

## Chapitre II : Méthodes de diagnostic des produits pathologiques.

### 1. Examen cytobactériologique des urines (ECBU)

L'examen cytobactériologique des urines (ECBU) est l'analyse microbiologique la plus fréquemment réalisée en laboratoire. L'analyse permet principalement de rechercher la présence d'une infection urinaire, de déterminer les germes responsables et d'adapter ainsi le traitement antibiotique. La réalisation de l'ECBU comprend les différentes étapes indiquées dans la figure 01.

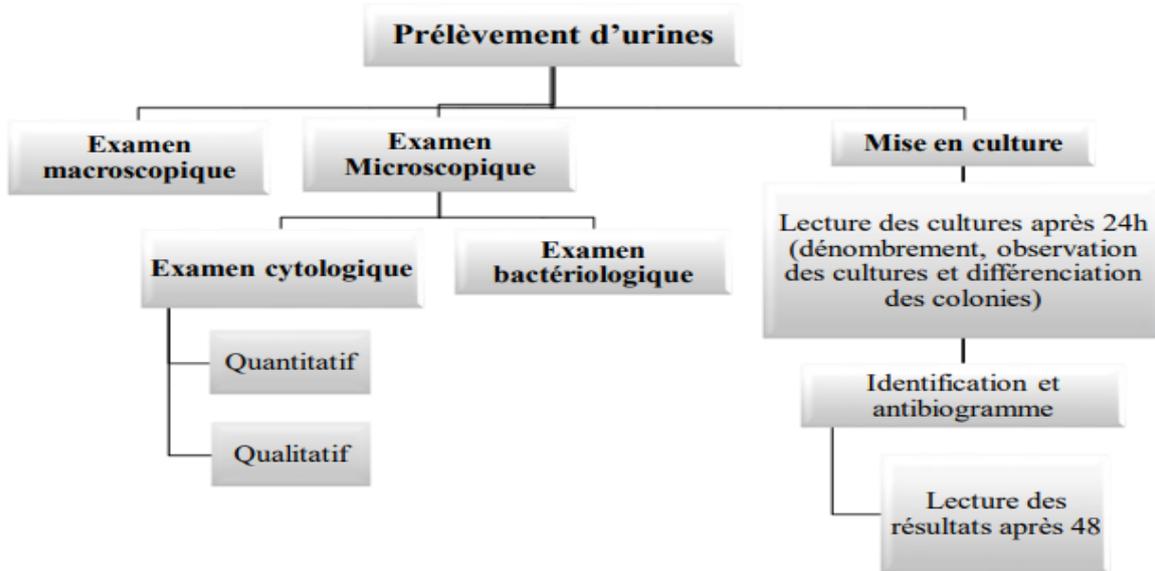


Figure 01 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de l'ECBU.

#### 1.1. Examen macroscopique

Cet examen est effectué immédiatement dès la réception des urines. Il s'agit de visualiser l'apparence des urines à l'œil nu. Il permet de noter s'il y a une modification des caractères physiques de l'urine tels que la couleur, l'odeur, et l'aspect. L'urine normale est de couleur jaune citron et claire, tandis que l'urine infectée est souvent trouble, d'odeur nauséabonde et de couleur plus foncée. Parfois, on note même la présence de sédiments blanchâtres (phosphates), ou rouge brique (acide urique ou urate), hématurie ou marron.

#### 1.2. Examen microscopique

Il comprend un examen cytologique et un examen bactériologique

##### 1.2.1. Examen cytologique (qualitatif et quantitatif)

###### ➤ Analyse qualitatif (leucocytes, hématies, cylindres, cristaux).

Cette analyse permet d'observer et d'apprécier les cellules présentes dans l'échantillon d'urine, essentiellement les leucocytes, les germes et leurs éventuelles mobilités, les hématies, les cellules épithéliales, les cylindres granuleux et les cristaux. Cet examen est réalisé en déposant une goutte d'urine, à l'aide d'une micropipette entre lame et lamelle, puis la lame est examinée sous microscope optique à l'objectif x 40.

###### ➤ Analyse quantitatif

Cette analyse consiste à quantifier les cellules présentes dans l'urine d'une façon précise, surtout les leucocytes et les hématies. Le dénombrement de ces éléments se fait dans un hématimètre de préférence en verre de Malassez (Cellule de Malassez) permettant la numération dans un volume  $1 \text{ mm}^3$  (Fig. 02). Le résultat est exprimé en hématies et leucocytes par  $\text{mm}^3$ , ou plus volontiers par millilitre (unité reconnue internationalement). A l'état physiologique, l'urine contient moins de 10 000 leucocytes et 5 000 hématies par ml (ou 10 leucocytes/ $\text{mm}^3$  et 5 Hématies/ $\text{mm}^3$ ). En cas d'infection urinaire, le processus inflammatoire se traduit le plus souvent par la présence de :

> 50.000 leucocytes/ml.

