



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية عاوم الطبيعة و الحياة

Département de Microbiologie
Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Micro-organismes

Intitulé :

**Identification et antibiorésistance de souches
d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* des
infections urinaires à l'aide des moyens classiques
et des moyens automatisés**

Présenté et soutenu par :

Le : 30/06/2015

- BOUKHEMIS Amina
- BOUTERSA Amina

Jury d'évaluation :

Président du jury : KACEM CHAUCHE N. (Pr- UFM Constantine)

Rapporteur : AIT ABDELOUAHAB N. (MAA- UFM Constantine)

Examinatrice : MERIANE I. (MAA- UFM Constantine)

Année universitaire 2014 - 2015

TABLE DES MATIERES

	Page
INTRODUCTION GENERALE	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. Introduction	2
2. Méthodes d'identification et antibiogramme	2
2.1. Méthodes classiques d'identification et antibiogramme.....	3
2.2. Les moyens automatisés	5
3. Comparaison entre les moyens classiques et les automates.....	6
4. Les Entérobactéries.....	9
4.1. Caractéristique générale.....	9
4.1.1. Définition	9
4.1.2. Habitat.....	10
4.1.3. Classification.....	10
4.1.4. Caractères morphologiques.....	11
4.1.5. Caractères cultureux.....	11
4.1.6. Caractères biochimiques.....	11
4.1.7. Caractères antigéniques.....	11
4.1.8. Pouvoir pathogène.....	12
4.2. Etude de principales espèces.....	12
4.2.1. <i>Escherichia coli</i>	12
4.2.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	13
MATERIEL ET METHODES	16
1. Lieu de travail.....	16
2. Durée	16
3. Prélèvement.....	16
4. Matériel.....	16
5. Méthodes.....	17
5.1. Au niveau des moyens classiques.....	17
5.2. Au niveau des moyens automatisés (Vitek 2 compact).....	23

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS	25
1. Observation microscopique.....	25
2. Identification de souches isolées sur la gélose nutritive.....	25
2.1. Observation macroscopique.....	25
2.2. Identification par la galerie biochimique classique.....	25
2.3. Identification par la galerie API 10 S.....	26
3. Identification des souches isolées sur les milieux Mac Conkey, Chapman et au chocolat.....	26
3.1. Observation macroscopique.....	26
3.2. Identification par la galerie biochimique classique	27
3.3. Identification par la galerie API 10 S.....	27
4. Distribution globale des souches isolées.....	28
5. Distribution des souches selon l'espèce.....	29
6. Etude de la sensibilité et de la résistance aux antibiotiques des souches isolées	30
6.1. profil de résistance des souches d' <i>Escherichia coli</i>	30
6.2. profil de résistance des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	31
7. Identification et antibiogramme des souches étudiés par Vitek 2 compact	32
DISCUSSION	36
1. Au niveau des moyens classiques.....	36
1.1. Identification des souches isolées.....	36
1.2. Antibiogramme.....	36
2. Au niveau des moyens automatisés (vitek 2 compact).....	38
CONCLUSION.....	40
ANNEXE.....	42
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	47
RESUME	

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux qui nous a aidés et menés vers le chemin du savoir

Nous adressons notre remerciement à mademoiselle AIT ABDELOUAHEB Naoual l'encadreur de notre mémoire : pour l'effort fournis et pour ses précieux conseils, sa confiance et sa persévérance dans la suivi, tout au long de la réalisation de ce travail. Nos vifs remerciements pour les membres du jury à commencer par Mr KACEM CHAOUICHE N qui nous a fait l'honneur de présider notre jury.

A mademoiselle MERIANE I d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Nous adressons également nos remerciements, à tous nos enseignants, qui nous ont données les bases de la science.

A samiha pour leur aide au sein de stage.

A toute personne qui participé de près ou de loin pour l'accomplissement de ce modeste travail.

Dédicace

Je Dédie ce travail.

A mes cher parents ; symboles de sacrifice, de tendresse d'amour. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

A mes chers frères : Hamoudi et Zaki.

A mes cousins : Ramy, Abdou, Amar, Yasser, Mouna et Abdelrahim.

A mes très chère amies : Lina, Hanane, Loubna, Aicha et Manal.

A tous ma famille maternelle et paternelle.

A tous ce qui me sont chers.

A Mon binôme Amina.

