



SOMMAIRE

..... INTRODUCTION	4
ETUDE	
BIBLIOGRAPHIQUE	
.....5	
I - Appareil urinaire.....	6
1 - Anatomie.....	6
2 - Urines.....	8
II - Les infections urinaires.....	8
II - 1- Définition.....	8
II - 2 -Types d'infections urinaires.....	9
II - 3 - Complications possibles.....	9
II - 4 - Symptômes.....	10
II - 5 -Personnes à risque.....	10
II - 6 - Facteurs de risque.....	11
III. Fréquence des infections urinaire selon le sexe.....	11
IV - Défenses naturelles des voies urinaires.....	11
V - Germes responsables de l'infection.....	12
VI - Les voies de contamination.....	12
VII- Diagnostique biologique des infections urinaires.....	13
VIII - Traitement des infections urinaires.....	13
1 - Généralités.....	13
2 - Les familles d'antibiotiques utilisées et leurs modes d'action.....	14
MATERIELS &	
METHODES	
.....13	
I - Recueil et transport des urines.....	16
II - examen cytot bactériologique.....	16
II - 1 - Examen macroscopique.....	16
II - 2 - Examen microscopique.....	17



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
Faculté des Sciences et Techniques
- Département des sciences de la vie -



II	-	2	-	1	-	Examen
cytologique.....1						
4						
		*Examen				quantitatif
.....14						
		*Examen				qualitatif.....
.....14						
II	-	2	-	2	-	Examen
bactériologique.....1						
6						
		A	-			Culture.....
.....16						
		B				Identification.....
.....20						
		C				-
Antibiogramme.....						
.....25						

RESULTATS

&

DISCUSSION

33.....

I - Fréquence des infections urinaires.....	27
II - Répartition de l'infection urinaire.....	34
II - 1 - Répartition selon le sexe.....	34
II - 2 - Répartition selon la provenance.....	35
II - 3 - Répartition de l'infection selon les services.....	36
II - 4 - Comparaisons à des études similaires.....	29
III - La répartition des germes responsables des infections urinaires.....	37
IV - Profils de résistance et de sensibilité des principaux germes isolés aux antibiotiques testés.....	32

CONCLUSION.....
44

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES.....45

ANNEXES.....46



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
Faculté des Sciences et Techniques
- Département des sciences de la vie -



INTRODUCTION

Les infections qui touchent l'appareil urinaire sont très fréquentes, mais elles sont souvent considérées comme banales et bénignes, alors qu'elles peuvent avoir en absence de traitement efficace des conséquences pathologiques sévères et entraîner des complications notamment des atteintes de la fonction rénale.

Le bon traitement se base sur le diagnostic biologique de l'infection urinaire par la méthode de l'Examen Cytobactériologique des Urines (ECBU).



L'ECBU est le résultat d'un examen cytologique de l'urine qui révèle le degré de l'inflammation évaluée par la présence anormale de leucocyte, une mise en culture bactériologique pour isoler et identifier le germe responsable de l'infection et un antibiogramme pour déceler la sensibilité de ce germe vis-à-vis des antibiotiques testés.

L'examen est simple à réaliser, mais sa qualité repose sur le respect d'une méthodologie bien définie et très rigoureuse (2).

Dans le cadre de notre formation, nous nous sommes intéressés à cet examen dans le but de mesurer la fréquence de l'infection urinaire, déterminer les germes en cause et étudier leur sensibilité aux antibiotiques usuels.

Pour ce faire nous avons travaillé au laboratoire d'analyses médicales du CHU Hassan II de Fès pour une durée d'un mois et demi s'étalant de 15 Avril au 31 Mai.

Présentation du lieu de stage

Le Laboratoire Central d'Analyses Médicales est conçu comme un pôle d'activité hospitalière comportant plusieurs spécialités d'analyses médicales :

- Anatomie pathologique;
- Bactériologie-Immunoanalyses;
- Parasitologie;



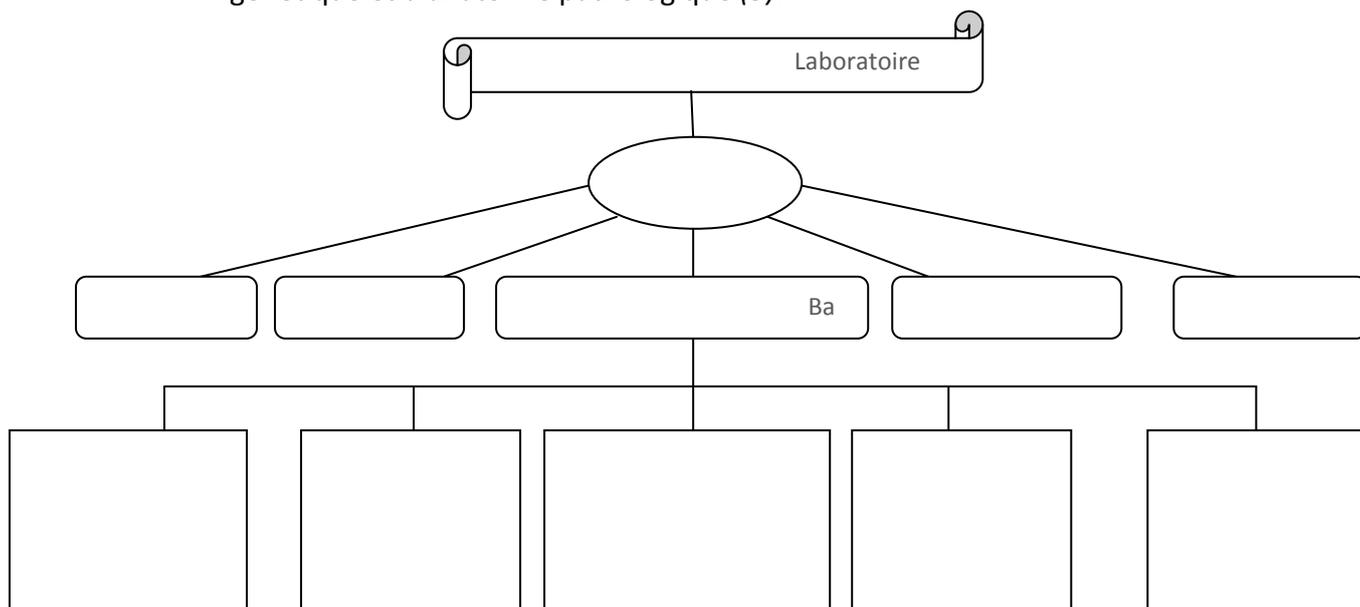
- Biochimie et pharmaco-toxicologie;
- Hématologie;
- Génétique médicale et biologie moléculaire.

Il se compose de :

- Salle de réception;
- Salle de prélèvements;
- Laboratoire de biochimie/Pharmacotoxicologie;
- Laboratoire d'hématologie;
- Laboratoire de bactériologie /Immunologie;
- Laboratoire de parasitologie;
- Laboratoire de génétique;
- Laboratoire d'anatomie pathologique.

La création d'un laboratoire central d'analyses médicales au sein du CHU est une première nationale. Cette conception adoptée récemment dans les laboratoires hospitaliers internationaux permet de :

- Optimiser les moyens techniques et le budget de fonctionnement du laboratoire;
- Offrir des plateaux techniques spécialisés de grande qualité ouverts à toutes les disciplines biologiques;
- Par une communication informatique inter laboratoires, un échange continu d'informations et une complémentarité dans les bilans réalisés;
- Assurer une formation complète et de haut niveau aux résidents de biologie, de génétique et d'anatomie pathologique (3).



ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I - APPAREIL URINAIRE

1 - ANATOMIE

L'appareil urinaire est composé de (figure 1):

- **Les reins:** organe vital ayant de multiples fonctions dont la régulation de la tension, il est surtout l'un des principaux organes de détoxification. Il assure par filtration et excrétion d'urine l'équilibre hydroélectrolytique (homéostasie) du sang et de l'organisme en général.
- **Les uretères:** se sont les conduits qui transportent l'urine des bassinets vers la vessie. Chez l'adulte, ils mesurent d'habitude 25 à 35 cm de long.
- **La vessie:** c'est l'organe dont la fonction est de recevoir l'urine terminale produite par les reins puis de la conserver avant son évacuation au cours de la miction
- **L'urètre:** est le canal de sortie de la vessie. Il a une fonction excrétrice dans les deux sexes (sortie de l'urine) et de plus chez l'homme une fonction reproductrice (passage du sperme).

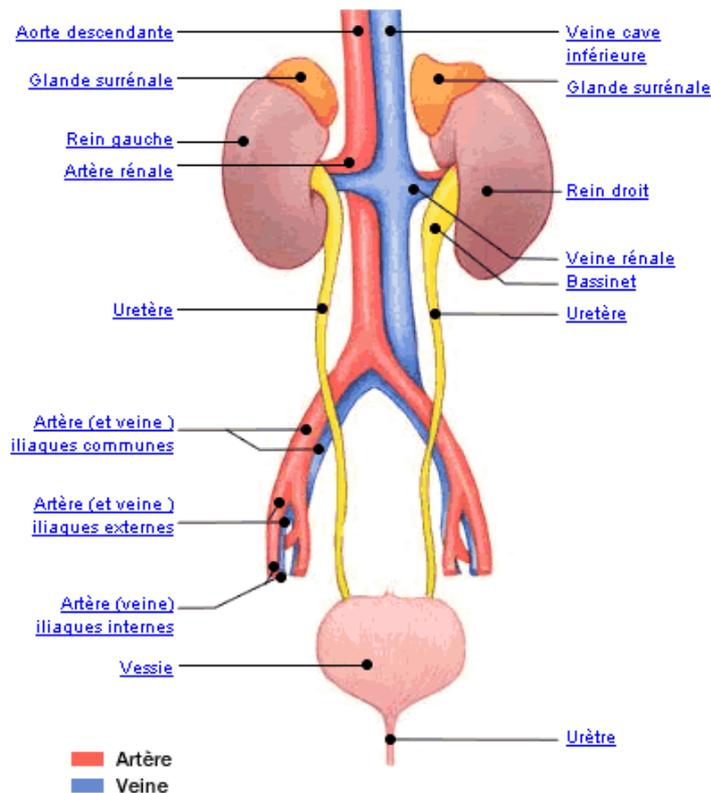


Figure 1: schéma de l'anatomie de l'appareil urinaire



2 - URINES

2 - 1 - Urines normales

L'**urine** est un liquide biologique composé des déchets de l'organisme. L'urine est secrétée par les reins par filtration du sang, puis par récupération des molécules de l'urine « primitive » pour former l'« urine définitive », qui sera expulsée hors du corps par le système urinaire.

L'urine est composée de:

- eau : 95% (voir un peu plus en cas de potomanie)
- composés organiques (environ 2% du total) :
 - urée : 2 % (produit terminal du catabolisme des protéines).
 - créatinine : 0,1 % (produit terminal du catabolisme de la créatine musculaire).
 - acide urique : 0,03 % (produit terminal du catabolisme des acides nucléiques : ADN, ARN).
 - acide hippurique.
 - urobilirubine.
- minéraux.
- des toxiques à élimination rénale ou des médicaments, des drogues.

2 - 2 - Urines en pathologie

Le changement de couleur peut être le témoin d'un ictère (jaunisse). Dans ce cas, les urines apparaissent de couleur brun acajou.

Hématurie : présence de sang dans les urines, se traduisant par une coloration rose ou rouge suivant l'importance de l'hématurie. La présence de sang dans les urines peut traduire une infection de la vessie, de la prostate, de l'urètre ou des reins

Leucocyturie : les leucocytes (globules blancs) sont normalement présents dans les urines en quantité inférieure à 5000 par minute. L'augmentation de ce chiffre peut être le résultat d'une infection des voies urinaires comme une pyélonéphrite (infection due à la présence de pus dans les bassinets) ou une prostatite (inflammation de la prostate due à une infection)

Oligurie : diminution importante du volume des urines. Dans ce cas, la quantité d'urine émise est inférieure à 12 ml par vingt-quatre heures.

Anurie : arrêt total de la sécrétion d'urine. L'oligurie et l'anurie sont le témoin d'une insuffisance de fonctionnement des reins (insuffisance rénale) généralement aiguë (survenant sur une période relativement courte) (9).



II - LES INFECTIONS URINAIRES

II - 1- DEFINITION

C'est l'infection - aiguë ou chronique - d'un organe qui fait partie de l'appareil urinaire : la vessie, le rein, l'urètre, ou la prostate (glande située autour de l'urètre de l'homme) (10).

L'INFECTION URINAIRE EST CAUSEE PAR LA
PROLIFERATION ANORMALE D'AGENTS INFECTIEUX DANS LE
SYSTEME URINAIRE (1).

II - 2 -TYPES D'INFECTIONS URINAIRES

On distingue trois types d'infections urinaires, selon la localisation de l'infection.

✓ **La cystite:** De loin la forme d'infection urinaire la plus courante, il s'agit de l'inflammation de la vessie se caractérisant par une pollakiurie (augmentation du nombre de miction), par des mictions impérieuses et douloureuses (dysurie) et éventuellement par hématurie, les urines sont généralement troubles et malodorantes mais la fièvre est absente.

On distingue la cystite aiguë simple chez une femme de 15 à 65 ans en dehors de la grossesse et en absence de facteur de risque et la cystite aiguë compliquée chez la femme enceinte, les porteuses de sonde urinaire, chez les immunodéprimés, les diabétiques. La cystite s'accompagne normalement d'une urétrite, l'inflammation de l'urètre (1).