> 10.000 hématies /ml témoins de microhémorragies

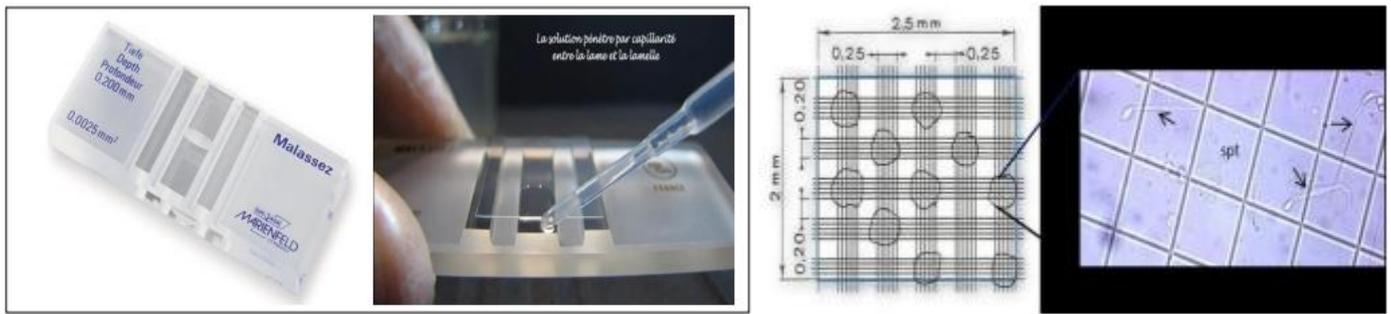


Figure 02: Méthode de comptage sur cellule de Malassez.

### 1.2.2. Examen bactériologique

Cet examen peut être effectué sans coloration par observation directe à l'état frais, ou bien après la coloration de Gram.

#### ➤ L'état frais

Il permet de détecter la présence des bactéries et de déterminer leur forme, et surtout leur mobilité par l'observation directe d'une gouttelette d'urine entre une lame et lamelle sous microscope à l'objectif x 40.

#### ➤ La coloration de Gram

Cet examen reste indispensable en apportant des informations immédiates au clinicien sur le type de bactéries impliquées permettant d'adapter le traitement. Cette coloration permet d'étudier la morphologie des germes et le Gram différentiel.

Avant la coloration, il faut préparer un frottis : à l'aide de l'anse de platine ou de pipette Pasteur, on prélève une goutte d'urine puis on la pose sur une lame préalablement marquée. Ensuite, on étale, on fait sécher puis on fixe par trois ou quatre passages brefs dans la flamme d'un bec benzène.

Ensuite, une coloration primaire se fait par le violet de gentiane pendant 30 secondes à 1 minute. Cette étape est suivie par un rinçage à l'eau du robinet. La deuxième étape s'agit d'un mordantage au lugol pendant 60 secondes suivie d'un autre rinçage à l'eau distillée. La troisième étape est une décoloration à l'alcool (+ acétone) pendant 5 à 10 secondes. Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. La décoloration est suivie également d'un rinçage d'eau distillée. La dernière étape de la coloration Gram est une contre-coloration à la fuchsine pendant 30 secondes à 1 minute. Cette dernière étape est suivie par un lavage à l'eau distillée et ensuite d'un séchage de la lame sur une platine chauffante à 40°C, 10 à 15 minutes (Fig. 03). L'observation microscopique se fait avec une goutte d'huile à immersion en microscope à l'objectif x 100.

Les bactéries à Gram positif sont colorées en violet, les bactéries à Gram négatif en rose. Cependant elles peuvent avoir l'une de ces formes : Cocci isolé, Cocci en diplocoque, Cocci en tétrade, Cocci en chaînette, Cocci en grappe de raisin, Bacilles, coccobacilles, bacilles fusiformes...