Boutarsa Amina

Dédicace

*Au nom d'Allah le plus grand merci lui revient de nous
avoir guidé vers le droit chemin.*

*Je dédie ce modeste travail à ma cher mère, mon très
cher père pour leur amour inestimable, leurs sacrifices
et toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer.*

A mes chers frères : Antar, Zinou.

A mes chères sœurs : Souad, Romaiassa.

A mon cher fiancé : Fateh (Aziz).

*A mes cousins : Ahlem, Amine, khadijha, Ayat
elrahmen.*

*A mes très chers amies : Loubna, Manel, Aicha, Ferial,
Fairouz, Randa.*

A tous ma famille maternelle et paternelle.

A tous ce qui me sont chères.

A Mon binôme Amina.

Boukhemis Amina

LISTE DES TABLEAUX :	Page
Tableau 1 : Classification des espèces d'Entérobactéries les plus fréquentes en clinique Humaine.....	10
Tableau 2 : Test d'urée-indole.....	19
Tableau 3 : Test TSI.....	20
Tableau 4 : Test ONPG.....	20
Tableau 5 : Conditions de culture et d'incubation des souches destinées à l'identification et l'antibiogramme sur Vitek 2 Compact.....	24
Tableau 6 : Caractères cultureux sur la gélose nutritive.....	25
Tableau 7 : Caractères biochimiques par la galerie classique.....	26
Tableau 8 : Caractères biochimiques à partir de la galerie API 10 S.....	26
Tableau 9 : Caractères cultureux sur les deux milieux de Mac Conkey et au chocolat.....	27
Tableau 10 : Caractères biochimiques à partir de la galerie classique.....	27
Tableau 11 : Caractère biochimique à partir de la galerie API 10 S.....	27
Tableau 12 : Distribution des souches selon les cas d'ECBU.....	28
Tableau 13 : Fréquence des bactéries isolées.....	28
Tableau 14 : Distribution d' <i>Escherichia coli</i>	29
Tableau 15 : Distribution de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	29
Tableau 16 : Résistance et sensibilité d' <i>E. coli</i> aux antibiotiques	30
Tableau 17 : Résistance et sensibilité de <i>K. pneumoniae</i> aux antibiotiques.....	31
Tableau 18 : Résistance et sensibilité d' <i>E. coli</i> (Vitek 2 compact).....	33
Tableau 19 : Résistance et sensibilité de <i>K. pneumoniae</i> (Vitek 2 compact)	35

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Automate d'identification et d'antibiogramme Vitek 2

Figure 2 : Schéma représentant les différents antigènes (K, O, H) des Entérobactéries.

Figure 3 : Galerie API 10 S avant l'utilisation.

Figure 4 : Formation des colonies sur les deux géloses Mac Conkey et au Chocolat.

Figure 5 : Secteurs représentant les nombres d'exams cyto bactériologiques effectués.

Figure 6 : Fréquence des bactéries isolée.

Figure 7 : Distribution d'*Escherichia coli*

Figure 8 : Distribution de *K. pneumoniae*.

Figure 9 : Profile de résistance et sensibilité d'*E.coli* aux antibiotiques.

Figure 10 : Profile de résistance et sensibilité de *K. pneumoniae* aux antibiotiques.

Figure 11 : profile de résistance et sensibilité d'*E. coli* aux antibiotiques par le Vitek 2 compact.

Figure 12 : Rapport de laboratoire par Vitek 2 compact d'*E. coli*.

Figure 13 : Profile de résistance et sensibilité de *K. pneumoniae* aux antibiotiques par le Vitek 2 compact.

Figure 14 : Rapport de laboratoire de l'automate Vitek 2 compact de *K. pneumoniae*.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GENERALE

L'identification bactérienne est une étape très importante dans le diagnostic d'une maladie, elle consiste à reconnaître le microorganisme inconnu, à le placer dans un taxon connu et enfin à déterminer l'agent pathogène responsable de cette maladie [18].

Les maladies liées aux infections urinaires sont courantes et l'identification des germes impliqués est fondamentale dans le diagnostic posé dans les laboratoires d'analyse de biologie médicale. La démarche de l'identification repose sur les moyens classiques et /ou automatisés.