✓ **L'urétrite:** c'est l'infection de l'urètre. Il s'agit d'une infection transmissible sexuellement (ITS) Différents agents infectieux peuvent causer l'urétrite. Les plus communs sont la chlamydia et le gonocoque (1).

✓ **La pyélonéphrite:** c'est un état plus grave. Elle désigne l'inflammation du bassinet et du rein (du grec *puelos* = bassin et *nephros* = reins). Celle-ci résulte généralement d'une infection bactérienne. Il peut s'agir d'une complication d'une cystite non traitée ou mal traitée qui permet la prolifération des bactéries de la vessie vers les reins.

Lorsqu'une personne est affectée par un problème chronique aux voies urinaires (malformation anatomique, maladie des reins ou de la vessie), il n'est pas rare qu'elle souffre d'infections récurrentes. Souvent, ces problèmes sont aggravés par les interventions en milieu hospitalier, comme le port d'une sonde urétrale (cathéter) pour recueillir l'urine.

La pyélonéphrite aiguë chez la femme jeune se traduit typiquement par un tableau infectieux sévère avec fièvre à 40°C et frissons généralisés, douleur lombaire unilatérale évoquant une colique néphrétique, nausées ou vomissements, émission d'urines troubles et foncées (1).

II - 3 - COMPLICATIONS POSSIBLES



Dans tous les cas, il importe de consulter un médecin si des signes d'infection urinaire se manifestent. Si l'infection n'est pas traitée, l'agent infectieux continue à se multiplier et à envahir les voies urinaires. Cela peut mener à un problème plus grave aux reins, comme une pyélonéphrite ou des calculs rénaux. Exceptionnellement, une infection urinaire peut s'aggraver au point d'entraîner une septicémie ou de l'insuffisance rénale. (1)

II - 4 - SYMPTOMES

Les symptômes les plus communs:

- des douleurs ou des brûlures au moment d'uriner.
- une fréquence anormalement élevée de mictions durant le jour (parfois le besoin d'uriner survient aussi la nuit).
- un sentiment persistant d'avoir besoin d'uriner.
- des urines troubles, qui dégagent une odeur désagréable.
- une pression dans le bas-ventre.
- parfois, du sang dans l'urine (hématurie).

Dans le cas d'une infection des reins:

- des douleurs lombaires.
- des frissons.
- de la fièvre.
- des vomissements.

Chez les enfants, l'infection urinaire se traduit aussi par de l'énurésie (pipi au lit) et par des plaintes ou des pleurs au moment d'uriner (1).

II - 5 - PERSONNES A RISQUE

- Les femmes, surtout celles qui sont actives sexuellement.
- Les hommes atteints d'une hypertrophie bénigne de la prostate ou d'une prostatite. Lorsqu'elle augmente de taille, la prostate comprime l'urètre, ce qui ralentit l'évacuation de l'urine.
- Les femmes enceintes sont particulièrement à risque en raison de la pression exercée par le bébé sur le système urinaire, mais aussi des changements hormonaux inhérents à la grossesse.
- Les femmes ayant une vaginite causée par une baisse d'hormones œstrogènes, après la ménopause.
- Les personnes diabétiques, en raison du taux élevé de sucre dans leur urine, qui constitue un milieu favorable au développement bactérien, et de leur sensibilité accrue aux infections.
- Les personnes chez qui on a introduit une sonde dans l'urètre. Les personnes qui ne peuvent uriner, qui sont inconscientes ou gravement malades ont souvent besoin d'une sonde le temps de retrouver leurs fonctions urinaires. Certaines personnes qui ont une atteinte au système nerveux en auront besoin toute leur vie. Les bactéries se servent alors de la surface du tube pour infecter le tractus urinaire. Parfois contractées à l'hôpital, ces bactéries ont pu développer une certaine résistance nécessitant le recours à des antibiotiques plus puissants.



- Les personnes qui ont une anomalie structurale des voies urinaires, qui souffrent de calculs rénaux ou de divers troubles neurologiques (1).

II - 6 - FACTEURS DE RISQUE

Chez les femmes:

- Urètre court, Large et proche de la région péri anale. Les bactéries commensales de l'intestin peuvent facilement coloniser la vessie.
- Chez certaines femmes qui utilisent un diaphragme comme moyen contraceptif, l'urètre se trouvera comprimé, ce qui empêche la vessie de se vider complètement et favorise les infections de la vessie.
- Certaines femmes contractent une urétrite en raison de l'usage de spermicides.
- Les femmes ménopausées ayant une sécheresse des muqueuses ce qui favorise la colonisation bactérienne.

Chez les hommes:

- Des calculs qui empêchent l'écoulement urinaire
- Diminution de la testostérone

Chez les enfants:

Une mal formation génitale (1).

III. FREQUENCE DES INFECTIONS URINAIRES SELON LE SEXE

Pour des raisons anatomiques, l'infection urinaire est plus fréquente chez la femme. En effet, chez la femme, le méat urinaire est proche de l'anus où sont toujours présentes des bactéries. Ces bactéries peuvent remonter le long de l'urètre vers la vessie et proliférer dans l'urine.

Un défaut d'hygiène locale peut donc favoriser les infections urinaires chez la femme.

L'homme est relativement protégé des infections urinaires par la distance qui sépare l'anus et son méat urinaire-orifice situé à l'extrémité du gland- (la longueur de l'urètre masculin est en moyenne de 16 cm, alors que celle de l'urètre féminin est de 2 cm). L'infection urinaire est donc plus souvent chez lui la traduction d'une anomalie au niveau des voies urinaires, en particulier l'existence d'un adénome de la prostate (qui provoque une stase des



urines dans la vessie). Les jeunes hommes sont peu touchés par cette affection. Cependant, les hommes d'âge mûr qui sont atteints de troubles de la prostate en sont plus à risque (1).

IV - DEFENSES NATURELLES DES VOIES URINAIRES

Normalement, l'urine est stérile. Elle contient de l'eau à 96 %, des sels et des composants organiques, mais est exempte de micro-organismes. Le système urinaire possède de nombreuses défenses contre les infections :

- le flot urinaire expulse les bactéries et rend plus difficile leur ascension vers la vessie et les reins;
- l'acidité de l'urine ($\text{pH} < 5,5$) inhibe la croissance des bactéries;
- la forme des uretères et de la vessie prévient le retour de l'urine vers les reins;
- le système immunitaire en général lutte contre les infections;
- la paroi de la vessie contient des cellules immunitaires ainsi que des substances antibactériennes;
- chez les hommes, les sécrétions de la prostate contiennent des substances qui ralentissent la multiplication des bactéries dans l'urètre (1).

V - GERMES RESPONSABLES DE L'INFECTION

Espèces responsables d'infections urinaires:

➤ **Gram négatif**

Escherichia coli

Proteus mirabilis

Klebsiella spp.

Pseudomonas aeruginosa

Enterobacter

Serratia

Autres entérobactéries

Acinetobacter spp.

➤ **Gram positif**

Enterococcus spp.

Staphylococcus saprophyticus

Staphylococcus aureus

Streptococcus agalactiae

➤ **Levures :**

Candida albicans

➤ **Parasites :**

Trichomonas vaginalis (8).



VI - LES VOIES DE CONTAMINATION

La pénétration du milieu urinaire par les bactéries se fait classiquement par trois voies :

- Hématogène : rare elle est secondaire à une septicémie.
- Ascendante: fréquente à partir du périnée antérieur et la contamination par des espèces de la flore vaginale, à partir du périnée postérieur péri anal et la contamination par des entérobactéries de la flore intestinale.

A la périphérie du périnée et la contamination par la flore cutanée commensale.

- Infection iatrogène: Résultant d'une contamination par un instrument endo-urinaire (sonde (15)).

VII- DIAGNOSTIQUE BIOLOGIQUE DES INFECTIONS URINAIRES

L'examen de biologie médicale utilisé pour détecter une infection urinaire est L'**examen cytobactériologique des urines (ECBU)**, c'est un ensemble étudiant l'urine d'un patient et déterminant notamment la numération des hématies et des leucocytes, la présence ou non de cristaux et de germes.

Un ECBU est considéré positif quand la leucocyturie est supérieure à 10^4 /mL et la bactériurie est supérieure à 10^5 UFC/mL.

Les principales circonstances de demande d'un ECBU sont:

- la présence de signes cliniques : cystite, pyélonéphrite, prostatite ;
- une fièvre isolée surtout chez le nourrisson ;
- une hématurie, une pyurie, des tests de dépistage positifs ;
- une prescription systématique chez des patients à risque : diabétiques, grabataires, problèmes urologiques, porteurs de sonde, femmes enceintes, bilan pré-opératoire etc.
- un contrôle de traitement (2).

VIII - TRAITEMENT DES INFECTIONS URINAIRES

1 - GENERALITES

Le traitement de l'infection urinaire repose sur l'**antibiothérapie**, il faut sélectionner l'antibiotique le plus efficace sur la bactérie pathogène, il faut également connaître les propriétés pharmacocinétique de l'antibiotique choisi (absorption, diffusion tissulaire, degrés de fixation, toxicité, transformation dans l'organisme et voies d'élimination) (1).

L'antibiogramme est une analyse bactériologique du laboratoire qui permet d'apprécier *in vitro* la sensibilité ou la résistance de l'agent infectieux à plusieurs antibiotiques. Le procédé consiste à cultiver les bactéries présentes dans un prélèvement (urines, sang...) afin de les



identifier et de tester sur les colonies obtenues l'efficacité de divers antibiotiques. Il existe de nombreuses méthodes pour réaliser un antibiogramme, notamment par dilution ou par diffusion, les méthodes de dilution sont des méthodes quantitatives, alors que les méthodes de diffusion, les méthodes de dilution sont des méthodes qualitatives.

Actuellement il existe des appareils qui permettent de réaliser l'antibiogramme de façon automatisée (16).

Un antibiotique: (du grec *anti* : « contre », et *bios* : « la vie ») est une substance qui a une action spécifique de blocage ou même de destruction des bactéries. Pour les autres micro-organismes, on utilise le terme d'« antifongique » s'il s'agit de lutte contre les champignons, ou d'« antiviral » s'il s'agit de lutte contre les virus.

Cette substance peut avoir une action toxique directe, c'est-à-dire bactéricide ; son efficacité peut être également limitée à empêcher le développement des micro-organismes (action bactériostatique) (11).

2 - LES FAMILLES D'ANTIBIOTIQUES UTILISEES ET LEURS MODES D'ACTION

2 - 1 - Bêta-lactamines

Les **bêta-lactamines** (β -lactamines) ou antibiotiques β -lactame sont une large classe d'antibiotiques qui comprennent les dérivés de la pénicilline, les céphalosporines, les monobactames, les carbapénèmes et les inhibiteurs de la β -lactamase, en bref, tout antibiotique qui contient un noyau β -lactame dans sa structure moléculaire. Le noyau (cycle bêta-lactame) est la partie efficace de la molécule.

Mode d'action : Ces antibiotiques agissent de l'extérieur de la cellule bactérienne, en se fixant sur ces protéines membranaires, aussi appelées Protéines de Liaison aux Pénicillines (PLP). Ces protéines sont des enzymes catalysant en particulier la formation des liaisons entre les chaînes peptidiques dans la paroi ou assurant le remaniement de ces chaînons (11).

2 - 2 - Aminosides

Les **aminosides** ou aminoglycosides constituent une famille d'antibiotiques actifs sur certains types de bactéries. Ils comprennent l'amikacine, la gentamicine, la kanamycine, la néomycine, la nétilmicine, la paromomycine, la streptomycine et la tobramycine. La plupart de ces antibiotiques sont produits par des bactéries de la famille des actinomycètes, ou en sont dérivés par hémisynthèse.

Mode d'action : Les aminosides se lient à la sous-unité 30S des ribosomes des bactéries et interfèrent avec la traduction des ARN messagers en protéines (11).



2 - 3 - Glycopeptides

Les **glycopeptides** sont des antibiotiques s'attaquant au constituant principal des parois des bactéries : le peptidoglycane. Appartiennent à cette classe d'antibiotique la vancomycine et la teicoplanine.

Le glycopeptide a une action sur la formation du peptidoglycane en effectuant un encombrement stérique bloquant l'assemblage des précurseurs formant la paroi, c'est-à-dire l'enchaînement d'acides aminés D-Ala-D-Ala et différents peptides (11).

2 - 4 - Phénicoles

Les **phénicoles** constituent une famille d'antibiotiques, dont les molécules très simples, ont un spectre d'action très large, mais les résistances sont nombreuses et ont de nombreux effets secondaires, entre autres un risque d'agranulocytose. Ces molécules sont aujourd'hui synthétisées par les chimistes organiciens. Il s'agit principalement du chloramphénicol, Florphenicol, et du thiamphénicol (11).

2 - 5 - Tétracyclines

La **tétracycline** est un antibiotique produit par une bactérie du genre Streptomyces. Elle est indiquée contre nombre d'infections bactériennes. Elle est également disponible comme laurylsulfate (Tetralysal®), etc. On l'utilise également pour produire de nombreux dérivés semi-synthétiques, les cyclines ou tétracyclines (au pluriel) (11).

2 - 6 - Macrolides

Les **macrolides** sont donc actifs sur les germes intracellulaires. Ils sont utilisés dans le cas des infections pulmonaires atypiques (légionellose, infection à Chlamydia), de certaines infections à streptocoques, staphylocoques méti-S, entérocoques. Cependant leur usage est délicat en raison de nombreux effets secondaires et interactions médicamenteuses.

Mode d'action: les macrolides (des bactériostatiques) à chaîne 14 ou 16 carbones altèrent la synthèse des protéines bactériennes en se fixant sur les ribosomes (sous unité 50S ; et donc blocage par encombrement stérique) (11).

