

## 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.

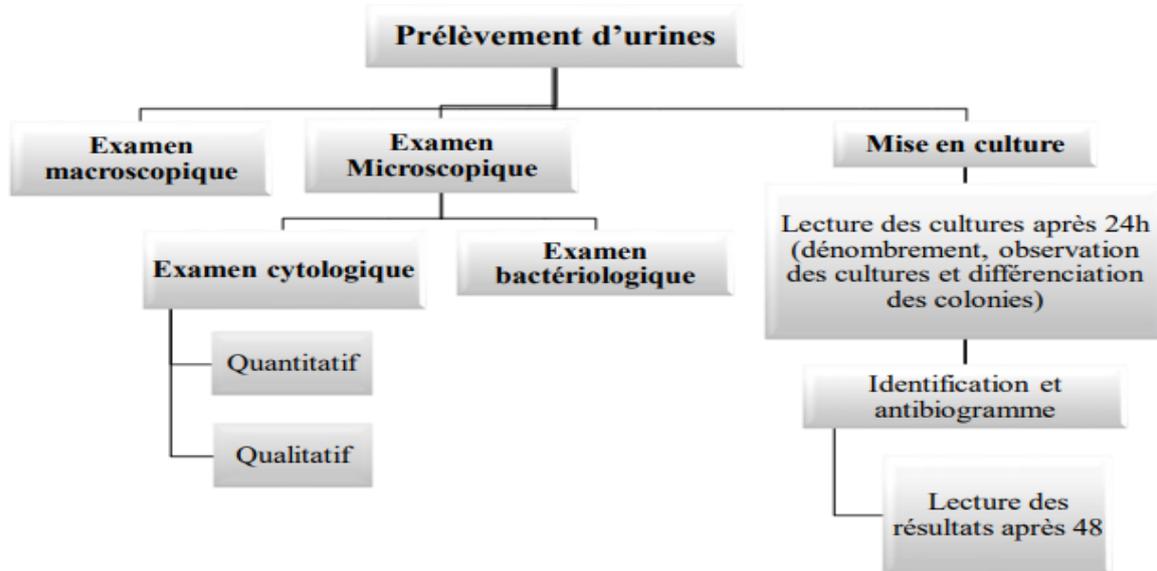


Figure 01 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de l'ECBU.

#### 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 qualitative (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 quantitative

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.

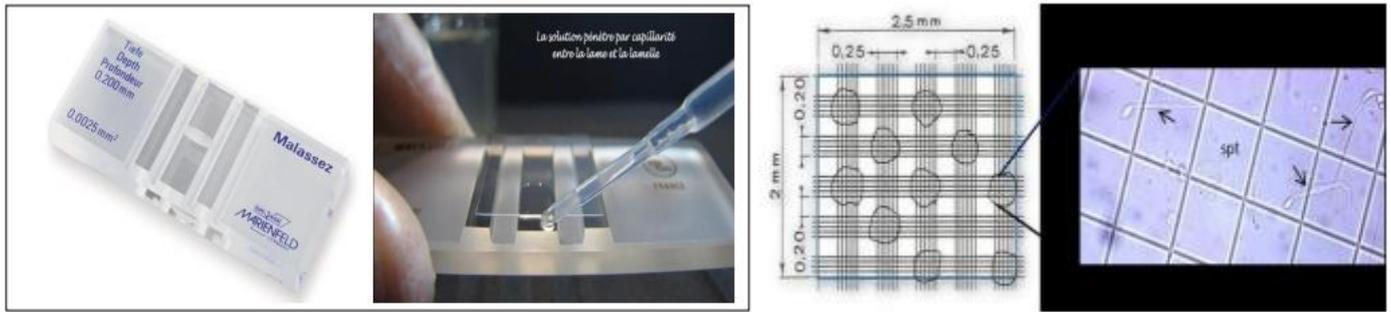


Figure 02: Méthode de comptage sur cellule de Malassez.

### 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 dans la flamme du bec benzène (**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...