Les moyens classiques sont utilisés depuis longtemps; le principe d'identification à l'aide des moyens classiques est assez simple : il s'agit en pratique d'effectuer un examen microscopique, un examen macroscopique et une galerie biochimique. Il convient ensuite de comparer les différents caractères morphologiques et biochimiques de l'espèce inconnue avec une espèce déjà décrite (une souche type) et l'antibiogramme de cette souche qui permet d'étudier le profil de résistance et de sensibilité de cette souche inconnue et aussi de bien l'identifier.

Les moyens automatisés ont fait leur apparition en 1980. Ce sont de nouveaux systèmes spécifiques avec leur étuve intégrée, gérant toutes les étapes d'identification depuis l'incubation à l'identification de la souche inconnue, ils possèdent une informatique gérant l'automate et éventuellement connectable à une informatique centralisée. Un système expert est présent permettant une première validation par l'automate d'identification bactérienne associée à son antibiogramme [16].

Il existe plusieurs types d'automates tels que les automates d'identification, les automates d'antibiogramme et les automates d'identification et d'antibiogramme à la fois. Il existe aussi des automates capables d'identifier plus de 300 souches en un temps très court c'est-à-dire l'automate capable d'identifier plusieurs souches inconnues ensemble.

Notre travail est basé sur une étude comparative entre les moyens classiques et les moyens automatisés comme Vitek2 compact. Ces moyens serviront à l'identification et à l'antibiogramme d'Entérobactéries associées aux infections urinaires telles que les genres : *Escherichia* et *Klebsiella*. Cette étude a été effectuée pendant 5 semaines aux laboratoires d'analyses médicales Lina (Casbah) et El-Mahmoudi (Ali Mendjli).

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. INTRODUCTION

Comment peut-on faire l'identification par la méthode classique d'une espèce bactérienne inconnue? Habituellement, une première étape consiste à en déterminer certains caractères, puis à comparer ceux-ci aux caractères des nombreuses espèces connues jusqu'à trouver une similitude. L'origine de l'espèce inconnue fournit souvent des indications qui, ajoutées à quelques observations et tests simples, peuvent conduire à l'identité possible de l'organisme ou, au moins permettent de limiter la recherche à l'un des principaux groupes bactériens. Donc l'identification au niveau de l'espèce devient possible par la comparaison des caractères de l'espèce inconnue avec ceux des caractères des genres et des espèces connues. Mais après l'apparition des automates d'identification et d'antibiogramme certaines étapes de la manipulation comme la lecture et l'interprétation des résultats sont devenues automatisées et plus rapides [27].

2. METHODES D'IDENTIFICATION ET ANTIBIOGRAMME

L'identification bactérienne répond classiquement à un arbre décisionnel fondé sur des critères de morphologie de colonies (taille, pigmentation), d'aspect à la coloration de Gram, d'hémolyse et de caractères biochimiques (catalase ou oxydase). Selon les résultats, l'orientation se fera vers tel ou tel type d'identification. Les méthodes d'identification sont variables selon les bactéries : techniques d'agglutination (Staphylocoques, Streptocoques), biochimiques (Entérobactéries, non-Entérobactéries, Staphylocoques *et* Streptocoques..), chromogéniques (bactéries urinaires), immuno-enzymatiques (*Clostridium difficile*, *Legionella pneumophila*) ou génomiques (*Chlamydia*, Mycobactérie...) [10].

Cette multiplicité de techniques d'identification constitue également un handicap dans le développement d'un système universel. La réponse apportée à cette problématique par les automates a été progressive; elle a d'abord concerné les bactéries peu exigeantes et à croissance rapide, puis les bactéries exigeantes.

Seule la biologie moléculaire, par un système d'identification unique, séquençage du gène de l'ARN 16 S, secondairement automatisable, pourrait en théorie remplacer toutes les autres techniques [10].

2.1. Méthodes classiques d'identification et antibiogramme

Ce sont encore les moyens les plus utilisés dans les laboratoires de biologie médicale. La stratégie consiste à sélectionner au mieux les caractères les plus discriminants. Ces méthodes nécessitent une incubation préalable, les cultures doivent être pures et peuvent être liquides comme les urines, le sang, ... ou solides comme les selles.