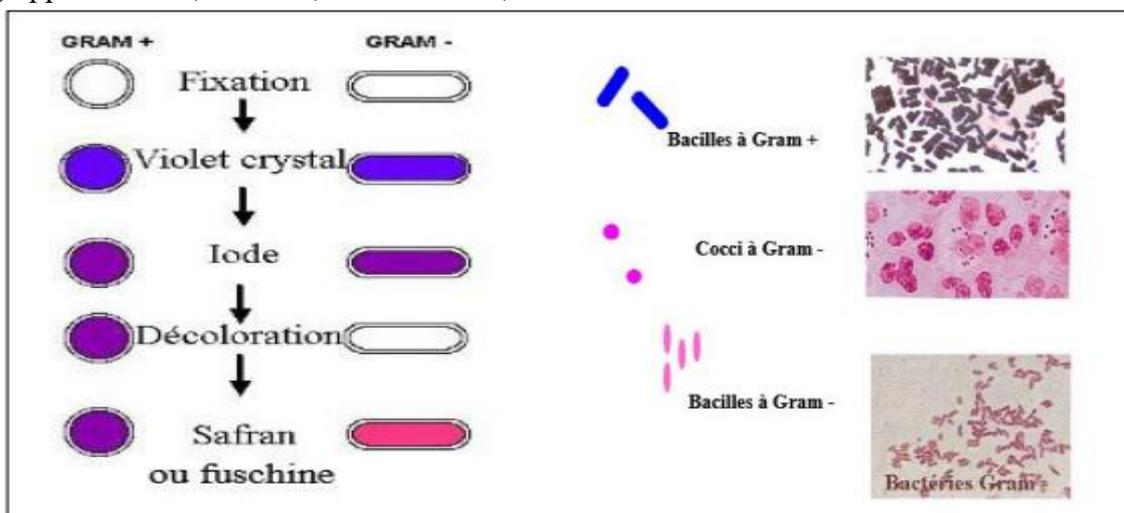


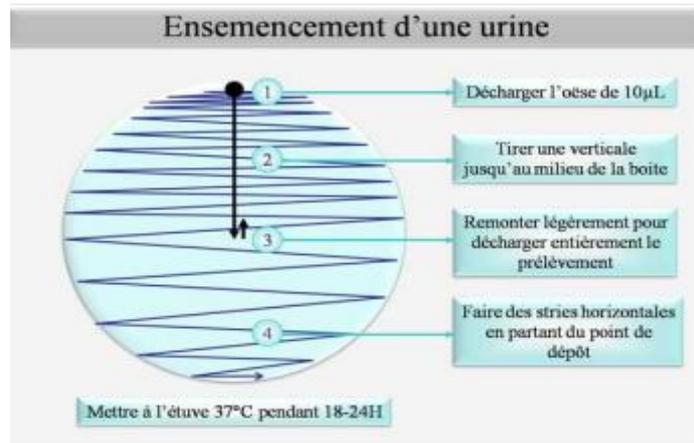
Figure 03: Étapes de la coloration de gram.

### 1.3. Mise en culture

La mise en culture est une étape très importante, elle sert à l'isolement et la numération des bactéries afin de permettre leur identification. L'importance de cette étape réside dans le choix d'un milieu de culture adapté à la pousse des germes les plus fréquemment impliqués dans les infections urinaires, et aussi la connaissance des exigences culturelles des germes en cause.

L'isolement est effectué sur différents milieux. La majorité des bactéries responsables d'infection urinaire ne sont pas exigeantes et sont cultivées sur gélose nutritive (GN). D'autres milieux peuvent être utilisés telle que des milieux sélectifs comme le milieu de Chapman, surtout utilisé pour l'isolement des Germes G<sup>+</sup> halophiles : les *Staphylococcus*, les *Micrococcus*, les *Enterococcus*, les *Bacillus* et de rares bactéries à Gram négatif. Aussi, la gélose Hektoen (Verte) pour l'isolement et à la culture des Salmonelles et shigelles. Et la gélose au sang frais ou au sang cuit qui est un milieu enrichi pour l'isolement des streptocoques et toutes les bactéries exigeantes et non exigeantes.