2 - 7 - Quinolones

Les **quinolones** et **fluoroquinolones** :

Les quinolones ciblent l'ADN gyrase et la topoisomérase II et IV, empêchant la réplication de l'ADN bactérien. Leur mode d'action comprend un effet oxydant sur les bactéries, mais leur effet principal est dû à la fixation de la molécule quinolone sur l'ADN lors de la phase de



duplication de l'ADN au cours de la mitose. La topoisomérase II est la protéine qui permet à une bactérie ne mesurant que $2\mu\text{m}$ sur $1\mu\text{m}$ en moyenne de contenir un ADN long de $1700\mu\text{m}$ (effet de surenroulement de l'ADN sur lui-même). L'inhibition de la topoisomérase II induit des cassures dans l'ADN (effet clastogène). Les quinolones se fixent par ailleurs sur les extrémités des brins d'ADN qui ne peuvent plus se réassembler. Cette formation d'un complexe ADN-quinolones est irréversible. L'étape suivante est celle de la mort cellulaire programmée (apoptose). Il semble cependant que de nombreux cas, la bactérie ne meure pas immédiatement : encore présente dans l'organisme, elle ne peut plus se reproduire. Cela pourrait expliquer le remarquable effet post-antibiotique que l'on observe avec les fluoroquinolones, effet qu'aucune étude n'explique de manière satisfaisante à ce jour (11).

MATERIELS & METHODES

I - RECUEIL ET TRANSPORT DES URINES

Le prélèvement des urines est un temps essentiel de l'ECBU. Il doit être fait avec beaucoup de soin car il conditionne la qualité de l'analyse et de son résultat.

Habituellement, il doit être réalisé avant toute antibiothérapie. Les urines sont recueillies de préférence le matin ou après avoir séjourné au moins 3 heures dans la vessie. Après une toilette soignée au savon du périnée, le premier jet de la miction est éliminé, puis le patient recueille ses urines du milieu du jet dans un flacon stérile de 40 ml.

Le flacon est identifié et immédiatement acheminé au laboratoire. Si l'examen ne peut être effectué dans l'heure qui suit son émission, il est conseillé de la mettre à $+ 4^{\circ}\text{C}$ sans dépasser les 4 Heures.

- **Porteur de sonde:** chez le porteur d'une sonde, on ne doit pas prélever dans la poche où la pullulation bactérienne est très importante, mais par ponction directe dans la sonde après désinfection, ou dans la chambre à prélèvement lorsqu'il y en a une, ensuite on transvase le prélèvement dans un flacon stérile. (18)

- **Ponction sus-pubienne:** rarement pratiqué, ce type de prélèvement consiste à prélever l'urine directement dans la vessie en traversant la peau, (18)

- **Nourrisson :** Chez le petit enfant on doit utiliser un collecteur stérile spécifique. Ce dispositif à usage unique adapté à l'anatomie se pose après désinfection soignée et ne peut être laissé en place plus d'une heure. Passé ce délai, si l'enfant n'a pas uriné, le dispositif est éliminé et remplacé par un collecteur neuf. Dès la miction terminée le collecteur est enlevé et les urines



sont transvasées soigneusement dans un flacon stérile puis acheminées rapidement vers le laboratoire.

II - EXAMEN CYTOBACTERIOLOGIQUE

II - 1 - EXAMEN MACROSCOPIQUE

- On détermine le pH à l'aide d'un papier indicateur.
- On note les éléments suivants:
 - Aspect: clair, limpide, trouble, louche...
 - Couleur: jaune, hématurique, éventuellement colorée par des médicaments (bleu de méthylène, rifampicine...)
 - Présence de sédiments et leur abondance:
 - Culot blanchâtre: des phosphates.
 - Culot rouge brique: acide urique.
 - Culot rose: urate de soude. (16)

II - 2 - EXAMEN MICROSCOPIQUE

Il comprend un examen cytologique et un examen bactériologique:

II - 2 - 1 - EXAMEN CYTOLOGIQUE:

*Examen quantitatif

A l'aide d'un dispositif à numération type *cellule de Malassez* de préférence à usage unique on dénombre les différents éléments figurés contenus dans un volume donné de l'urine à étudier.

Leur nombre est rapporté au ml. A l'état physiologique, l'urine contient moins de 10 000 leucocytes et 5 000 hématies par ml.

En cas d'infection urinaire, le processus inflammatoire se traduit le plus souvent par la présence de :

- **50.000 leucocytes /ml**, parfois en amas ;
- **10.000 hématies /ml** témoins de microhémorragies;
- cellules du revêtement urothélial.

Si la présence de cylindres leucocytaires s'avère importante à prendre en compte, la notion d'altération des leucocytes n'amène pas d'élément sémiologique supplémentaire (2).

*Examen qualitatif



Dans les urines claires on utilise la technique de centrifugation afin d'augmenter les chances d'études des cellules. Cette technique est réalisée comme suit:

- homogénéiser délicatement l'urine.
- verser aussitôt dans un tube rempli au 3/4.
- centrifuger 5 min à vitesse moyenne (4500 tr/min).
- rejeter le surnageant puis agiter le tube pour remettre en suspension le culot.
- déposer une goutte du culot sur une lame et recouvrir d'une lamelle puis examiner aussitôt au microscope.

Lorsque l'urine est apparemment trouble (critère d'infection), on procède au dépôt direct d'une goutte d'urine entre lame et lamelle. On observe ensuite les différents composants normaux et pathologiques présents qui sont:

- ❖ **Les leucocytes:** ils sont sous forme de disque avec des noyaux souvent visibles, ils peuvent se présenter sous 3 formes:
 - Intacts.
 - En amas de leucocytes altérés, sous forme de pus.
 - Altérés

Un grand nombre de ces cellules prouve la présence d'une infection et/ou d'une inflammation.

- ❖ **Les hématies:** elles se reconnaissent par l'absence du noyau et leur forme spécifique : disque biconcave, ainsi par un intérieur transparent après la mise au point au niveau du microscope.
- ❖ **Les cellules épithéliales:** ce sont des éléments de taille moyenne, on tient compte de leur nombre (rares, quelque, assez nombreuses, nombreuses, très nombreuses).

On assimile les cellules observées à l'un des 3 groupes suivants:

- Cellules tubulaires.
- Cellules de transition : 2 à 4 fois la taille d'un leucocyte.
- Cellules pavimenteuses: les plus grandes.

Ces cellules signent la présence d'une souffrance du revêtement urothélial.

Tableau 1: correspondance des cellules épithéliales par rapport au nombre (14):

Quantité par champ	< 0,1	0,1	1	10	100
Correspondance	absence ou rare	quelques	assez nombreux	nombreux	très nombreux



- ❖ **Les cylindres:** modules protéiques des tubules rénaux et que l'on rencontre dans certaines atteintes du parenchyme rénal. Ils ont des formes de rubans cylindriques.

Les différents types de cylindres sont:

- Les cylindres hyalins de contenu transparent.
- Les cylindres hématiques (inclus d'hématies).
- Les cylindres leucocytaires.
- Les cylindres granuleux.
- Les cylindres graisseux.
- Les cylindres de cristaux.

- ❖ **Les cristaux:** ce sont des produits provenant du métabolisme suite à des facteurs physico-chimiques et qu'on peut retrouver même en absence de toute infection.

Les cristaux les plus fréquemment trouvés sont:

- Oxalate de calcium.
- Acide urique.
- Phosphates ammoniacaux-magnésiens.
- Carbonates de calcium, la cystine phosphates bicalciques sont des cristaux moins fréquentes.

- ❖ **Les germes:** la plupart des infections sont liées à un type de germe qui est E.coli qui vit normalement dans le colon, mais d'autres germes peuvent être en cause tel que (proteus, klebsielles, staphylocoque, streptocoque, pseudomonas...).

- ❖ **Les levures:** Comme pour la présence de bactéries, la présence de levures est un indice d'infection. La levure la plus fréquente dans l'urine, est le Candida. L'identification de ce type de levure est relativement aisée à cause de son aspect caractéristique en forme de quille. Dans la majorité des cas, on observe des cellules isolées mais dans certains cas il est possible de voir un pseudohyphes avec ses bourgeons.

- ❖ **Les parasites:** Le parasite le plus fréquent en microscopie urinaire est le trichomonas. Habituellement, celui-ci provient d'une contamination par des sécrétions de l'appareil génital (18).

***L'examen cytologique est maintenant automatisé**



L'analyse cytologique des urines réalisée par une méthode manuelle microscopique est difficile à maîtriser. L'automatisation de la cytologie urinaire permet de standardiser cet examen (7).

L'**UF-1000i Sysmex** est l'automate destiné à l'analyse de l'ECBU, il effectue la numération des globules rouges, des globules blancs, des bactéries, des cylindres et des cellules épithéliales. S'y ajoutent des alarmes quantitatives pour les cristaux, les levures, les spermatozoïdes, les cylindres pathologiques, les petites cellules rondes ainsi que la présence de mucus.

Cette machine mélange, aspire, dilue, analyse et identifie les différentes particules dans les échantillons d'urines par la combinaison de deux principes: **Coulter** (détection volumétrique) et la **cytométrie en flux** (détection optique); et elle permet aussi l'affichage des résultats sur ordinateur (6).



Figure 2: L'UF 1000i Sysmex

II - 2 - 2 - EXAMEN BACTERIOLOGIQUE

A - CULTURE

Elle permet l'isolement des bactéries et leur numération.

A - 1 - MILIEUX DE CULTURE:

Un **milieu de culture** est un support qui permet la culture de cellules, de bactéries, de levures, de moisissures afin de permettre leur étude. En principe, les cellules trouvent dans ce milieu les composants indispensables pour leur multiplication en grand nombre, rapidement, mais aussi parfois des éléments qui permettront de privilégier un genre bactérien ou une famille. Ainsi, selon le but de la culture, il est possible de placer les micro-organismes dans des conditions optimales, ou tout à fait défavorables.



Il se compose d'une base (agar-agar, eau, minéraux...) ainsi que d'un indicateur coloré de pH ou de réaction d'oxydo-réduction pour permettre de formuler des hypothèses sur le genre. Il existe aussi des bouillons de culture qui possèdent la même fonction, mais ces milieux ne contiennent pas d'agar-agar, ils sont donc totalement liquides (5).

☒ Milieux de cultures standards

+ Gélose CLED:

Le milieu **CLED** (Cystine Lactose Electrolyte Déficient) est un **milieu non sélectif**, très utilisé dans l'étude des bactéries contenues dans l'urine. Etant un milieu non sélectif de nombreuses bactéries, tant Gram + que Gram -, pourront se développer.

L'absence d'électrolytes (pas de NaCl) limite le phénomène d'envahissement par *les Proteus*.

Caractères recherchés : Lactose.

Résultats : P lactose + apparaissent **jaunes**.

P lactose – apparaissent **bleues vertes** (17).

+ Gélose BCP:

Le milieu **BCP** (Pourpre de Bromocrésol) est un **milieu non sélectif** qui est utilisé pour l'isolement de nombreuses espèces n'appartenant pas aux entérobactéries. C'est un milieu contenant une base nutritive ordinaire permettant la pousse des bactéries non exigeantes.

Caractères recherchés : - Espèces n'appartenant pas aux entérobactéries
- Fermentation du lactose

Résultats : P lactose + Colonies **jaunes**.

P lactose - Colonies **bleues** (17).

Mode d'ensemencement: La séparation des bactéries se fait par **épuisement**.

C'est le type de base des ensemencements. En effet, il permet s'il est bien réalisé, d'obtenir des colonies isolées, donc d'obtenir des cultures pures d'une espèce bactérienne.

Le principe de ce type d'ensemencement est d'épuiser un dépôt initial en faisant des étalements successifs dans différentes directions (d'où le nom de la technique : épuisement par la méthode des quadrants).

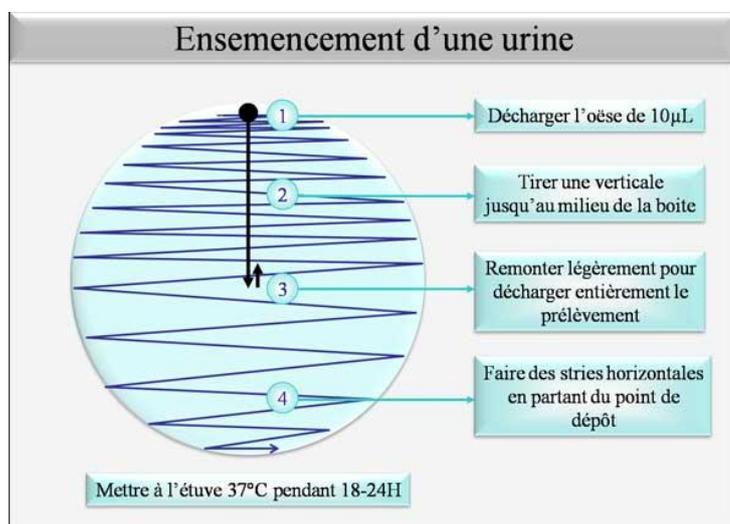
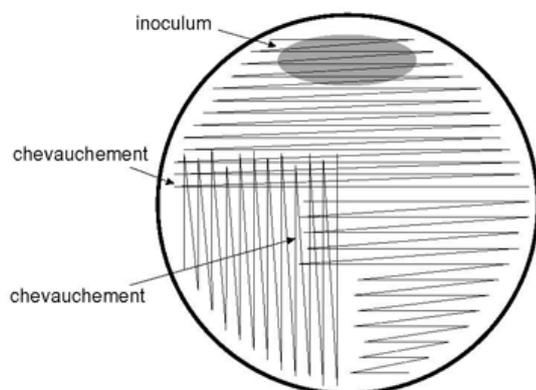


Figure 3: Schémas des techniques d'ensemencement

Protocole de la culture sur boîte de Pétri:

- noter la référence du flacon à analyser sur la boîte de Pétri.
- flamber l'anse puis la refroidir, éventuellement dans le couvercle de la boîte de pétri.
- déboucher le flacon du produit à analyser dans la zone stérile du bec bunsen et garder le capuchon dans la main droite.
- prélever l'inoculum à l'aide de l'anse.
- refermer le flacon du prélèvement.
- ouvrir la boîte de Pétri du côté de la flamme, en le tenant par la main gauche et ensemercer selon les schémas des figures ci-dessus.
- incuber la boîte couvercle en bas pendant 18 à 24 heures à 37°C.

