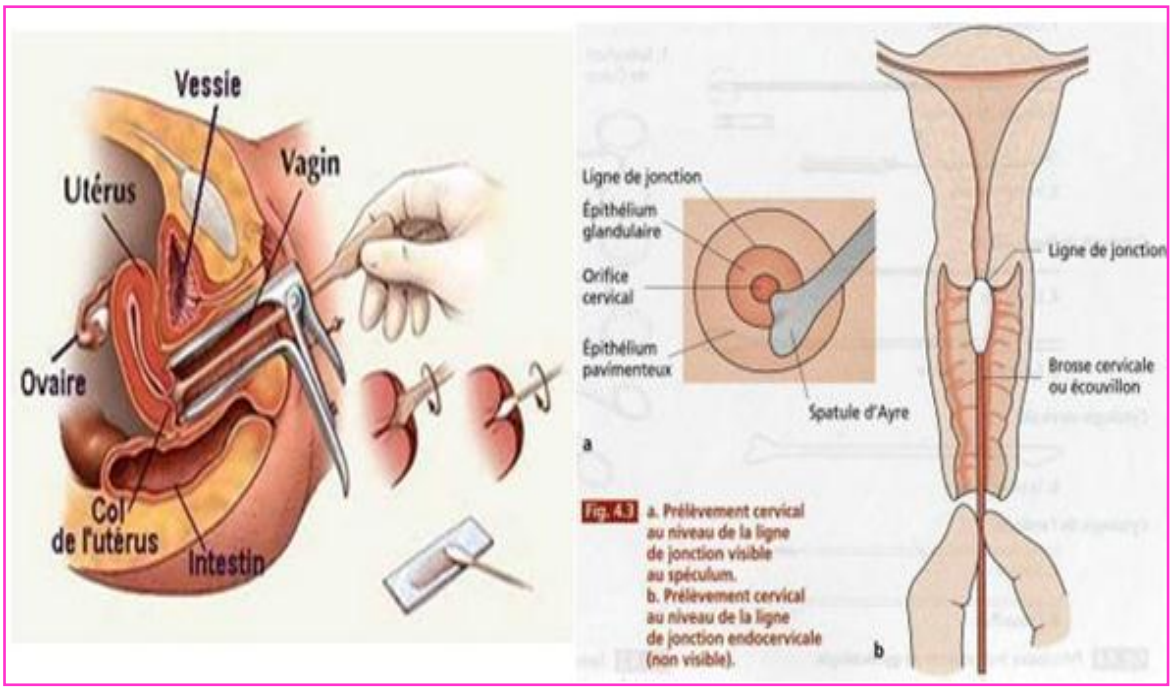


Fig. 4.3 a. Prélèvement cervical au niveau de la ligne de jonction visible au spéculum. b. Prélèvement cervical au niveau de la ligne de jonction endocervicale (non visible).

Figure 21: Prélèvement cervical au niveau de l'endocol

III. 2.2.Test de potasse:

- Ce test permet la mise en évidence d'amines telles que cadavérine, tyramine, histamine et putrescine, et permet de préciser l'étiologies de certaines infections vaginales. **(Meffert 1995)**

- **Mode opératoire:**

- Déposer une goutte de sécrétion vaginale à l'aide d'une seringue stérile sur une lame propre, puis ajouter une goutte de KOH à 10 %,Le test est dit positif s'il se dégage une odeur nauséabonde caractéristique de poisson pourri.

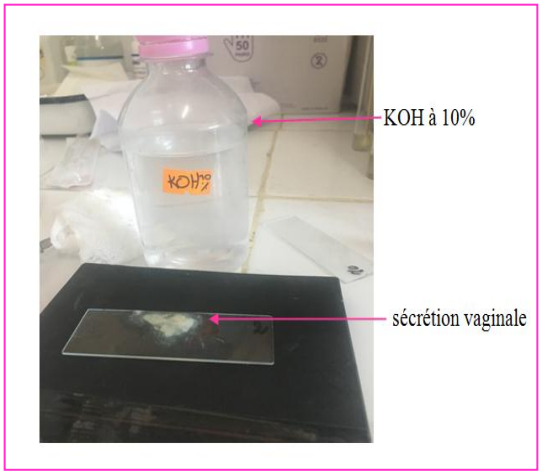


Figure 22: Teste de potasse **(Photo personnel).**

III. 2.3.Incubation des prélèvement :

- Incuber le deux tubes de bouillon nutritif contenant les écouvillons (endocol,exocol) à 37°C pendant 24h.