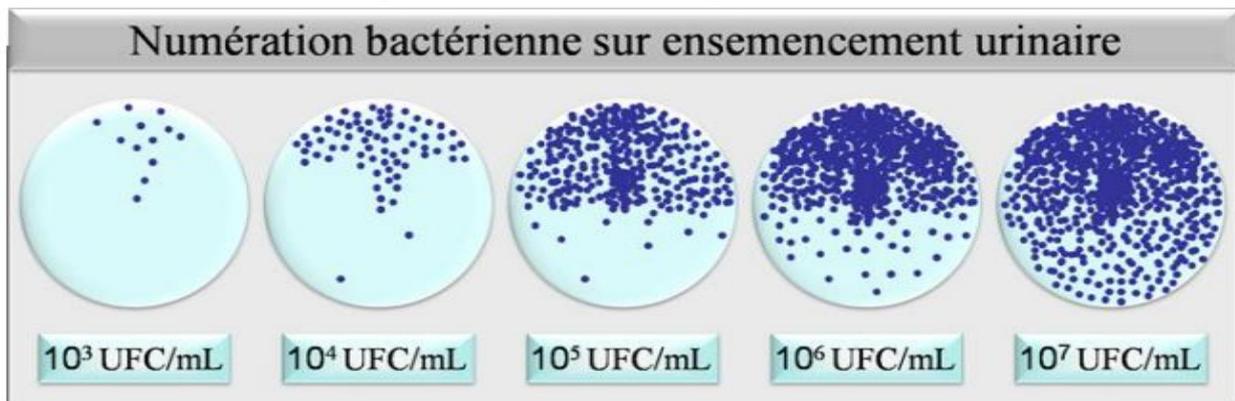
L'ensemencement sur les milieux de culture se fait par la méthode de l'anse calibrée. Cette méthode consiste à déposer un volume de 10 µl d'échantillon d'urine parfaitement homogénéisée sur un rayon de la boîte à l'aide d'une anse calibrée stérile, puis étaler le dépôt en stries perpendiculaires au rayon sur toute la surface de la gélose (**Fig. 04**). Ensuite, les boîtes sont incubées dans une étuve à 37° pendant 24h.



**Figure 04 :** Ensemencement des urines par méthode de l'anse calibrée.

### 1.4. Numération bactérienne

Après le temps d'incubation, chaque bactérie viable donne naissance à une colonie visible à l'œil nu. Le nombre de bactéries/ ml d'urine ou bactériurie est alors calculé à partir du nombre de colonies obtenus et le volume d'urine ensemencé : Unité Formant Colonie (UFC) par ml d'urine analysée. La numération des colonies repose sur une comparaison de la densité des colonies présentes sur la partie supérieure de la gélose à celle du schéma fourni avec l'abaque de dénombrement (**Fig. 05**).



**Figure 05:** Abaque de dénombrement.

## 1.5. Interprétation des résultats

En fonction des résultats de l'examen cytologique, du compte de germes et du nombre de colonies différentes obtenues après culture, plusieurs situations sont possibles :

- **Absence de colonies sur les milieux de culture + présence de germes à l'examen cytologique** : Ré-incuber pendant 24h à 35°C (possibilité de germes à croissance tardive ou infection décapitée par une antibiothérapie récente). Si absence de colonies à 48 h, la culture est dite négative.
- **Absence de colonies + présence d'assez nombreux, très nombreux leucocytes** : L'éventualité d'une antibiothérapie préalable, refaire l'ECBU 3-5 jours après l'arrêt de traitement, recherche du germe exigent comme les mycobactéries.
- **Une sorte de colonies (un seul type de germe),  $N < 10^3$  UFC/ml** : Absence de culture bactérienne significative, peut être une infection débutante, ou contamination possible.
- **Une sorte de colonie,  $N \geq 10^3$  UFC/ml** : Culture bactérienne positive. Procéder à l'identification de germe et réaliser l'antibiogramme.
- **Deux sortes de colonies,  $N \geq 10^5$  UFC/ml** : Poursuivre le protocole avec 2 cas à envisager : Si l'une des colonies est majoritaire, l'autre germe constitue une contamination du prélèvement. Donc, il faut identifier et réaliser l'antibiogramme du germe responsable des colonies majoritaires. S'il y a une équivalence, on identifie les 2 sortes et on réalise l'antibiogramme de chaque germe.
- **Plus de deux sortes de colonies** : Flore bactérienne polymorphe et donc la culture est contaminée, refaire le prélèvement.

## 2. Examen bactériologique des selles (Coproculture)

La coproculture est recommandée en cas de diarrhée persistante, d'intoxication alimentaire, de suspicion de maladie intestinale... La coproculture est envisagée en cas de diarrhée aiguë en cas de :

- Trois selles molles ou liquides par jour depuis plus d'une journée et moins de 15 jours ;
- Fièvre supérieure à 40°C ;
- Présence de glaire ou de sang dans les selles ;
- Douleurs abdominales ;
- Retour d'un pays où les diarrhées bactériennes sont fréquentes ;
- Diarrhées chez des patients hospitalisés (diarrhée nosocomiale due à *Clostridium difficile*) ;
- Toxi-infection alimentaire collective (TIAC)

En pratique de routine :

- Chez l'adulte on recherche : *Salmonella*, *Shigella* et *Vibrion cholérique* à la demande.
- Chez l'enfant < à 2 ans on recherche : *E.coli* entéropathogène, *Salmonella*, *Shigella* et *Vibrio cholerae* à la demande.