☒ **Procédé de la lame immergée**

Cette technique est facile mais coûteuse, utilisée quand les circonstances imposent un délai prolongé entre le recueil des urines et le transport au laboratoire.



Elle consiste à ensemencer par trempage dans les urines pendant quelques secondes, d'une lame avec deux milieux gélosés, coulés sur un même support (2 faces), l'une avec gélose non sélective et l'autre sélective pour les bacilles gram (-) (18).

A - 2 - LECTURE

a - Identification morphologique

Les colonies de germe formées lors de l'incubation se caractérisent par leur aspect, leur couleur, leur odeur (Voir tableau 1).

Tableau 2: Identification morphologique sur quelques milieux de culture.

Milieu	Morphologie des colonies	Couleur	Aspect	Bactérie suspectée
CLED	Grandes colonies de 2mm de diamètre.	Jaunes	Mâtes	<i>E. coli</i>
	Grandes colonies de 2 mm de diamètre.	Jaunes	Muqueuses	<i>Klebsiella pneumonia</i>
	Grandes colonies de 1 à 2mm de diamètre en œil de poisson.	Brunâtres à halo bleu		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Petites colonies de 1mm de diamètre.	Jaunes pâles	Mâtes	<i>Entérocooccus</i>
	Très petites colonies de Diamètre < 0.5mm.	Jaunes pâles	Mâtes	<i>Staphylococcus</i>
		Colonies roses à rouge brique		<i>Entérobactéries Lactose +</i>
EMB	Colonies de grandes tailles surélevées.	Noires	Lisses Visqueuses	<i>Klebsiella</i>
	Colonies de petite taille	Eclat métallique verdâtre	Mâtes	<i>E. coli</i>
	Colonies de petite taille	Centre gris marron par transparence	Mâtes	<i>Entérobacter</i>
Chapman	Colonies très petites	Jaunes	Mâtes	<i>Streptococcus</i>
	Colonies de taille moyenne	Jaunes	Muqueuses	<i>Staphylococcus</i>

b - Dénombrement des germes urinaires

C'est la numération bactérienne sur les milieux gélosés après 18 à 24 h d'incubation à 37°C.

- Bactériurie < 10³ CFU / ml : absence d'infection

- Bactériurie > 10^5 CFU / ml : infection probable
- Entre 10^3 et 10^4 CFU / ml : zone d'incertitude

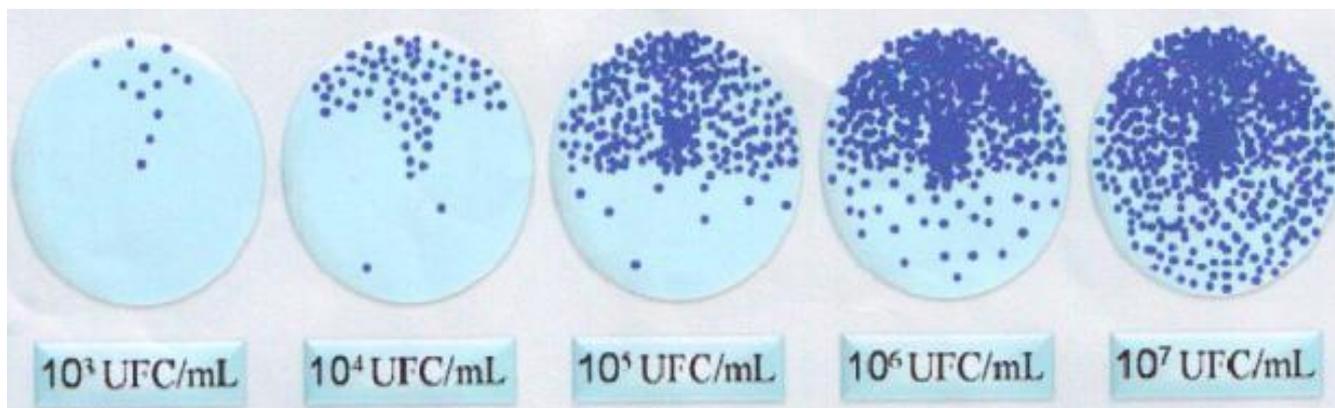


Figure 4: dénombrement des germes urinaires

***Interprétation de l'ECBU**

Tableau 3: interprétation de l'ECBU (2)

Bactéries/ml	Leucocyturie	
	< 10 000/ml	> 10 000/ml
Absence de bactérie	Pas d'infection urinaire	Traitement antibiotique en cours Infection génitale Tuberculose urinaire Prélèvement défectueux
$10^2 < \text{bact} < 10^4$ Monomicrobien	Contamination ou infection débutante À contrôler	Infection traitée par antibiotiques ou par diurèse abondante Infection urinaire débutante Prostatite, urétrite Infection sur sonde
$> 10^5$ Monomicrobien	Prélèvement défectueux Infection urinaire débutante Infection sur terrain particulier : - femme enceinte - sujet âgé - sonde - immunodépression À contrôler	Infection urinaire
$10^2 < \text{bact} < 10^4$ Polymicrobien	Souillure probable	Souillure ou infection sur sonde À contrôler
$< 10^5$ Polymicrobien	Souillure ou infection urinaire À contrôler	Infection urinaire probable si anomalies urologiques Contamination possible À contrôler



c - Coloration du GRAM

La coloration de Gram permet de classer les germes isolés soit en Gram + ou en Gram - (selon la composition de la paroi) de plus une observation au microscope à grossissement x1000 permet d'identifier la forme du germe et distinguer entre un bacille ou une *cocci*.

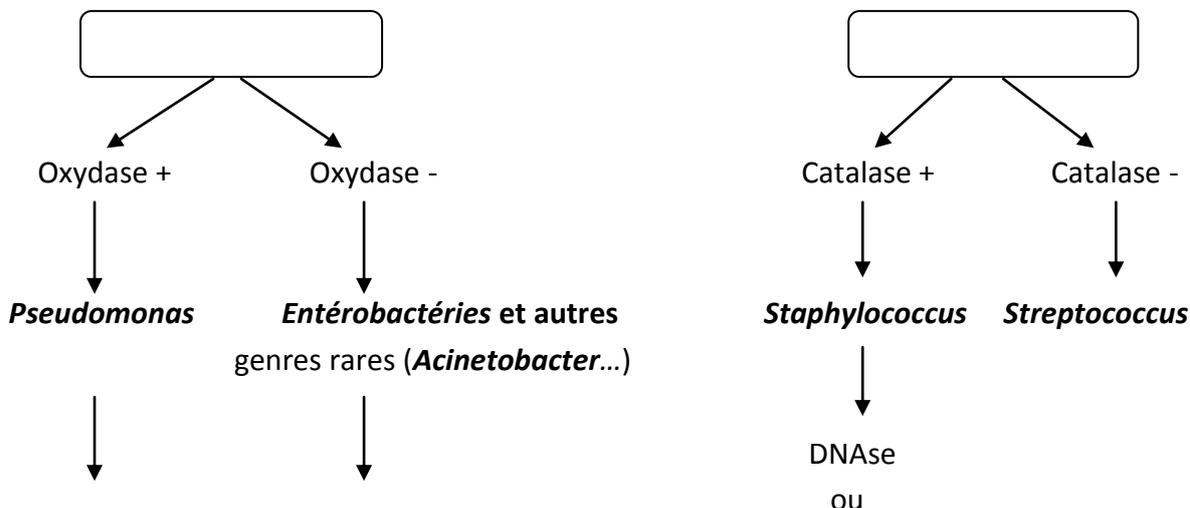
Mode opératoire:

- Réaliser un frottis ou un étalement
- Fixer la préparation à la flamme, sécher soigneusement puis laisser refroidir la lame.
- Immerger les lames dans la solution de Cristal Violet pendant 1min.
- Lavage à l'eau en transvasant les lames.
- Immerger les lames dans du Lugol en les agitant.
- Laver à nouveau à l'eau.
- Décolorer jusqu'à disparition de la couleur violette dans l'alcool en faisant couler goutte à goutte sur la lame inclinée ou en immergeant les lames pendant une dizaine de secondes dans le décolorant.
- Laver à l'eau.
- Contre colorer avec la solution de safranine diluée pendant 20 à 30 secondes.
- Laver à l'eau et sécher à l'air.
- Observer à l'objectif X100, en immersion avec de l'huile.

Résultat: Les bactéries gram + sont colorées en **violet**, les bactéries gram - sont colorées en **rose**, ceci est dû à une différence de composition de la paroi.

B - IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE

La coloration de Gram oriente l'identification, voici la démarche à suivre selon l'examen direct des frottis colorés au Gram:





Galerie D'identification Galerie d'identification

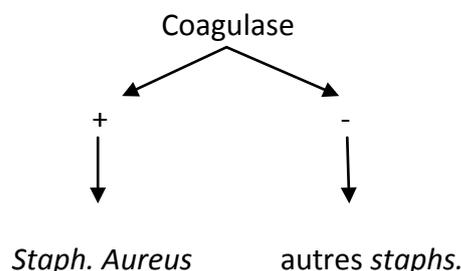


Figure 5: schéma du déroulement d'une identification biochimique

Test catalase:

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

- Sur une lame propre et sèche déposer une goutte eau oxygénée.
- Ajouter l'inoculum bactérien à l'aide d'un enseigneur.
- Observer immédiatement.

En présence d'un dégagement gazeux, cela veut dire qu'il s'agit du genre *Staphylococcus*, car cette effervescence est causée par le dégagement du dioxygène généré par la lyse de l' H_2O_2 par la catalase sécrétée par les staphylocoques comme autodéfense (4).

Test oxydase:

Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram -. Ce test 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 diméthyl paraphénylène diamine.

Le réactif peut se trouver sous deux formes :

- soit en solution : sur une lame de verre, déposer un carré de papier filtre et l'imbiber d'une solution fraîchement préparée de réactif,
- soit sous la forme d'un disque pré-imprégné par le réactif.

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

Le test est positif lorsqu'une tâche violette apparaît sur le disque (4).

Test DNase:

Rôle : Identification de *Staphylococcus aureus*

Technique:

Test réalisé en boîte de Pétri contenant un milieu avec ADN et bleu de toluidine.



- Chauffer 15 min à 100°C une culture de 24h en bouillon cœur-cervele du staphylocoque étudié.
- Laisser refroidir.
- Remplir de bouillon un puits de 4 mm de diamètre environ, préalablement creusé dans la gélose.
- Incuber 4 h minimum à 37°C.
- Réaliser en parallèle un puits témoin négatif rempli de bouillon stérile et un puits rempli de bouillon non chauffé (4).

Test coagulase:

Consiste à rechercher la coagulase produite en 24 h chez les *staphylocoques*. Cet enzyme est capable *in vitro* de coaguler le plasma de lapin la présence de la coagulase permet d'identifier les staphylocoques pathogènes (*S. aureus*).

Dans un tube à hémolyse stérile, introduire 0,5 mL de plasma oxalaté + 0,5 mL d'une culture de 18 h en bouillon cœur cervelle de la souche à étudier.

Placer le mélange à 37°C.

Des lectures doivent être effectuées toutes les heures au moins pendant les cinq premières heures.

- Coagulation du plasma => Coagulase + => *Staphylococcus aureus*.
- Pas de coagulation du plasma => Coagulase - => ininterprétable => faire d'autres tests (DNase thermostable, recherche protéine A, recherche récepteur au fibrinogène) (4).

*GALERIE D'IDENTIFICATION CLASSIQUE

Cette galerie est utilisée spécialement pour la famille des *enterobacteriaceas*.

Les entérobactéries comptent plusieurs genres, ce sont des coccobacilles droits à Gram négatif souvent mobiles, aérobie-anaérobie facultatives, fermentant le glucose, elles possèdent la catalase et la nitrate réductase mais elles n'ont pas d'oxydase.

Les entérobactéries sont ubiquitaires, commensaux de l'intestin des mammifères, celles qui sont pathogènes à l'homme appartiennent à deux groupes:

*pathogènes strictes: *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*.

*pathogènes opportunistes: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Morganella*, *Providentia*.

La galerie est composée des différents milieux suivants:

➤ **Milieu Hajna-Kligler**



Le milieu de **Hajna-Kligler** est un milieu de culture permettant la recherche simultanée de :

- l'utilisation du lactose ;
- a fermentation du glucose ;
- a production d' H_2S ;
- la production de gaz ;
- la lysine décarboxylase.
- la β -galactosidase pour les bactéries lactose - (test ONPG).

Technique:

- la pente doit être abondammentensemencée (stries serrées).
- le culot estensemencé simple piqûre.

Incubation : 37 °C pendant 18 à 24 h (ne pas dépasser ce délai) après avoir dévisser le bouchon partiellement ce qui permet les échanges gazeux.