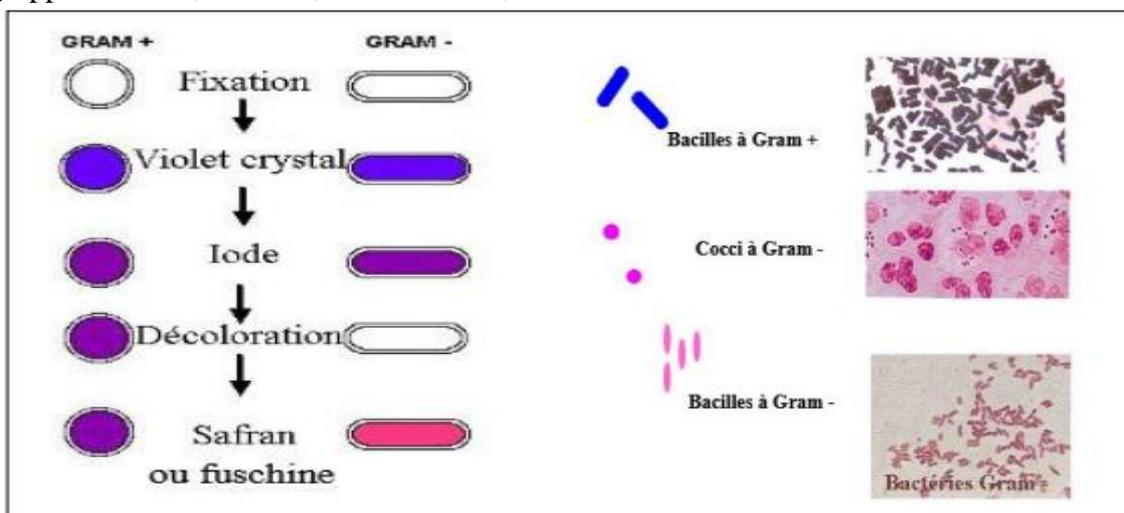


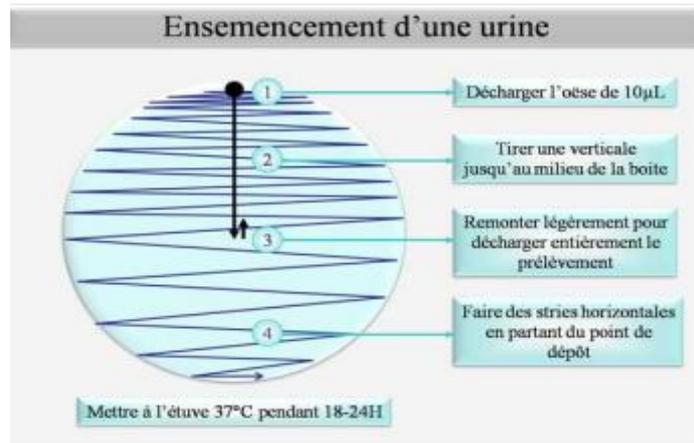
Figure 03: Étapes de la coloration de gram.

### 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 Gram<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.

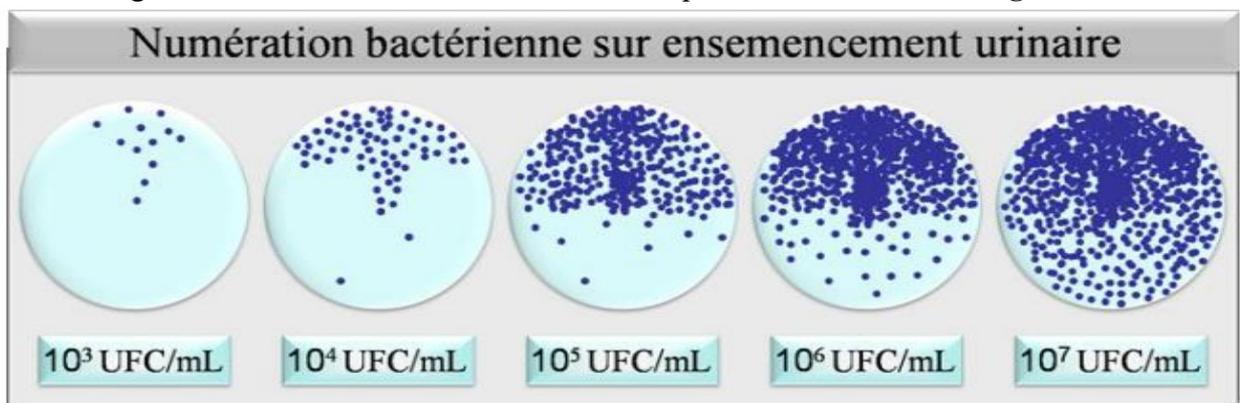
L'ensemencement sur les milieux de culture se fait par la **méthode de l'anse calibrée**. Cette méthode consiste à déposer un volume de 10 µl d'échantillon d'urine parfaitement homogénéisée sur un rayon de la boîte à l'aide d'une anse calibrée stérile, puis étaler le dépôt en stries perpendiculaires 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. En pratique de routine, 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.

Ce tableau représente les principales espèces responsables d'infections urinaires.

**Tableau 01:** Espèces responsables d'infections urinaires (proportion en %).

Espèces bactériennes	Infections communautaires Réseau AFORCOPI-BIO Rapport Onerba 2002 (n = 417)	Infections nosocomiales Groupe d'étude ESCMID Europe 2000 (n = 421)	Infections S.A.U. d'un hôpital pédiatrique 2005 (n = 221)
<b>Gram négatif</b>			
<i>Escherichia coli</i>	68	38	79
<i>Proteus mirabilis</i>	8	7	9
<i>Klebsiella spp.</i>	5	9	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	6	0,5
Autres entérobactéries	3	7	1
<i>Acinetobacter spp.</i>		2	
<b>Gram positif</b>			
<i>Enterococcus spp.</i>	5	17	3
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3		0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	2	2
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3		1
Autres	1	2	1
Levures		10	