### 2.1.Examen direct

Il comporte deux étapes : un examen macroscopique et un examen microscopique.

#### ➤ Examen macroscopique

Un examen macroscopique consiste à noter la consistance des selles (moulée, selle molle ou en bouse, selle liquide, selle semi liquide, selle dure), et leur couleur : brune, jaune ou ocre, verte, décolorée, rouge ou noir. Ainsi la présence de glaires, de pus ou de sang. La selle peut être :

- Normale: moulée, molle ou liquide.
- Elle peut être diarrhéique : Afécale avec glaires sanglantes (dysentérieformes) ou, incolore en eau de riz (cholérique).

#### ➤ Examen microscopique directe

-**Observation des selles à l'état frais** : pour les selles liquides, on travaillera directement sur la selle. Pour les selles moulées, Elle se fait par étalement de la matière fécale avec une goutte d'eau physiologique sur une lame propre puis recouvrir d'une lamelle, on fait l'observation au microscope optique (x40), et on note la présence des leucocytes, des hématies, et des bactéries très mobiles. Il permet d'apprécier un déséquilibre

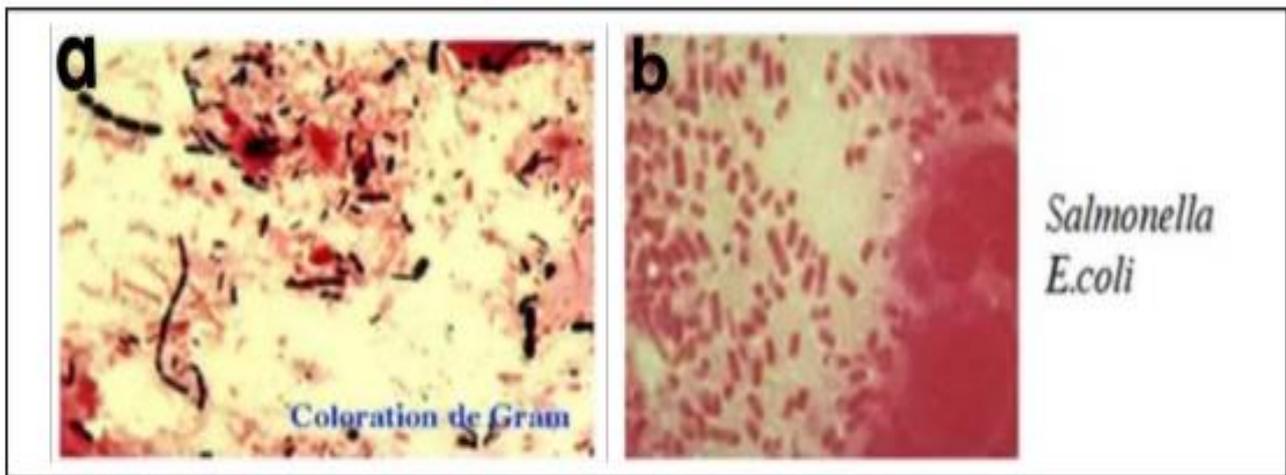
de la flore. A l'état normal, on trouve environ 4/5 de bacilles et 1/5 de cocci et de rares levures. Un processus invasif est caractérisé par la présence d'hématies et de leucocytes.

- **Observation des selles après coloration au bleu de méthylène** : Cet examen permet d'apprécier la flore, de voir les leucocytes (Recherche des polynucléaires) et les levures.

-**Observation des selles après coloration de Gram**: cet examen est très important, permet d'évaluer le pourcentage de bactéries Gram <sup>+</sup> et Gram <sup>-</sup> (voir si la flore est équilibrée entre bactéries à Gram positif et à Gram négatif : environ 60 % de bactéries Gram <sup>-</sup>, et 40 % de bactéries Gram<sup>+</sup>, dans une selle normale), de rechercher les aspects caractéristiques (Entérobactérie, Vibrio). Il permet aussi de rechercher les leucocytes qui en quantité supérieure à 5 par champ, sont le signe d'une diarrhée à germe invasif, de même que la présence d'hématies (**Fig.04**). Mode opératoire :

• **En cas de selle solide** : On fait une dilution au 1/10 dans de l'eau distillée, bien agiter au vortex, étaler sur lame et colorer.

• **En cas de selle liquide** : étaler directement une goutte sur lame.