2.1.1. Examen microscopique

Au cours de l'analyse microbiologique, l'observation microscopique permet de faire une étude morphologique des cellules d'une espèce microbienne, elle comprend [5]:

- l'examen à l'état frais (examen entre lame et lamelle de bactéries vivantes)
- l'examen après coloration (le plus souvent sur frottis séché et fixé)

a) Examen à l'état frais

Il permet de noter la présence de bactéries et d'observer les caractères suivants : la forme des cellules (cocci, bacilles, coccobacilles, incurvés en virgule), le mode de regroupement, la mobilité et la quantité approximative de bactéries par champ microscopique [11].

b) Examen après coloration

Si la plupart des bactéries et des microbes peuvent être observés en suspension aqueuse, cette observation est grandement facilitée par l'application de colorants. Les colorations, réalisées sur des frottis séchés et fixés, sont classées en [5] :

Coloration simple

Des frottis bactériens peuvent être colorés avec des colorants simples de microbiologie tels que le bleu de toluidine, le bleu de méthylène et la fuchsine phéniquée de Ziehl [11].

Coloration différentielle : la coloration de Gram

C'est la coloration différentielle systématiquement réalisée lors d'un examen microscopique de bactéries. Elle permet non seulement d'observer la forme des cellules mais aussi de diviser les bactéries en deux grands groupes taxonomiquement différents: les bactéries Gram positives et les bactéries Gram négatives [11].

L'action de plusieurs colorants permet des effets de contraste : un premier colorant (cristal violet), un mordant (lugol, acide de phénique, acide chromique, chaleur) qui complexe le colorant, un différenciateur qui est une substance décolorante (alcool à 90°, mélange alcool/acétone, acide fort) et enfin un deuxième colorant [11].

2.1.2. Examen macroscopique

Pour l'examen macroscopique des bactéries communes, les souches bactériennes doivent être cultivées sur milieu liquide et sur un milieu gélosé solide en boîte de Pétri.

afin de déterminer les caractères culturels suivants : taille des colonies la (petites colonies : $\emptyset < 1$ mm, colonies moyennes : $\emptyset 1,5$ à 3 mm, grosses colonies: $\emptyset > 3$ mm, ou colonies ponctiformes (ne peut se voir qu'avec une loupe), la forme (étoiles, irrégulières, envahissantes, ou rondes) le relief (bombées, plates ou ombiliquées) la surface des colonies sur boîte (lisses, muqueuses, rugueuses), la transparence des colonies sur boîte en lumière naturelle et artificielle (transparentes, translucides ou opaques) [11,9].

2.1.3. Identification bactérienne

a) par la galerie biochimique

Les tests biochimiques constituent une approche classique pour l'identification des bactéries et permettent aussi de vérifier si la bactérie a un métabolisme oxydatif ou fermentatif, s'il y a formation d'un acide à la suite de l'utilisation d'un hydrate de carbone (exemple : glucose, arabinose), si un composé particulier est utilisé comme seule source de carbone (exemple : citrate), si un acide aminé peut être transformé (exemple : lysine, tryptophane) ou si un enzyme particulier est présent (exemple : oxydase, catalase).

b) par la galerie API 10 S

La galerie API 10 S est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif, comprenant 10 tests biochimiques miniaturisés ainsi qu'une base de données. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans un tableau d'identification.

2.1.4. Antibiogramme

C'est le test destiné à montrer la sensibilité d'une souche bactérienne à divers antibiotiques, la souche est déclarée sensible, intermédiaire ou résistante. En vue de sélectionner l'antibiotique le plus efficace pour lutter contre ce germe [13].

Les antibiotiques sont des substances élaborées par des micro-organismes, ou des substances synthétiques, qui sont bactériostatiques ou bactéricides à dose faible. Leurs cibles d'activité sont des structures moléculaires spécifiquement bactériennes. Elles ont donc une

toxicité sélective pour les cellules procaryotes et une toxicité faible pour les cellules eucaryotes [19].

2.2. Les moyens automatisés

En 2006, en France et en Europe trois firmes commercialisent des systèmes automatisés pour lesquels les réactifs ont reçu un numéro d'enregistrement à l'agence des médicaments ou à l'agence européenne. La société bioMérieux commercialise le Vitek ®. Ce dernier a évolué et possède deux modèles le Vitek ® 1 (aujourd'hui appelé Vitek ® 32) sous quatre versions modulables (32,60 ,120 et 240) et Vitek 2 avec deux versions 60 ou 120 [10].