III. 2.4.Etude cytobactériologique:

- **Examen microscopique à l'état frais :**

- Prendre une goutte à partir de chaque tube et la déposer entre lame et lamelle et on faire l'observation à l'aide de microscope optique.

- **Examen microscopique après coloration de Gram:**

- Déposer une goutte du prélèvement sur une lame propre par l'anse de platine.

- Etaler sur une surface de 1 ou 2 cm^2.

- Fixer à la chaleur par passages rapides à travers la flamme du bec Bunsen jusqu'a l'obtention du frottis.

- Recouvrir le frottis par quelques gouttes de ***violet de Gentiane***; et le laisser agir 1 min ; rincer à l'eau

- Verser le ***lugol*** et laisser agir pendant 1 min ; rincer à l'eau.

- Décolorer à ***l'éthanol*** pendant quelques secondes ; rincer à l'eau.

- Réaliser une contre coloration des frottis 30 secondes à ***la fushine***. Apres le rinçage on va sécher le frottis au papier buvard .

- Faire une observation après dépôt d'une goutte de huile d'immersion à l'objectif × 100 .

III. 2.5.Mise en culture des prélèvement :

- Les ensemencements sont réalisés à la surface des déférent milieux préalablement fondus et coulés sur boites de Petri stériles.

III. 2.5.1.Les prélèvements d'exocol :

Pour la recherche des germes responsables des infection génitales basses, les milieux suivants ont été ensemencés:

- **Milieu Chromagar, Milieu Chapman, Milieu Hektoen:**

- Bien homogénéiser le tube qui contient le prélèvement d'exocol.
- Prés de bec Bunsen ouvrir le tube et prendre l'écouvillon à l'aide d'un pince stérile
- Ensemencer des stries serrés par l'écouvillon à la surface du milieu.
- Incuber à 37°C pendant 24h

- **Milieu Chromagar *candida* :**

- Bien homogénéiser le tube qui contiens le prélèvement d'exocol.
- Prés de bec Bunsen ouvrir le tube et prendre l'écouvillon à l'aide d'un pince stérile.
- Ensemencer des stries serrés par l'écouvillon à la surface du milieu.
- Incuber à 37°C pendant 48h

III. 2.5.2.Les prélèvements d'endocol:

Pour la recherche des germes responsables des infection génitales hautes, les milieux suivants ont été ensemencés .

- **Gélose au sang frais et Gélose au sang cuit (gélose chocolat):**

- Apres préparation du milieu **(Annexe 02).**

-Couler le milieu sur les boites de Petri et laisser solidifier prés de bec Bunsen .

- Bien homogénéiser le tube qui contiens le prélèvement d'exocol.

- Prés de bec Bunsen ouvrer le tube et prend l'écouvillon à l'aide d'un pince stérile.

- Ensemencer des stries serrés par l'écouvillon à la surface du milieu.

- Incuber dans une jarre à 37°C pendant 48h à 72h.

III. 2.6.Identification des isolats:

III. 2.6.1.Tests biochimique préliminaire:

Apres incubation, les souches isolées sur les différents milieux de culture ont subit une identification biochimique par API20E et des testes préliminaires notamment: recherche de catalase , oxydase et la mobilité.

- **Recherche de la catalase:**

- Sur une lame propre et bien désinfecté ,déposer une goutte d'H_2O_2 à 10 volume.

- Prés du bec Bunsen prend une colonie à l'aide d'une anse de platine.

- Dissoudre la colonie dans la goutte d'H_2O_2 .

- Une souche est qualifiée Catalase positive lors d'un dégagement immédiat des bulles gazeuses**. (Goldstein 2011).**

- **Test d'oxydase:**

- Déposer sur papier Watman une goutte de réactif d'oxydase.

- Prélever une colonie à l'aide d'un écouvillon stérile et bien frotter sur le goutte de réactif.

- En présence d'oxydase, une coloration violet-brun apparait immédiatement en quelque seconde. **(Donders 2006).**

- **Mannitol mobilité :**

- Préparer une suspension bactérienne dans un tube stérile.

- Ensemencer par piqure centrale à l'aide d'un fil droit.

- Incuber pendant 24h à37°C.

-Un virage du milieu au jaune indique que la bactérie mannitol positif, la mobilité se traduit par la formation d'un voile autour de la piqure. **(Janier 2003).**

- **Recherche de l'enzyme coagulase :**

- Ce test destiné à la confirmation des *staphylocoque aureus* qui possède l'enzyme coagulase.
- Prendre une colonie a partir du milieu Chapman avec une anse de platine.
- Ensemencer la colonie dans un tube qui contiens le bouillon cœur-cervelle (BHIB).
- Incubé le mélange pendant 18h à 37°C.
- Apres l'incubation, dans un tube à hémolyse stérile introduire 0,5 ml de plasma humain + 0,5 ml d'une culture de 18 h en bouillon cœur-cervelle de la souche à étudier.
- Placer le tube de mélange incliné à 37°C.
- La lecture doit être effectuée toute les heures au moins pendant les cinq premières heures.