**Figure 04** : a) morphologies caractéristiques (Coloration de Gram) b) exemple de *Salmonella* et *E. coli*.

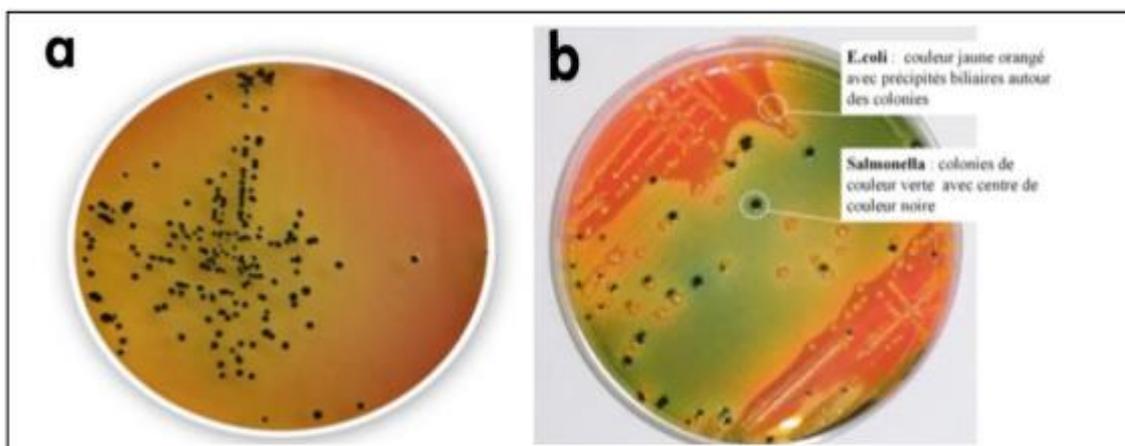
## 2.2. Milieux utilisés et ensemencement

La recherche de certains germes responsables d'infections digestives peut être grandement facilitée par l'ensemencement dans des milieux généralement sélectifs, pour isoler puis identifier l'agent infectieux.

La culture s'effectue par l'ensemencement des milieux spécifiques suivants (**Fig.05**):

- Milieu Hektoen pour les entérobactéries.
- Milieu Salmonelle-Shigelle.

L'incubation de ces milieux se fait à 37°C pendant 18 à 24 heures.



**Figure 05** : a) milieu Salmonelle-Shigelle b) les germes *E. coli*, *Salmonella* sur milieu Hektoen.

### 2.3. Interprétation des résultats

#### ➤ Résultat normaux d'une coproculture

Les résultats sont interprétés comme normaux lorsque la flore saprophyte ne présente pas de danger pour l'organisme. Une flore normale renferme plus de 400 espèces de bactéries différentes, on la considère normale quand elle est constituée de germes non pathogènes et en absence de globules blancs (leucocytes) ou de globules rouges (hématies).

#### ➤ Résultat anormaux d'une coproculture

Les infections digestives et diarrhées aiguës sont dues principalement à la *Salmonella sp* et des autres germes qui sont à une concentration très faible dans les selles : *Shigella*, *Campylobacter*, *Vibrio cholerae*, certains colibacilles : *Yersinia Enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* et *Clostridium*, et certains souches d'*Escherichia coli*.

### 3. Examen bactériologique du sang (Hémoculture)

Le sang est normalement stérile. Lorsque des agents infectieux passent dans le sang, de façon répétée, ils peuvent provoquer une infection grave. On parle de bactériémie, voire septicémie en cas de passages importants et répétés dans le sang des agents pathogènes.

L'hémoculture est un examen médical utilisé pour détecter la présence de bactéries ou de micro-organismes pathogènes dans le sang. C'est un outil diagnostique essentiel pour identifier les infections bactériennes systémiques, souvent appelées bactériémies ou septicémies. Les étapes d'hémoculture sont les suivantes :

#### 3.1. Prélèvement et milieux d'hémoculture

Le milieu pour hémoculture est classiquement un bouillon conditionné en flacon sous pression réduite, et que l'on inocule avec le sang du patient à travers un opercule en caoutchouc. On trouve dans le commerce divers modèles de flacons d'hémoculture, les uns pour incubation conventionnelle, les autres spécifiques pour incubateurs automatisés. En incubation classique, diverses options sont proposées :

- la présentation Biphase (phase solide - phase liquide) retrouvée dans le modèle CASTANEDA (BIORAD) ou HEMOLINE (BIOMERIEUX).
- la présentation monophasique proposée par les mêmes fournisseurs et destinée à la détection des bactéries anaérobies strictes : il s'agit d'un bouillon de culture SCHAEGLER conditionné sous vide.
- L'hémoculture SIGNAL (OXOID).
- Le bouillon pour hémoculture de l'Institut Pasteur d'Algérie.