Les automates ont été conçus pour faire les diagnostics dans deux domaines distincts:

Dans le domaine clinique : l'analyse d'un échantillon réalisé à partir d'un prélèvement biologique (sang, salive, urine ...) qui permet la détection et mesure la présence d'agents pathogènes (bactéries, virus, champignons) ou de substances secrétées par le corps humain [28].

Dans le domaine industriel : l'analyse d'un échantillon réalisé à partir d'un produit alimentaire, pharmaceutique, cosmétique, ou de son environnement de production pour garantir sa parfaite innocuité et la sécurité des consommateurs [29].

2.2.1. Définition et rôle

Le Vitek 2 compact, utilisé au cours de notre étude, est un automate d'identification des bactéries et d'antibiogramme. Il est créé pour les petits laboratoires qui souhaitent disposer d'un système automatisé capable de traiter la majorité de leurs tests de routine avec des résultats rapides grâce à son logiciel Expert, Advanced Expert System™ (AESTM) qui offre des avantages importants pour le biologiste, le clinicien et également pour le patient [30].

En plus d'une grande fiabilité, le biologiste peut être certain de détecter des résistances même faiblement exprimées. Le médecin dispose d'un rapport validé le jour même, et sera alerté en cas de résistance aux antibiotiques. Ce rapport leur permet d'étayer son diagnostic et le cas échéant, de modifier l'antibiothérapie le plus précocement possible. Le patient, quant à lui, est rapidement soigné par un traitement antibiotique [30].

2.2.2. Description de l'automate d'analyse médicale (Vitek 2)

Vitek 2 compact est un instrument qui regroupe : machine de mise sous vide, chargeur de cassettes, machine à sceller les cartes, magasin circulaire de lecteur et conteneur à déchets avec un encombrement limité [30].

Tous les instruments de Vitek 2 compact sont représentés dans la figure suivante :



Figure 1: Automate d'identification et d'antibiogramme Vitek 2

1. Interface utilisateur, écran et clavier
2. Porte de remplissage avec indicateur
3. Porte de chargement avec indicateur
4. Porte de collecte des déchets
5. Porte d'accès utilisateur
6. DensiChek plus (densitomètre)
7. PC station de travail (environnement Windows + Logiciel de gestion du Vitek 2 Compact)
8. Cassette avec des cartes ID et/ou AST (portoir)
 - Imprimante (non présentée)
 - Onduleur (non présenté)
 - Lecteur de code à barres (non présenté)

3. COMPARAISON ENTRE LES MOYENS CLASSIQUES ET LES AUTOMATES

L'existence des laboratoires d'analyse médicale est axée sur les moyens classiques pour l'identification des bactéries d'intérêt clinique mais les scientifiques ne s'arrêtent pas sur ces moyens, ils cherchent toujours à aller plus loin, au delà des performances. Leurs recherches leur ont permis d'automatiser les moyens classiques pour faciliter l'identification et l'antibiogramme en même temps.

3.1. Multifonction

La méthode classique sépare entre l'identification et l'antibiogramme par les différentes étapes de chacune dont l'identification de l'agent pathogène est orientée par l'examen direct, par l'aspect des colonies sur milieu usuel et par des tests simples et classiques d'identification biochimique [15].

Parallèlement à l'identification, un antibiogramme doit être réalisé sur gélose de Mueller Hinton par la méthode de diffusion des disques chargés d'antibiotiques. Il permet de dépister la résistance des bactéries aux antibiotiques et de réévaluer le traitement empirique [15].

Mais les automates proposent des plaques éventuellement combinées, dites «combo», regroupant l'identification et l'antibiogramme. L'automate Vitek 2 possède des cartes séparées mais les résultats de lecture sont interprétés conjointement [16].

La multitude des plaques associées à l'identification, le nombre et le type d'antibiotiques variables selon les groupes bactériens sont des arguments non négligeables dans le choix de l'automate.

3.2. Fiabilité

Les automates sont plus fiables pour une bonne identification et un bon antibiogramme que les moyens classiques parce que ces derniers présentent un risque de contamination au cours des différentes étapes de manipulation manuelle ; les méthodes automatisées, par contre présentent un nombre minimum d'étapes par conséquent, le risque de contamination diminue.

3.3. Informatique

L'informatique des automates peut posséder une ou plusieurs fonctions allant de la reconnaissance automatique des plaques à une connexion sur une informatique centrale en passant par une gestion des résultats. Ces multifonctions peuvent être intéressantes dans un cadre de réorganisation et de traçabilité : elles permettent de mettre à la disposition du biologiste, s'il n'en avait pas, un outil épidémiologique [16].