Lecture:

- bactérie glucose + et lactose + : **culot jaune** et **pente jaune**.
- bactérie glucose + et lactose - : **culot jaune** et **pente rouge**.
- bactérie glucose - et lactose - : **culot rouge** et **pente rouge**.
- bactérie glucose - et lactose + : **culot rouge** et **pente jaune**. Ces bactéries sont aérobies strictes : le culot ne doit pas présenter de culture et sera donc rouge. La pente peut présenter une culture et sera jaune si l'acidification est suffisante et rouge dans le cas contraire. Le milieu de Kligler n'est généralement pas utilisé pour de telles bactéries, qui sont souvent lactose -, et des expériences complémentaires sont faites pour préciser le résultat.
- **H₂S**: résultat positif s'il y a présence de précipité **noir** de sulfate de fer.
- **Gaz**: La production de gaz (hydrogène, dioxyde de carbone) se manifeste - si positive - par le décollement de la gélose, ce gaz provient d'abord du métabolisme de glucose (17).

➤ **Milieu citrate de Simmons**

Ce milieu est un exemple de **milieu synthétique**, c'est à dire un milieu dont la composition, qui est complexe, est connue exactement tant qualitativement que quantitativement.

L'unique source de carbone dans ce milieu est le citrate ($C_6H_5O_7^{3-}$). L'utilisation de ce substrat pour la plupart des bactéries pouvant le cataboliser est aérobie, et se traduira par une alcalinisation du milieu.



Technique:

La pente est ensemencée par une strie longitudinale, réalisée à l'anse, à partir d'une suspension de la culture solide en eau distillée stérile.

Ne pas visser le bouchon à fond, afin de permettre les échanges gazeux (en particulier élimination du dioxyde de carbone).

Mettre à l'étuve 24 heures à 37°C.

Lecture:

***Virage de l'indicateur de pH au bleu** : il y a eu alcalinisation du milieu et la souche est citrate de Simmons +.

***Pas de virage de l'indicateur de pH** : il n'y a pas eu alcalinisation et le milieu ne présente pas de culture. La souche est citrate de Simmons - (17).

➤ **Mannitol-mobilité**

Ce milieu permet l'étude de la dégradation du mannitol qui est un produit de dégradation du mannose.

Technique:

Ensemencer par piqûre centrale à l'aide d'un fil droit. Incuber 24 h à T° optimale.

Lecture:

*Caractère mannitol

- milieu **jaune** : Mannitol +

- milieu **rouge** : Mannitol –

*La mobilité : Les bactéries très mobiles peuvent se déplacer dans la gélose molle en créant des troubles dans le milieu (17).

➤ **Milieu urée indole**

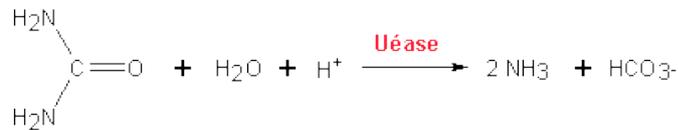
Appelé improprement milieu Urée Indole le milieu Urée Tryptophane est un milieu synthétique.

▪ Principe:

Ce milieu ne contient pas de source de carbone utilisable, les bactéries ne pourront pas se multiplier.

Trois activités enzymatiques peuvent être recherchées à partir de ce milieu :

***l'uréase**, enzyme hydrolysant l'urée, activité directement détectable par le suivi de l'alcalinisation



* **la tryptophane désaminase (TDA)**, après addition de chlorure de Fer III. Le Fer III forme un complexe avec le produit de l'activité de la TDA, l'acide indole-pyruvique, complexe décelable par la formation d'un précipité marron



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



▪ Technique:

*Faire une suspension en milieu Urée-tryptophane.

*Etuver.

*Lire.

▪ Lecture:

*Uréase

- La **coloration rouge** traduit une alcalinisation du milieu, suite à l'hydrolyse de l'urée : **uréase+**.

- La **coloration orange** ou **jaune** montre l'absence d'hydrolyse de l'urée : **uréase -**.

*Tryptophane désaminase (TDA)

Ajouter le réactif chlorure de Fer III dans un aliquote du milieu Urée Tryptophane ensemencé et incubé. En présence d'acide indole-pyruvique il y a formation d'un complexe acide indole-pyruvique/Fe III qui précipite. La lecture est immédiate.

- Obtention d'un **précipité brun foncé** : **TDA +**.

- Absence de précipité : **TDA -**.

*Tryptophanase

Le réactif utilisé pour détecter l'activité de la tryptophanase est le réactif de Kovacs. **Ce réactif est toxique. Manipuler avec précaution.**

Le noyau indole, produit par l'activité de la tryptophanase, réagit avec la fonction aldéhyde du diméthyl-amino-4-benzaldéhyde pour donner un composé quinoïdal coloré en rouge. Ce complexe est extrait et concentré dans la phase alcoolique du réactif.

Ajouter le réactif de Kovacs dans un aliquote du milieu Urée Tryptophane ensemencé et incubé.



- Absence de coloration rouge : **indole -**.
- Formation d'un **anneau rouge** : **indole + (4)**.

➤ **La galerie Api 20E**

Galerie de 20 microtubes prêts à l'emploi permettant de réaliser 23 tests biochimiques afin d'identifier des bacilles Gram – appartenant à la famille des *enterobacteriaceae* (Voir annexes).

Il existe aussi la galerie Api20NE pour Pseudomonas et Acinetobacter, Api Staphylocoques et Api Streptocoques.

Technique:

*Préparation de l'inoculum:

Prélever une seule colonie et la mettre en suspension dans 5 mL d'eau distillée stérile.

*ensemencement de la galerie Api 20E:

Introduire la suspension bactérienne 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

Pour certains caractères:

Remplir le tube de suspension puis Recouvrir d'huile de paraffine.

*Refermer la plaque, incuber à 37°C de 18 à 24 h.

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, on détermine le nom de l'espèce bactérienne.

Les tests sont séparés par groupe de trois, et une valeur de 1,2 ou 4 est indiqué pour chacun. La galerie Api 20E comporte 20 tests, en additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondants à des réactions positives, on obtient 7 chiffres; la réaction d'oxydase qui consiste le 21^{ème} test est affecté de la valeur 4 quand elle est positive (13).

C - ANTIBIOGRAMME



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
Faculté des Sciences et Techniques
- Département des sciences de la vie -



L'antibiogramme est l'étape finale de l'ECBU, il permet de tester sur les germes isolés et responsables de l'infection leurs sensibilités aux antibiotiques qui seront prescrit pour le traitement.

Technique:

- préparation d'une suspension bactérienne (inoculum).
(La même technique que celle de la galerie Api)
- Dépôt de l'inoculum à la surface de la gélose (MH) par écouvillonnage ou par inondation.
- Dépôt des disques de papier filtre imprégnés des antibiotiques à tester.
- Incubation pendant 18 à 24 heures à 37°C.

+ **Gélose Mueller-Hinton:** le milieu Mueller-Hinton est une gélose riche pour la réalisation de l'antibiogramme (17).

Lecture:

Après la durée de l'incubation, on mesure le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'une règle destinée à cet usage. La zone d'inhibition correspond à une zone complètement dépourvue de croissance bactérienne et exclut la zone intermédiaire de petites colonies qui entourent la zone d'inhibition, ces colonies peuvent être soit des mutants résistants, soit des contaminants.

Elles existent trois catégories cliniques qui ont été retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité *in vitro* : Sensible(S), Résistant(R) et Intermédiaire (I) :

- Les souches catégorisées **S** : sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte.
- Les souches catégorisées **R** : sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quels que soient le type de traitement et la dose d'antibiotique utilisée.
- Les souches catégorisées **I** : sont celles pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible. Ces forment un ensemble hétérogène pour lequel les résultats obtenus *in vitro* ne sont pas prédictifs d'un succès thérapeutique.



Figure 6: Antibiogramme sur gélose MH

*** L'identification et l'antibiogramme sont maintenant automatisés**

Le "*Phoenix™ Automated Microbiology System*" (voir annexes) est conçu pour une identification rapide (ID) et d'un antibiogramme cliniquement significatif des bactéries pathogènes de l'homme. Le système comprend un instrument, des logiciels, des panneaux jetables, bouillons pour ID et antibiogramme, et un indicateur d'antibiogramme. L'instrument a la capacité de contenir 100 panneaux de tests. Les panneaux jetables de tests contiennent 136 puits de microdilutions. Les panneaux sont en lecture en intervalle de 20 minutes. Les concentrations minimales inhibitrices, et les interprétations des catégories sont générées. Les résultats définitifs sont disponibles en 2 à 12 heures pour l'ID et 4 à 16 heures pour l'antibiogramme (12).

RESULTATS & DISCUSSION

Les résultats de cette étude portent sur les urines reçues au laboratoire central du CHU Hassan II de Fès, dans une période de 5 mois, allant du 01/01/2010 au 31/05/2010.



Cette étude à été réalisé à partir des registres de l'ECBU, dans le but de mesurer la fréquence de l'infection urinaire chez les patients externes et hospitalisés, la fréquence selon les sexes, la répartition des germes en cause, et leur niveau de sensibilité et de résistance vis-à-vis les antibiotiques testés.

La taille de l'échantillon sur lequel cette étude à été réalisé est de 4432 ECBU,

I - FREQUENCE DES INFECTIONS URINAIRES

Sur les 4432 ECBU; 799 se sont révélés positifs, soit 18%; et 3633 se sont révélés négatifs, soit 82% (figure 7).

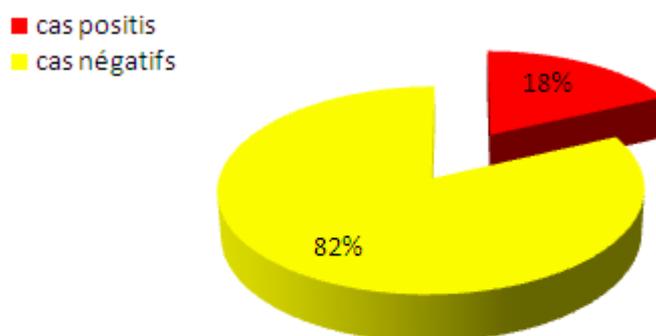


Figure 7: Fréquence de l'infection urinaire

II - REPARTITION DE L'INFECTION URINAIRE

II - 1 - REPARTITION SELON LE SEXE

Sur 799 ECBU positifs, on a trouvé que 479 sujets, soit 60% sont de sexe féminin, alors que 320 sujet, soit 40% sont de sexe masculin (Figure 8).

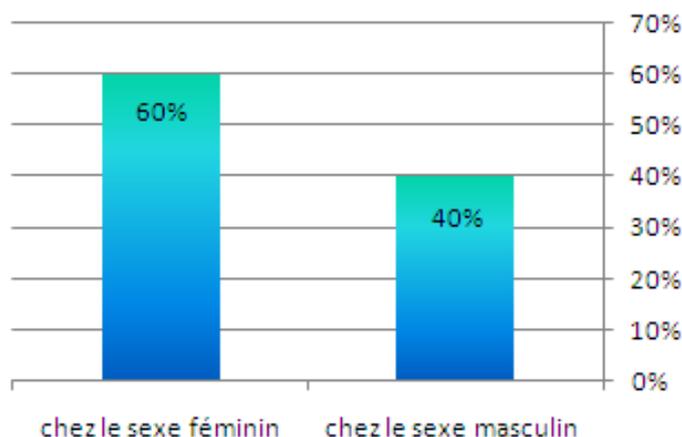




Figure 8: Répartition de l'infection urinaire selon le sexe

On remarque que les sujets de sexe féminins plus touchée par l'infection urinaire par rapport aux sujets de sexe masculins; ce résultat confirme les données de la littérature et s'explique aussi vu la prédisponibilité anatomique et physiologique de la femme, la rendant sujet à risque aux infections urinaires plus que les hommes (21).

Cette différence peut être due à:

- la courte taille de l'urètre chez la femme.
- La modification de l'acidité vaginale après la diminution normale des hormones (œstrogène) et des sécrétions vaginales après la ménopause.
- Les rapports sexuels; car le frottement au niveau du méat urinaire lors des rapports favorisant l'entrée dans l'urètre et dans la vessie des germes normalement présents au niveau du vagin.
- La grossesse qui peut favoriser l'infection urinaire car la compression par l'utérus entraîne une dilatation voire une certaine obstruction des urètres.
- L'orifice vaginal chez la femme est proche de l'orifice urétral.
- Certaines habitudes d'hygiène (douche vaginale) qui permettent de déséquilibrer la flore bactérienne habituelle du vagin (20).

II - 2 - REPARTITION SELON LA PROVENANCE

Sur les 799 ECBU positifs, 609 patients, soit 75,94% étaient hospitalisés, alors que 192 patients, soit 24,06% étaient adressés à titre externe (figure 9).