Fig. 11.1. – Flacons d'hémocultures retrouvés sur le marché.  
A) Gamme de flacons pour les Bactecs® (Becton Dickinson) ;  
B) Gamme de flacons pour le BacT/ALERT® (bioMérieux) ;  
C) Flacon manuel Signal® (Oxoid) équipé de son indicateur de croissance ;  
D) Flacon manuel Hémoline® (bioMérieux) ;  
E) Système Isolator® (Oxoid)

Classiquement, tout bouillon pour hémoculture est un bouillon nutritif enrichi de facteurs de croissance : Peptones de Caséine et de Gélatine, Extraits de levure, NAD et Hémine, Vitamines B6, K3, Cystéine. L'atmosphère à l'intérieur du flacon est faite de CO<sub>2</sub>. L'anticoagulant est le SPS (Sodium polyanéthole sulfonate).

#### ➤ Nombre de flacons et volume de sang à prélever

Les prélèvements doivent être répétés afin de majorer les chances d'isolement de l'agent causal. Classiquement, on admet 2 à 3 hémocultures, c'est à dire 4 à 6 flacons (2 à 3 paires Aérobie et anaérobies

sur une période de 24 h. Pour ce qui est du volume de sang à prélever, il doit être de 10 ml par flacon chez l'adulte, de 2 à 5 ml chez l'enfant et de 1 ml chez le nouveau-né et le nourrisson.

➤ **L'acheminement au laboratoire**

Les flacons d'hémoculture sont rapidement acheminés au laboratoire d'analyse, de préférence enveloppés dans du coton afin de les maintenir à une température proche de celle de l'organisme. Une fiche de renseignements cliniques doit impérativement accompagner les flacons vers le laboratoire.

**3.2. Incubation et suivi des flacons d'hémoculture**

Une incubation à 37°C pendant 7 jours est recommandée pour les systèmes manuels. Les flacons sont examinés chaque jour à partir de la 6<sup>ème</sup> heure d'incubation, à la recherche d'un signe de culture. La surveillance des flacons est visuelle, basée sur la recherche d'un trouble, d'un voile en surface, d'une hémolyse, d'un coagulum, de dépôts blanchâtres floconneux au fond du flacon ou de particules adhérentes sur sa paroi interne. En cas de flacon biphasique (CASTANEDA), l'apparition de colonies sur la paroi gélosée pose le diagnostic d'hémoculture positive (**Tab. 01**).

**Tableau 01** : Différents aspects du bouillon d'hémoculture en cas de positivité.

Aspect macroscopique	Bactérie en cause
Turbidité	<i>Bacilles à Gram – aérobies</i> <i>Staphylococcus sp.</i> <i>Bacteroides sp.</i>
Hémolyse	<i>Streptococcus sp.</i> <i>Staphylococcus sp.</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Clostridium sp.</i> <i>Bacillus sp.</i>
Production de gaz	<i>Bactéries aero-anaérobies ou anaérobies strictes</i>
Coagulum	<i>Staphylococcus aureus</i>
Colonies au fond du flacon	<i>Streptococcus sp.</i> <i>Nocardia sp.</i>

**3.3. Traitement des flacons positifs**

Devant toute suspicion de positivité, un examen microscopique et une mise en culture sont réalisés sur les flacons. Les flacons d'hémoculture ne sont jamais ouverts ; l'isolement et l'identification des agents infectieux sont réalisés à partir d'un échantillon prélevé par ponction à la seringue, de chaque flacon. Toutes les manipulations se font sous hotte bactériologique à flux laminaire. Le port d'un masque et de gants est indispensable vu le risque de transmission au manipulateur, de certains germes dangereux (exemple *Brucella*).

➤ **Examen microscopique**

Sous un poste de sécurité microbiologique, du bouillon est prélevé de façon aseptique après avoir désinfecté l'opercule du flacon à l'aide d'une seringue et du dispositif fourni par le fabricant. L'examen du bouillon est effectué en deux étapes :

- L'état frais afin d'observer la morphologie et la mobilité des bactéries.
- la coloration de Gram pour déterminer plus précisément la morphologie des bactéries (cocci ou bacille) et leur affinité tinctoriale (G<sup>+</sup> OU G<sup>-</sup>). Pour certains germes, on peut avoir recours à d'autres colorations bleue de méthylène, acridine orange...etc). Tout résultat positif de l'examen direct doit être communiqué rapidement au clinicien, notamment si plusieurs flacons sont positifs, si l'ya de *Clostridium* ou *Neisseria* ou si les patients sont à risque (immunodéprimés).