- Coagulation du plasma indique la présence d'enzyme coagulase. **(Holder 2008).**

- **Test de filamentation en sérum pour *Candida*:**

- Dans un tube à hémolyse stérile bouché :

- Emulsionner dans 1 ml de sérum (patient du jour) une colonie isolée sur milieu de

- Incuber 3 heures à 37°C.

- Au bout des 3 heures, observer au microscope une goutte de la suspension et noter la filamentation des levures.

- Filamentation positive : *Candida albicans*.

- Filamentation négative : autre espèce de *Candida*. **(Halioua 2006).**

- **Test d'agglutination pour les streptocoques :**

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.

- **Mode opératoire:**

- Ramener les réactifs à température ambiante.
- Préparer l'extrait enzymatique de la souche à tester(prélever 2 à 6 colonies bien isolées et les émulsionner dans 0,4 ml d'enzyme d'extraction)
- Incuber 10 min à 37°C.
- Homogénéiser les suspensions de latex avant utilisation.
- Déposer une goutte de chaque latex sur le cercle correspondant.
- Déposer 1 goutte de pipette Pasteur d'extrait enzymatique de la souche à tester à côté de chaque latex.
- Mélanger avec un agitateur différent pour chaque cercle.
- Donner à la carte un mouvement de rotation pendant 1 min.
- Observer l'apparition d'agglutinats .

III. 2.6.2.Coloration de Gram :

- Introduire l'eau physiologique stérile dans un tube stérile.
- Avec la pipette Pasteur, prélever une grande colonie bien isolées sur milieu de culture.
- Réaliser une suspension bactérienne.
- Déposer une goutte du suspension sur une lame propre par l'anse de platine.
- Etaler sur une surface de 1 ou 2 cm^2.
- Fixer à la chaleur par passages rapides à travers la flamme du bec bunsen jusqu'à l'obtention du frottis, puis colorer (protocole déjà cité dans l'examen cytobactériologique).

III. 2.6.3.Identification par la galerie API 20E:

L'API 20 E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 20 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne 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. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés

par l'addition des réactifs. **(HERITAGE *et al.*,1999)**



Figure 24: Galerie API20E.

- **Mode opératoire :**

- **Préparation de la galerie:**

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau

distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.

- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.

- Sortir la galerie de son emballage.

- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

- **Préparation de l'inoculum :**

- Introduire 9 ml d'eau physiologique stérile dans un tube à vis stérile.

- Avec la pipette Pasteur, prélever une grande colonie ou quelque colonies homogènes et bien isolées sur milieu gélosé, utiliser une culture jeunes (18-24 h).

- Réaliser une suspension bactérienne dense en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le tube.

- **Ensemencement de la galerie :**

-Repartir de l'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.

- Ensemencer la galerie à l'aide d'une pipette pasteur stérile et éviter la formation de bulles .

- Pour les caractères soulignés Remplir le tube de suspension puis Recouvrir huile de paraffine Pour les tests : ADH, LDC, ODC, H_2S,URE.

- Pour les caractères encadrés Remplir le tube et la cupule de suspension Pour les tests : CIT, VP,GEL.

- Pour les caractères non encadrés non soulignés ensemencer uniquement le tubule par la suspension.

- Renfermer la boite d'incubation et la placer à 37°C pendant 24h.



Figure25: Ensemencement de la galerie API 20E**(Photo personnel).**

- **Lecture :**

Elle doit se faire en se référant au tableau de lecture après l'ajout de certain réactifs

- Teste TDA : On ajoute une goutte de réactif TDA(une couleur marron rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

- Test IND : on ajoute une goutte de réactif de Kovacs .(Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive .

- Test VP : On ajouter 2 goutte de réactif VP1et VP2 attendre 10 min une couleur rose ou rouge indique une réaction positive.

- Test Glu : Ajouter une goutte des réactifs NIT 1 et NIT 2 dans le tube GLU.

Attendre 2-5 minutes, une coloration rouge indique une réaction positive (NO2).

Une réaction négative (coloration jaune) peut être due à la production d'azote :

ajouter 2-3 mg de poudre de zinc dans la cupule GLU. Après 5 minutes, un tube

resté jaune indique une réaction positive à noter sur la fiche des résultats. Si la

cupule devient orange-rouge, la réaction est négative, les nitrates encore présents

dans le tube ont été réduits en nitrites par le Zn.