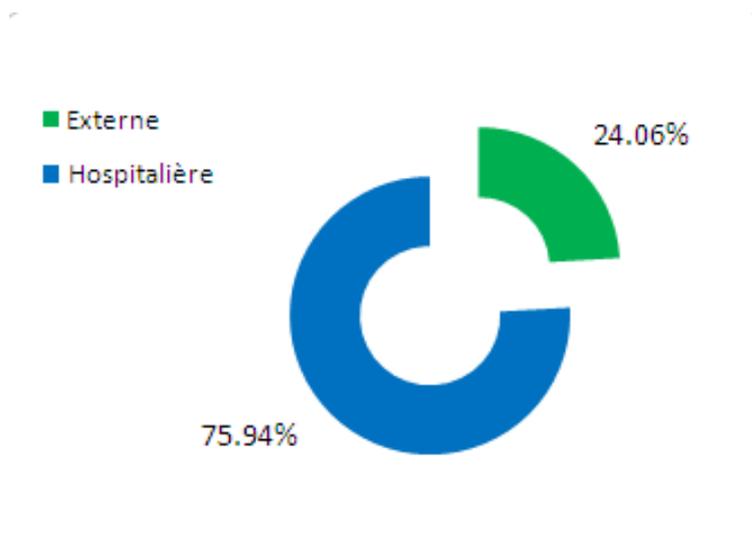


Figure 9: Répartition de l'infection urinaire selon la provenance



II - 3 - REPARTITION DE L'INFECTION SELON LES SERVICES

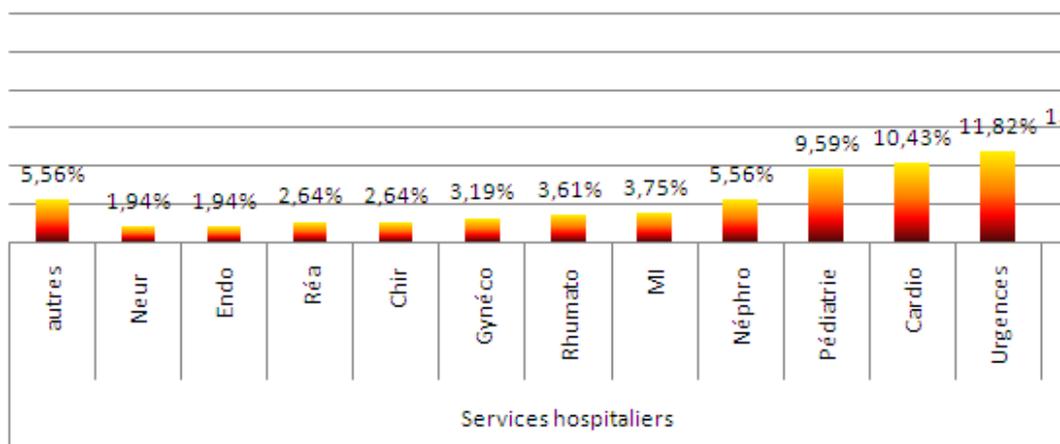


Figure 10: Distribution des ECU positifs selon les différents services

75.94% ECU positifs proviennent des différents services hospitaliers.

Les services les plus touchés sont: l'urologie avec un taux de 13,21%, les urgences avec 11,82%, la cardiologie avec 10,43%, la pédiatrie avec 9,59%, la néphrologie avec 6,56%, les services restants ont un taux inférieur à 4% chacun.

24.06% ECU positifs proviennent des patients externes.

II - 4 - COMPARAISONS A DES ETUDES SIMILAIRES

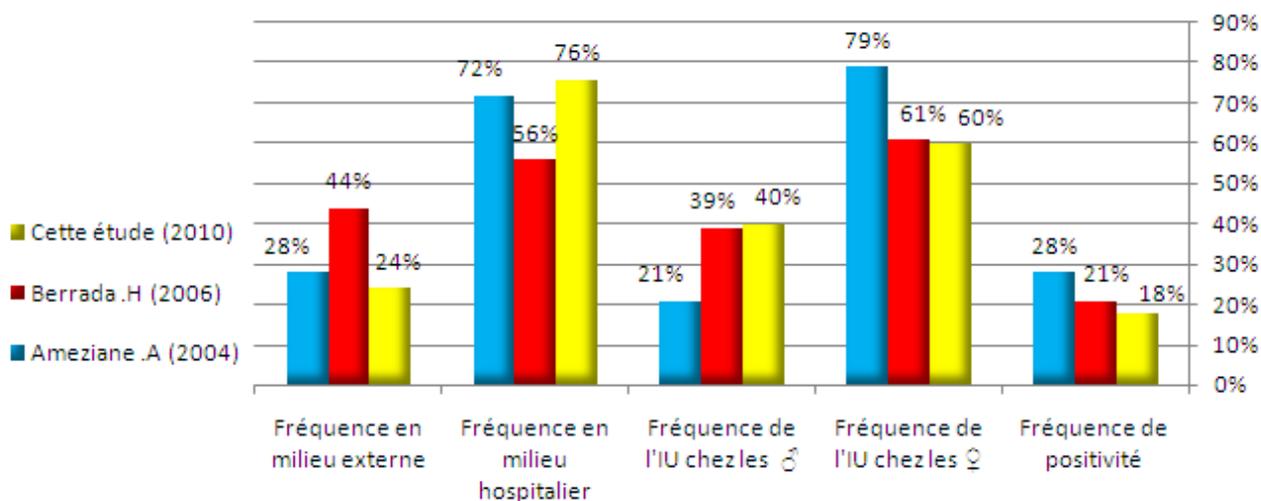




Figure 11: Comparaisons aux résultats de Berrada (2006) et Ameziane (2004)

D'après cette comparaison signalée sur la figure 11 on note en générale qu'en six ans :

- la fréquence de positivité des infections urinaires ne dépasse pas les 28% des ECBU prescrits.
- que c'est toujours le milieu hospitalier qui prescrit le plus d'ECBU.
- que les infections urinaires sont toujours plus fréquentes chez les femmes par rapport aux hommes.

Au sein de cette comparaison globale des petites différences de pourcentage existent, en effet, la fréquence de positivité de l'infection urinaire a diminué de 10% par rapport à 2004 la fréquence des sujets de sexe féminin a baissé de 19%, alors que celle des sujets de sexe masculin a augmenté de 19%, il se peut que cette différence soit due à l'âge des hommes hospitalier surtout que c'est dans le service d'urologie qui reçoit les cas de prostatite que les ECBU positifs sont les plus fréquentes (figure 10).

III - LA REPARTITION DES GERMES RESPONSABLES DES INFECTIONS URINAIRES

Les résultats montrent que (figure 12):

Sur 799 ECBU positifs, *Escherichia coli* est le germe le plus isolé par un nombre de 462 soit 57,8%, suivie par *Klebsiella* avec 133 soit 16,6%, 40 staphylocoques et 40 entérobactères soit 5% chacun, 20 *Proteus* soit 2,5%, *Enterococcus* avec 18 soit 2,2%.

D'autres germes sont moins fréquents, *Pseudomonas* avec 1,8%, *Enterobacter* et *Citrobacter* avec 1.5% chacun.

La levure *Candida albicans* représente 3,5%.

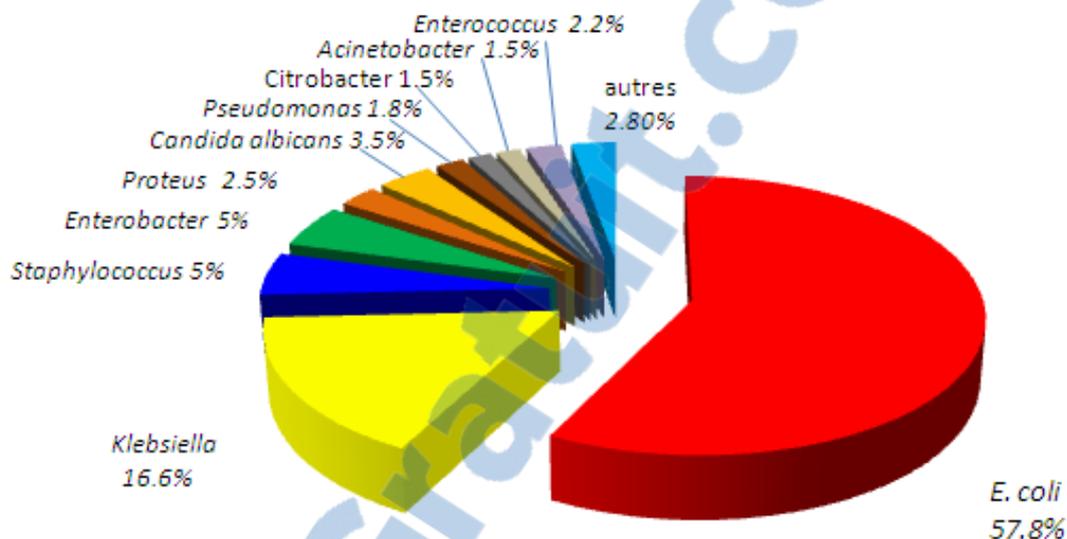


Figure 12: Répartition des germes urinaires

D'après notre étude statistique, on note que les infections urinaires sont dues essentiellement aux bacilles gram négatif, surtout les *Enterobacteriaceae* qui sont des commensaux du tube digestif des mammifères, leur passage du tube digestif au tube urinaire est très probable.

L'infection peut être causée aussi par des cocci gram positif genre *Staphylococcus*.

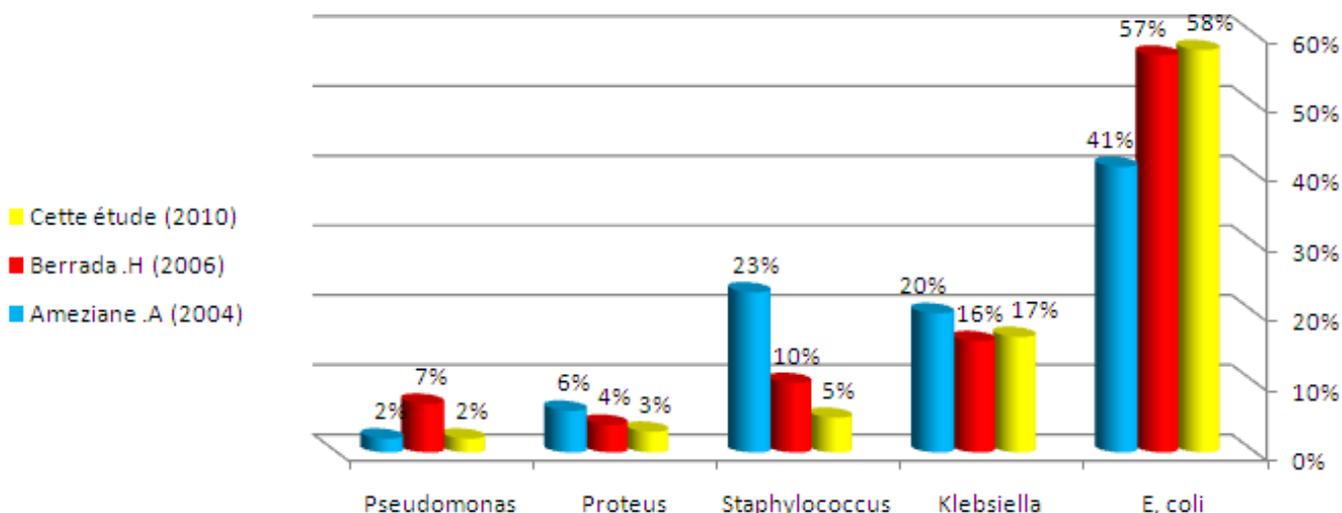


Figure 13: Comparaisons aux résultats de Berrada (2006) et Ameziane (2004)

Nos résultats ont été comparés à d'autres études faites par des étudiants de licence (Berrada 2006; Ameziane 2004) au sein du même service et on a remarqué d'après le graphique de la figure n°13 que la répartition des germes reste la même ; même s'il y a des petites différences dans le pourcentage de chaque genre bactérien avec la dominance du germe *E. coli* en premier lieu suivie de *Klebsiella*.

Dans notre étude le pourcentage des infections urinaires à Staphylocoque qui viennent en troisième lieu ne représente que 5% alors que dans les études de 2004 et 2006 ce pourcentage est presque respectivement 5 fois et 2 fois plus élevé.

On sait que *Staphylococcus* à un portage cutané il se peut que les conditions de travail et d'hygiène sont efficaces dans les nouveaux locaux du CHU Hassan II.

IV - PROFILS DE RESISTANCE ET DE SENSIBILITE DES PRINCIPAUX GERMES ISOLES AUX ANTIBIOTIQUES TESTES

IV - 1 - Escherichia coli

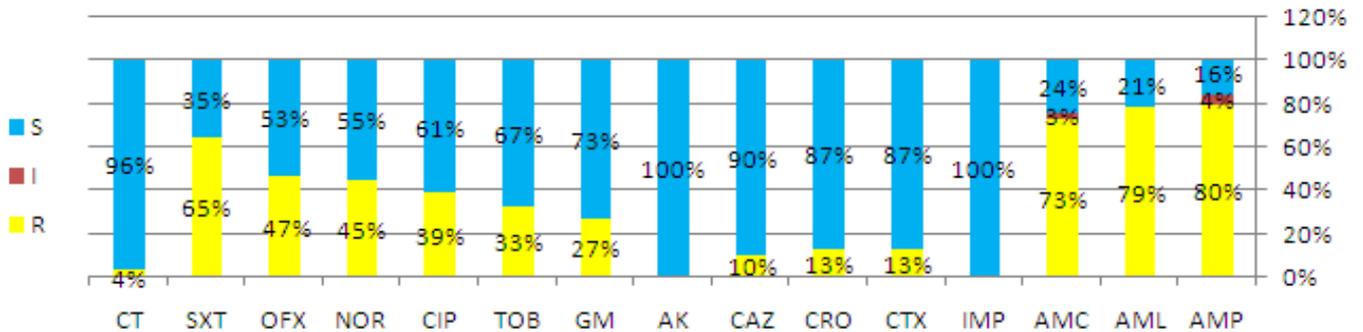


Figure 14: Profil de résistance et de sensibilité d'*Escherichia coli* aux antibiotiques testés

Escherichia coli est le germe le plus isolé dans les urines, il a montré une sensibilité très importante aux Carbapénèmes (Imipénème 100%), aux céphalosporines (Céfotaxime 87%, Céftriaxone 87%, Céfotazidimes 90%), à la Colistine 96%, aux Aminosides (Amikacine 100%, Gentamicine 73%, Tobramycine 67%), ces antibiotiques peuvent être prescrits en première intention pour traiter l'infection.