➤ **Ensemencement (repiquage)**

Les repiquages de flacons suspects sont effectués en fonctions de l'examen direct. Les cultures étant généralement monomicrobiennes, des milieux gélosés non sélectifs seront utilisés, gélose colombia avec 5% du sang incubées en aérobiose pendant 48h et en anaérobiose pendant 5 jours, gélose au sang cuit enrichis (poyvitex) placés sous CO<sub>2</sub> pendant 48h lorsqu'un *Haemophilus spp.* ou *Neiseria spp.* sont évoqués.

Si à l'examen direct un mélange de bactéries est suspecté, des milieux sélectifs pourront être utilisés, la gélose ANC (Acide nalidixique- colistine) pour isoler sélectivement les bactéries à Gram<sup>+</sup> et la gélose CLED (Cystine Lactose Electrolyte Déficient = milieu enrichi en cystine et lactose et pauvre en ions) pour les bacilles Gram<sup>-</sup>. Le choix de l'atmosphère (aérobie, CO<sub>2</sub> ou anaérobie) pour l'incubation de ces milieux à 37°C dépend du diagnostic présomptif (**Tab. 02**).

Les flacons sont conservés à température ambiante pour un éventuel nouveau repiquage ultérieur si les cultures sont restées négatives.

**Tableau 02 : Milieux utilisés pour les repiquages d'hémocultures.**

Agents recherchés	Repiquage sur milieux de culture suivants	T° et durée d'incubation
<i>Brucella sp</i>	Columbia au sang frais Columbia au sang cuit (autres : TSA+5% sérum de bœuf ou Brucella Agar )	37°C 48h -72h S Sous 5% CO <sub>2</sub>
<i>Campylobacter sp</i>	Columbia au sang frais Columbia au sang cuit (autres : milieu de Skirrow ou Butzler ou Karmali)	37°C 3- 4jrs 5% CO <sub>2</sub> Microaérophilie
<i>Legionella sp</i>	BCYE	37°C 15jrs 5%CO <sub>2</sub>
HACCEK	Columbia au sang cuit Columbia au sang cuit +PVX	37°C 4jrs S/CO <sub>2</sub>
<i>Abiotrophia sp</i> <i>Granulicatella sp</i>	Columbia + sang frais+strie de Staph ( Satellitisme) Autres : Columbia +sang frais+ 0,001% Pyridoxal Enrichissement sur TODD HEWITT + PVX	37°C 3jrs S/CO <sub>2</sub>
<i>Bartonella quintana</i> Ou <i>Bartonella henselae</i>	Prélèvement de sang sur tube hépariné Utilisation du système de centrifugation-lyse Culot de centrifugation mis en culture sur Columbia +sang frais de mouton ou de lapin Mise en culture sur lignée cellulaire (cellules endothéliales )	37°C 6 semaines 5% CO <sub>2</sub> 37°C 10 jrs /CO <sub>2</sub>
Leptospires	Prélèvement de sang sur tube hépariné Milieu au Tween + Albumine en tubes	30°C à l'obscurité 2 mois
Mycobactéries	Hémoculture en Bact/alert- flacon d'hémoc. spécifique pour Mycobactéries	
Levures	Sabouraud	30°C 1 mois
Mycoplasmes Ureaplasma	Culture en bouillon PPLO (Pleuropneumoniae like organisms) ou en gélose A3	37°C Microaérophilie 3 jours

### ➤ Identification et antibiogramme

Sur des hémocultures monomicrobienne, suivant le type bactérien observé à la coloration de Gram, une identification sera parallèlement lancée. Il est possible à partir d'un culot lavé, de réaliser directement un antibiogramme.

Dans le cas d'un mélange de bactéries suspecté à l'examen direct, les colonies des repiquages seront pratiqués avec quelques test biochimiques, permettant d'orienter vers une identification complète (galerie, biotypage/serogroupage...etc), et d'étudier la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées.

### 3.4. Interprétation des résultats

#### ➤ Résultats normaux (négatifs)

- Les différentes hémocultures sont stériles, aucun germe n'est retrouvé.
- Une hémoculture négative ne veut pas forcément dire qu'il n'existe pas d'infection, mais cela indique qu'à l'instant précis où le prélèvement a été pratiqué il n'y avait pas de germes dans le sang.
- Ou alors que le germe responsable de l'infection a des exigences de cultures très particulières et qu'il ne pousse pas dans les milieux de cultures usuels. Le résultat est alors faussement négatif.

#### ➤ Résultats anormaux (positifs)

L'interprétation des résultats des hémocultures positives est simple quand il y'a un isolement d'une bactérie pathogène spécifique (BPS) : *Salmonella typhi*, *Brucella*, *Neisseria meningitidis*, par exemple. L'isolement de telles bactéries impose le diagnostic.