Remarque : le test de la recherche de production d'indole doit être réalisé en dernier, car

cette réaction libère des gaz qui risquent d'altérer l'interprétation d'autres tests de la

galerie. Ne pas remettre le couvercle d'incubation après l'ajout du réactif.

Si le nombre de tests positifs avant ajout des réactifs (y compris le test GLU) est inférieur à trois :

- Réincuber la galerie 24 heures (plus ou moins 2 heures) de plus sans rajouter les réactifs.

- Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs.

- **Interprétation des résultats:**

L'identification a été réalisée à l'aide d'un logiciel d'identification (feuille Excel

pour l'identification microbienne).

III. 2.7.Etude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques (Antibiogramme):

Il a été réalisé selon la méthode diffusion en milieu gélosé, méthode des disques (Antibiogramme standard).

- **Définition**

L'antibiogramme est l'examen biologique destiné à mesurer l'interaction entre chacune des molécules antibactériennes utilisables et une souche bactérienne susceptible d'être pathogène. Le résultat contribue à évaluer la sensibilité de la souche bactérienne examinée ou sa résistance, ce qui signifie que la molécule sera probablement active au sens thérapeutique ou le traitement sera un échec.

Le résultat numérique brut est accompagnéd'une interprétation ou remplacé par elle: résistant, sensible, intermédiaire ou indéterminée **(HERITAGE *et al.*,1999),**cette étude a été réalisé selon les recommandation de EUCAST (European Comity on Antimicrobial Suseptibility Testing).

- **Mode opératoire :**

- Couler la gélose de Mueller Hinton dans des boites de pétri stériles et prés de bec Bunsen avec un épissure de 04 mm et laisser solidifier.

- Réaliser une suspension bactérienne par le prélèvement d'une colonie pure jeune de 18h à 24h et la mettre en suspension dans 9ml d'eau stérile jusqu'a obtenir une suspension opaque.

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, enlever l'excès d'inoculum par pression sur les bord du tube.

- Etaler la surface de la gélose MH 04 fois à chaque fois tourner la boite de Petri 90° afin d'avoir une couche bactérienne).

- Laisser sécher de 3à 5 minutes.

- Déposer les disques d'antibiotique par un pince stérile

- Le choix de la gamme d'ATB est selon les germes identifiés .

-Incuber 24h à37°C.

- La lecture se fait par la mesure des diamètre d'inhibition.

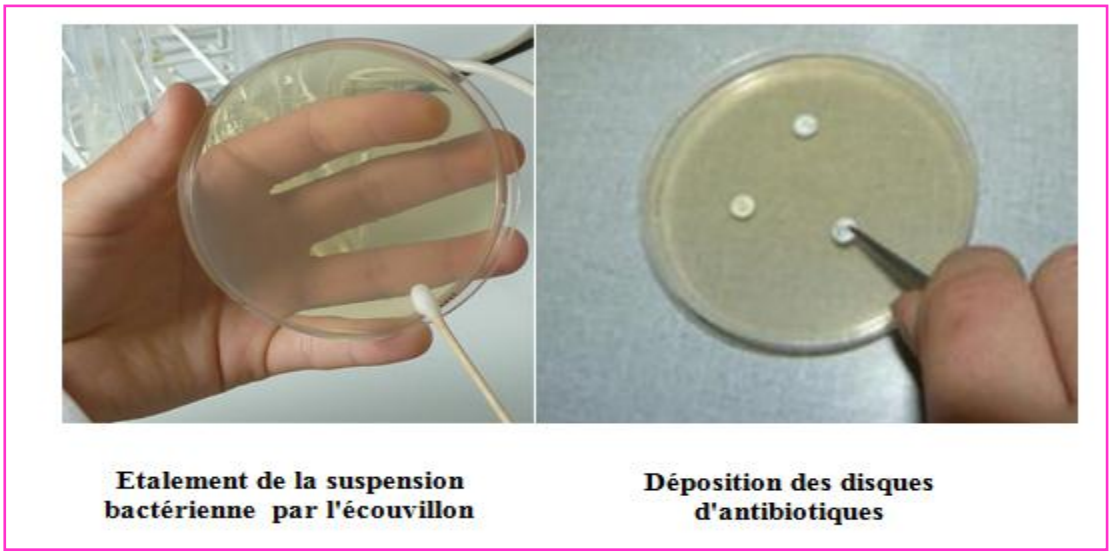


Figure 26: Mode opératoire d'antibiogramme **(Photo personnel).**