Cependant, il y a une résistance légère aux Quinolones (Ciprofloxacine 39%, Norfloxacine 45%, Ofloxacine 47%), plus forte au Bactrim (SXT) 65%, et très importante aux Pénicillines (Ampicilline 80%, Amoxicilline 79%, Augmentin 73%).

IV - 2 - *Klebsiella pneumoniae*

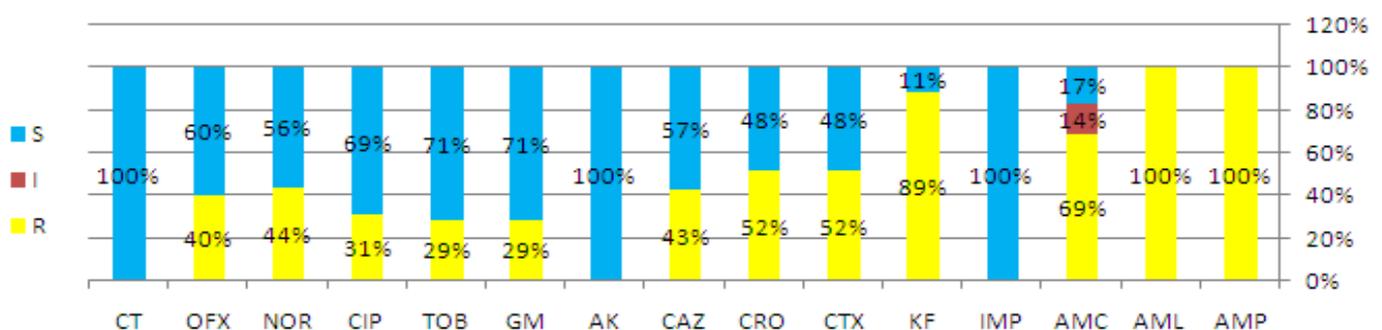


Figure 15: Profil de résistance et de sensibilité de *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques testés

Les Klebsielles dont *K. pneumoniae* occupent le 2^{ème} rang parmi les germes urinaires.





Ce germe est très sensible aux Carbapénèmes (Imipénème 100%), aux Aminosides (Amikacine 100%, Gentamicine 71%, Tobramycine 71%), et à la Colistine (100%); il est moins sensible aux Quinolones (Ciprofloxacine 69%, Norfloxacine 56%, Ofloxacine 60%).

On remarque une légère résistance aux Céphalosporines (Céfotaxime 52%, Céftriaxone 52%, Céftrizidime 43%), et une très forte résistance aux Pénicillines (Ampicilline 100%, Amoxicilline 100%, Augmentin 69%).

IV - 3 - Enterobacter cloacae

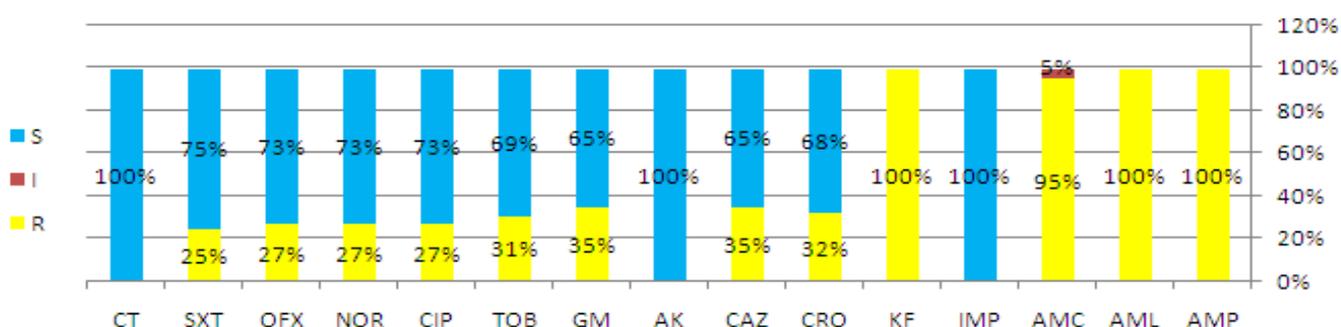


Figure 16: Profil de résistance et de sensibilité d'*Enterobacter cloacae* aux antibiotiques testés.

Les entérobactères dont *E. cloacae* représentent 5 % des germes isolés dans l'urine. Ce germe est sensible aux Carbapénèmes (Imipénème 100%), aux Aminosides (Amikacine 100%, Gentamicine 65%, Tobramycine 69%), aux Quinolones (Ciprofloxacine 69%, Norfloxacine 56%, Ofloxacine 60%), au Bactrim (75%), et à la Colistine (100%); et il est résistant aux pénicillines (Ampicilline 100%, Amoxicilline 100%, Augmentin 95%).

IV - 4 - Staphylococcus aureus



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
Faculté des Sciences et Techniques
- Département des sciences de la vie -

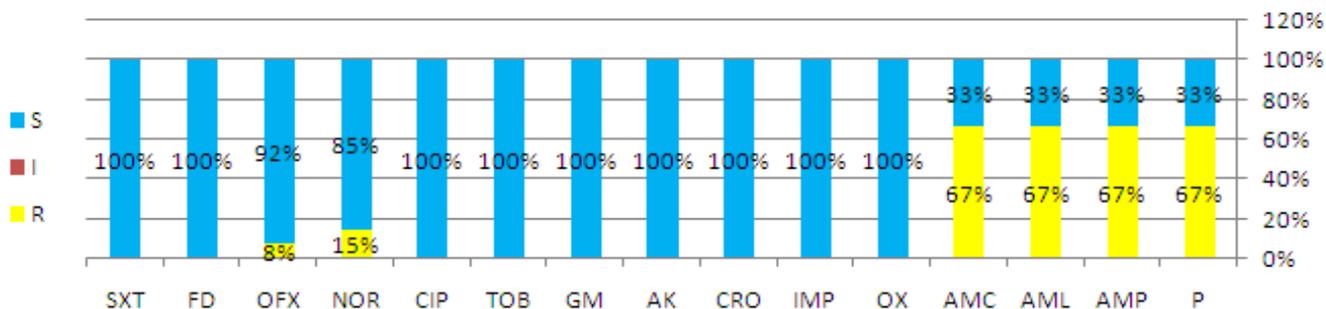


Figure 17: Profil de résistance et de sensibilité de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques testés

Staphylococcus aureus montre une très bonne sensibilité à tous les antibiotiques utilisés sauf les Pénicillines où on observe une résistance importante (Penicilline 67%, Ampicilline 67%, Amoxicilline 67%, Augmentin 67%).

IV - 5 - Proteus mirabilis

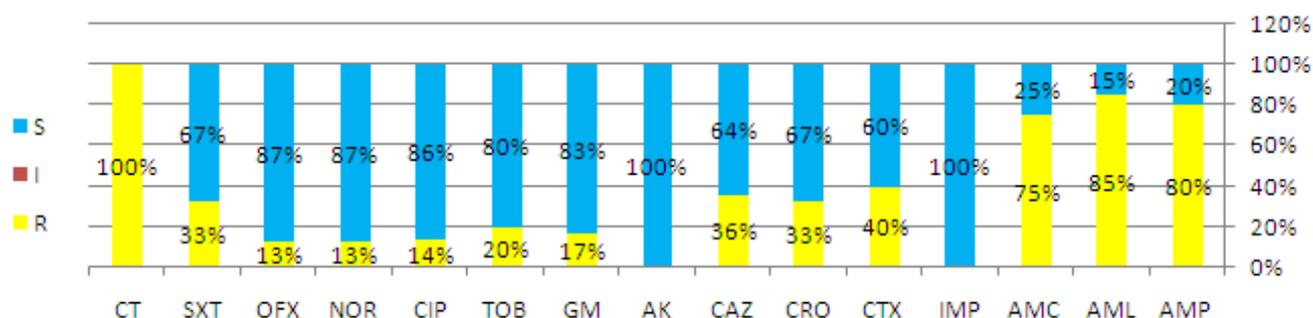


Figure 18: Profil de résistance et de sensibilité de *Proteus mirabilis* aux antibiotiques testés

Proteus mirabilis montre une bonne sensibilité aux Carbapénèmes (Imipénème 100%), aux céphalosporines (Céfotaxime 60%, Céftriaxone 67%, Céfotaxidimes 64%), aux Aminosides (Amikacine 100%, Gentamicine 83%, Tobramycine 80%), aux Quinolones (Ciprofloxacine 86%, Norfloxacine 87%, Ofloxacine 47%), au Bactrim (SXT) 67%,

On observe aussi une résistance très importante à la Colistine (100%), et aux Pénicillines (Ampicilline 80%, Amoxicilline 85%, Augmentin 75%).



IV - 6 - Pseudomonas aeruginosa

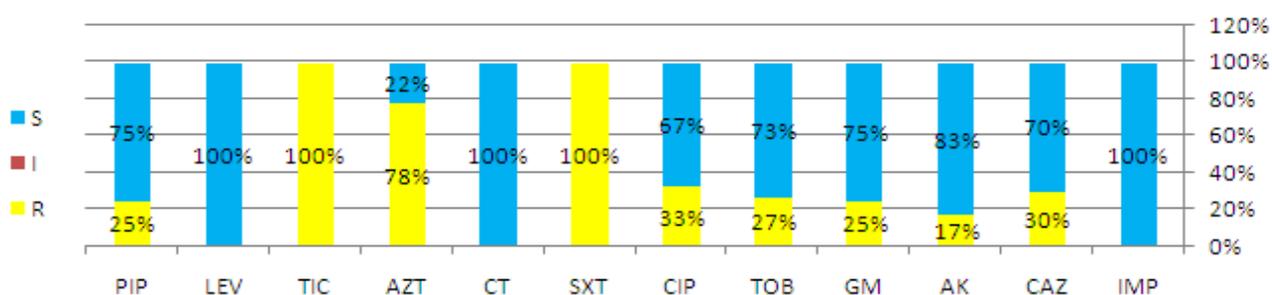


Figure 19: Profil de résistance et de sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques testés

Pseudomonas aeruginosa a une sensibilité élevée aux Carbapénèmes (Imipénème 100%), aux céphalosporines (Céftazidimes 70%), aux Aminosides (Amikacine 83%, Gentamicine 75%, Tobramycine 73%), aux Quinolones (Ciprofloxacine 67%), à la Colistine (100%), à la Lévofloxacine (100%), et à la Pipéracilline (75%),

On remarque une résistance importante à la Ticarcilline (100%), à l'Aztreonam 78% et au Bactrim (100%).

IV - 7 - Discussion

Du fait de l'augmentation croissante des résistances acquises aux antibiotiques, l'antibiogramme doit être réalisé dans tous les cas d'infection urinaire ayant fait l'objet d'une prescription d'ECBU (2).

Les résultats montrent une résistance très élevée aux Pénicillines, relativement élevée aux Céphalosporines, une bonne sensibilité aux Quinolones et aux Aminosides.

L'Imipénème a fait preuve d'une excellente activité.

Ces variations d'activités sont peut être dus aux:

- o différents modes d'action des antibiotiques (les β -lactamines agissent sur la paroi et les quinolones agissent sur la synthèse protéique) (11),



- La prescription excessive.
- la résistance naturelle de certaines espèces bactériennes, elle a pour support génétique le chromosome bactérien et elle permet de définir le spectre d'activité des antibiotiques. Ses mécanismes biochimiques sont nombreux (19).
- la résistance acquise qui résulte d'une modification du capital génétique permettant à une bactérie de tolérer une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce. Ce phénomène a atteint une telle ampleur que la seule identification bactérienne ne permet plus de prédire le comportement d'une souche isolée vis-à-vis des antibiotiques (19).

Les bactéries BLSE (β -lactamase à spectre étendue):

Certains genres bactériens (dont principalement *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*) produisent une enzyme, la pénicillinase (β -lactamase) qui hydrolyse les pénicillines A, ce qui explique la résistance élevée à ces antibiotiques.

Conclusion

L'urine est un liquide jaune clair, transparent sécrété par les reins et éliminé par les voies urinaires. L'urine se compose principalement d'eau et d'un résidu sec entièrement soluble à l'état normal.

Elle est normalement stérile mais elle est souillée physiologiquement lors de son émission par les germes présents dans la flore cutané-muqueuse et génito-urinaire.

Pour traiter ces infections, les médecins s'appuient sur le résultat de l'examen cytot bactériologique des urines (ECBU).

L'ECBU est un examen capital dans le diagnostic et dans la surveillance de l'évolution d'une infection urinaire, il consiste à réaliser un examen microscopique qui permet l'estimation de la réaction leucocytaire, l'isolement, l'identification des bactéries infectantes et l'étude de leur sensibilité vis-à-vis des antibiotiques.

Nos résultats ont montrés que :

- le taux de positivité De ECBU est de l'ordre de 18%.



- 60% de ce taux est représenté par des sujets de sexe féminin,
- le milieu hospitalier est le plus touché (75,94%) et en particulier avec le service d'urologie avec 13,21%.
- les bactéries Gram négatif, dont la famille des entérobactéries, occupent une grande partie des germes en cause avec au 1^{er} rang l'espèce *E. coli* (57,8%), suivie par *Klebsiella* 16,6%.
- La plupart des germes ont montré une résistance élevée aux pénicillines, relativement élevée aux céphalosporines, et une sensibilité très importante à l'imipénème.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Luce Pélissier-Simard, 2006; *Révision médicale*, M.D., M.Sc. épidémiologie, Université de Sherbrooke.
www.passeportsante.net/fr
2. Catherine Dupeyron - *Développement et Santé*, n°141, juin 1999.
www.ledamed.org/IMG/html/doc-10840.html
3. www.chufes.ma
4. www2.ac-lyon.fr
5. Washington JA, *Baron's Medical Microbiology (Baron S et al., eds.)*, Univ of Texas Medical Branch, « Principles of Diagnosis ».
6. Communiqué Spectra n° 160 (Juin/ Juillet 2007) - Fluro-cytomètre en flux pour l'analyse de l'ECBU.
www.sysmex.fr
7. Laboratoire de microbiologie, centre hospitalier de Valenciennes BP 479, 59322 Valenciennes, France.
www.sciencedirect.com

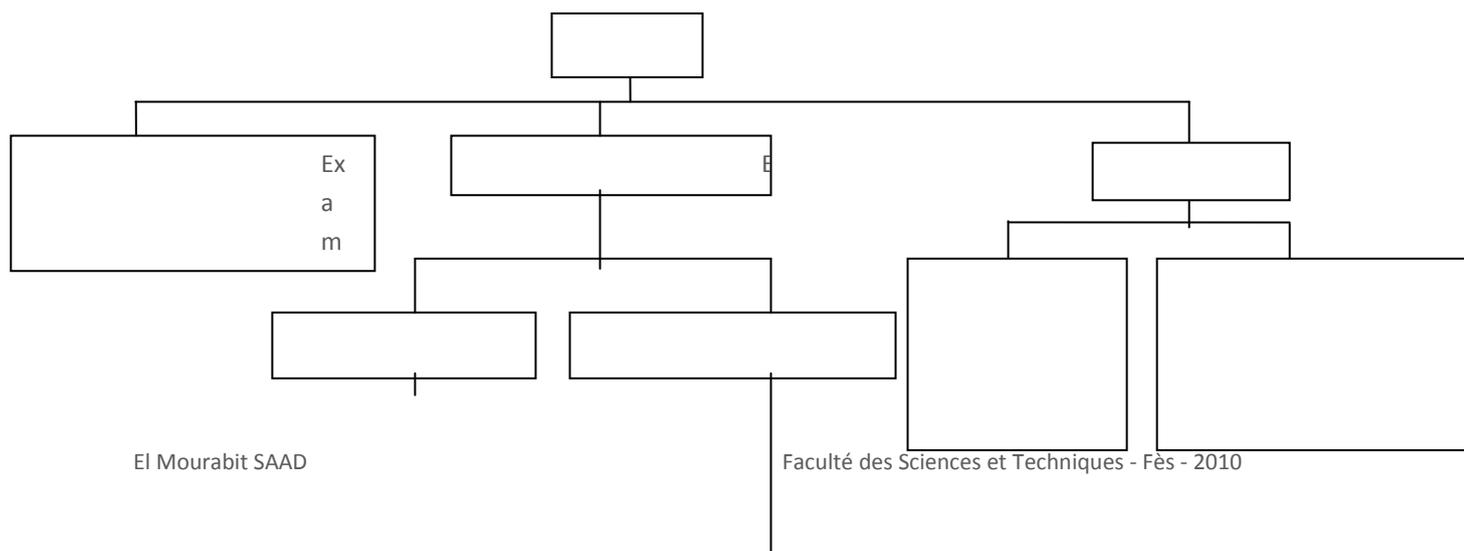


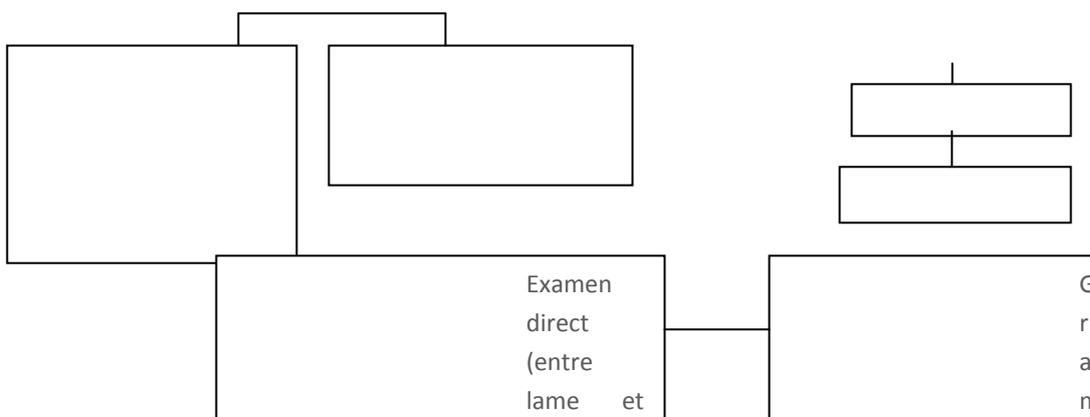
UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
Faculté des Sciences et Techniques
- Département des sciences de la vie -



8. **Hortense GONSU KAMGA** - Médecin biologiste - EXAMEN CYTO-BACTERIOLOGIQUE DES URINES - FMSB / CHUY.
9. **MALAPEDIA** 25/3/2010 : PATHOLOGIES URINAIRES, HÉMATURIE, LEUCOCYTURIE, OLIGURIE....
www.eric-jacob.com/malapedia
10. www.Doctissimo.com
11. www.Wikipédia.com
12. **J. W. Snyder**^{1, 2}, **G. Munier**² and **C. Johnson**² - *University of Louisville School of Medicine*¹ and *University of Louisville Hospital*² • Louisville, KY
www.bd.com
13. **Arnaud Delahaye.**
www.arnobio2.com
14. Laboratoire de Bactériologie FINCK/FORAY ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES URINES Version 1 11/01/2002.
www.univ-lyon1.fr
15. **J.P.Lavigne** - Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes - Octobre 2005
www.med.univ-montp1.fr
16. **Ameziane Aziza:** Projet de fin d'études n° 466 : ECBU et étude statistique de la distribution des germes et leur sensibilité aux antibiotiques au CHU Hassan II de Fès (2004).
17. **Pierre-Yves:** Biomicrobio, les milieux de culture.
www.py.guillaume1.free.fr
18. **Berrada Halima:** Projet de fin d'études n° 665 : ECBU Techniques et résultats à l'hôpital Ghassani de Fès (2006).
19. **J.P. Euzéby** : Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.
www.bacteriologie.net/generale/resistanceantibiotiques.html
20. **Thierry Flam** 2000-20093UropageFrance,
21. **Débré,B.**, Abrégé d'urologie., Edition Masson., 1992.
22. **Martine BUTREAU-LEMAIRE, Henry BOTTO** (1997) Service d'Urologie, CMC Foch, Suresnes, France.
www.urofrance.org

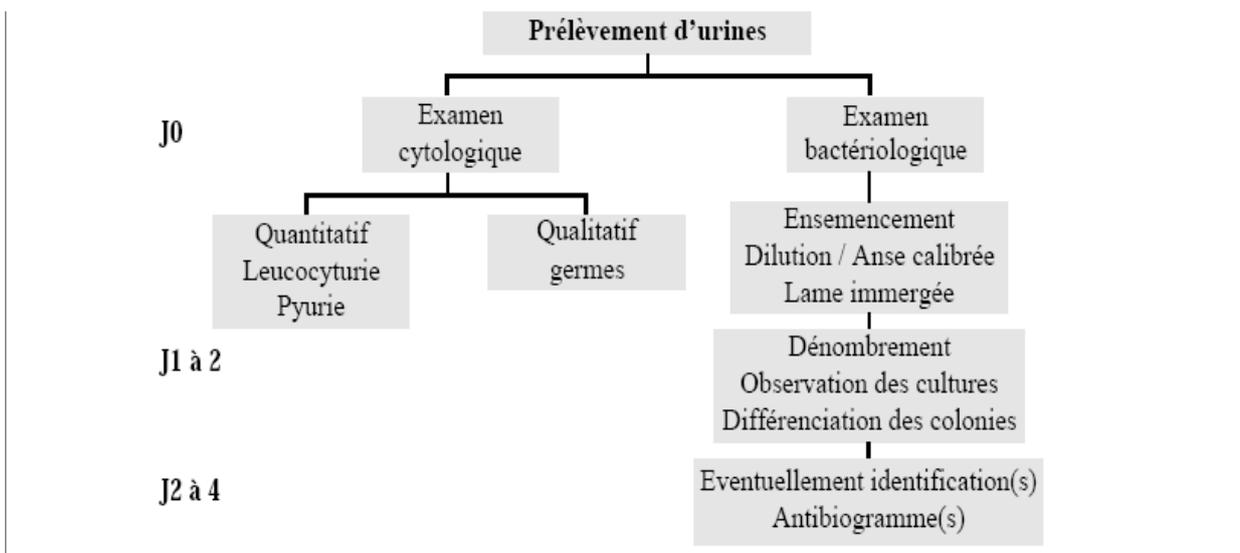
ANNEXES





ANNEXE 1: Schéma des différentes étapes de

l'ECBU



ANNEXE 2: Schéma de l'examen cytologique et de l'examen bactériologique

ANNEXE 3 : Composition des milieux de culture

Milieu CLED



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
Faculté des Sciences et Techniques
- Département des sciences de la vie -



Peptones	4g
Extrait de viande	3g
Hydrolysât trypsique de caséine	4g
L-cystine	0,128g
Lactose	10g
Bleu de Bromothymol (indicateur de pH)	0,002g
Agar	15g
Eau distillée	1L

Milieu BCP

Peptone	5 g
Extrait de viande	3g
Lactose	10g
Agar	15g
Pourpre de Bromocrésol	0,025g
Eau	1L
pH7	

Milieu Muëller-Hinton

Infusion de viande de bœuf	300,0 g
Hydrolysât de caséine	17,5 g
Amidon	1,5 g
Agar	17,0 g
Eau distillée (qsp)	1L

Milieu Hajna -Kligler

Extrait de viande de boeuf	3 g
Extrait de levure	3 g
Peptone (riche en lysine)	20 g
NaCl	5 g
Citrate ferrique	0,3 g
Thiosulfate de sodium	0,3 g
Lactose	10 g
Glucose	1 g
Rouge de phénol (solution à 1%)	5 mL
Agar	12 g
Eau distillée	1 L

Milieu citrate de Simmons



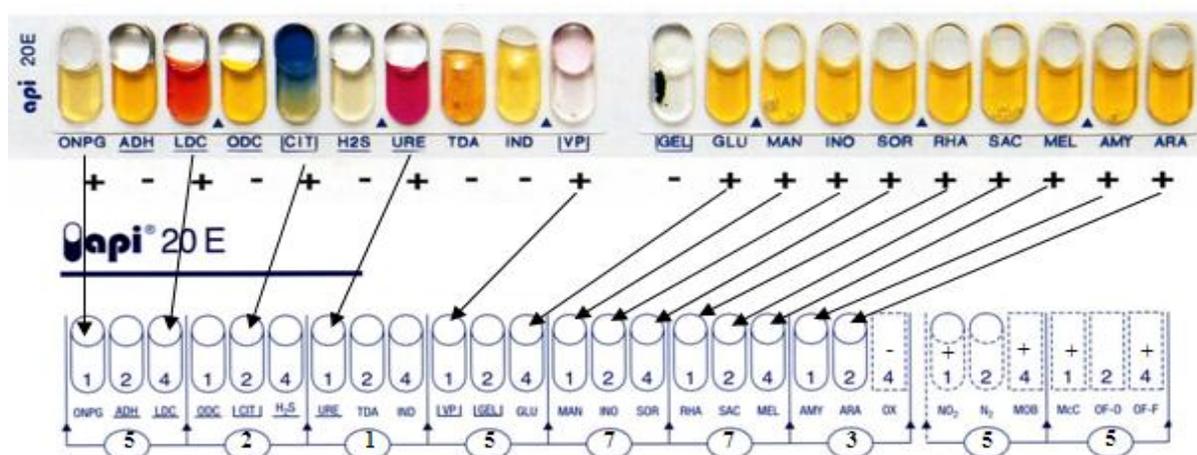
UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
Faculté des Sciences et Techniques
- Département des sciences de la vie -



Sulfate de magnésium	0,2g
Citrate de Na ⁺	2g
NaCl	5g
Hydrogénophosphate d'ammonium	0,2g
Hydrogénophosphated'ammonium monosodique	0,8g
Bleu de bromothymol	0,08g
Agar	15g
Eau distillée (qsp)	1L

Milieu mannitol mobilité

pectone tryptique de viande	20 g
mannitol	2 g
KNO ₃	1
rouge de phénol 1%	4 ml
agar	4 g



Résultats reportés sur la fiche d'identification

Codon [®] : 5 215 773 (55)	Ident.
-------------------------------------	--------

Se référer au catalogue pour identifier la souche à l'aide du code

ANNEXE 4: La galerie Api 20E.



ANNEXE 5: Phoenix™ 100 BD

ANNEXE 6: tableau des caractères d'identification des genres les plus fréquemment rencontrés.

	<i>Escherichia</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Serratia</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Providencia</i>	<i>Yersinia</i>
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	-	+/-	-	-	+
Indole	+	-	-	+/-	-	-	+/-	+/-	+	+/-
VP	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+*
Citrate	-	+	+	+	+	+/-	-	+/-	+	-
Mobilité	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+*
Urée	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
PDA	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-

LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
Faculté des Sciences et Techniques
- Département des sciences de la vie -



H ₂ S	-	+/-	-	-	-	+	-	+/-	-	-
------------------	---	-----	---	---	---	---	---	-----	---	---

(*): À 20°C seulement.