La méthode classique d'identification et d'antibiogramme ne possède aucun type d'informatique, toutes les étapes se font manuellement et avec l'observation à l'œil nu. Ces techniques manuelles doivent déterminer les différents caractères des bactéries inconnues.

3.4. Système expert

L'identification bactérienne est validée par le biologiste au vu des résultats biochimiques et de ceux de l'antibiogramme. L'ensemble est corrélé à la nature du prélèvement et à l'épidémiologie. Un système Expert existe pour l'ensemble des automates permettant de valider l'identification à l'antibiogramme ; il peut être plus ou moins performant.

Il est généralement possible de modifier ou de rajouter des règles d'expertise interne [15].

Ainsi, le système Expert n'existe que dans les automates seulement et l'identification et l'antibiogramme au niveau des moyens classique n'utilisent pas ce système et l'interprétation des résultats se fait manuellement.

3.5. Coût

Plusieurs coûts sont à envisager :

- Le coût de l'appareil lui-même correspondant à l'investissement de base pour le fonctionnement (l'existence de plusieurs modèles pour un même automate permet d'avoir le choix selon le nombre d'identifications ou d'antibiogrammes quotidiens). Les appareils les plus automatiques étant compris dans une même fourchette de prix public voisine de 100 000 euros [16].
- Le coût de consommables, aussi bien le support des tests que les tubes, pipettes ou réactifs de révélation, correspond au prix de revient d'une identification sans tenir compte de l'amortissement de l'appareil.

Les coûts des pièces de maintenance, du papier d'impression ainsi que les coûts indirects correspondant éventuellement à l'identification à refaire, interviennent aussi dans le prix global de revient [16].

Les moyens utilisés pour l'identification et l'antibiogramme classiques (les milieux de culture, les boîtes de Pétri...), sont moins chers que les automates.

3.6. Temps

Les résultats d'identification et d'antibiogramme au niveau des moyens classiques sont lents : 24 à 96 heures à cause de la préparation manuelle de toutes les étapes du début jusqu'à la fin c'est-à-dire l'inoculation, l'ensemencement, l'incubation qui prend beaucoup de temps et enfin la lecture, mais l'automatisation de l'identification et de l'antibiogramme permet sur l'étape d'inoculation et d'incubation-lecture un gain de rapidité réel de 3 à 7 heures. L'identification bactérienne est rendue plus vite, son antibiogramme également même s'il retarde parfois le résultat global [16].

La lecture des résultats par les automates dépend de différents facteurs : la taille de l'inoculum, l'agitation des dispositifs ensemencés, l'analyse informatique des lectures très fréquentes des tests et les systèmes de détection de la positivité des réactions.

Ces automates apportent une lecture automatique et totalement indépendante de l'homme avec la majorité des cartes du système Vitek, les plaques rapides du WalkAway et les galeries du système Phoenix [16].

4. LES ENTEROBACTERIES

La naissance de la famille des *Enterobacteriaceae* se situe en 1937 lorsqu'Otto Rahn proposa le genre *Enterobacter* pour regrouper les microorganismes. Les Entérobactéries sont très hétérogènes pour ce qui est de leur pathogénicité. Les espèces qui composent cette famille sont, en effet, soit parasites, soit commensales (*Escherichia coli*, *Klebsiella sp*), soit encore saprophytes (*Serratia sp*, *Enterobacter sp*) [3, 24].

4.1. CARACTERISTIQUES GENERALES

4.1.1. Définition

La famille des *Enterobacteriaceae* regroupe de nombreux genres bactériens répondant aux caractères suivants [3]:

- bacilles à Gram négatif
- immobiles ou mobiles grâce à une ciliature péritriche
- aérobies anaérobies facultatifs
- se développant aisément sur milieu ordinaire
- fermentant le glucose
- ne possédant pas d'oxydase

- possédant une catalase
- réduisant les nitrates en nitrites

4.1.2. Habitat

Ces bactéries sont en général des hôtes normaux ou pathologiques, suivant les espèces microbiennes, du tube digestif de l'homme, des animaux et de l'environnement tels que les sols et les eaux [8, 12].

4.1.3. Classification

Les *Enterobacteriaceae* englobent actuellement 100 espèces classées.

Les genres et espèces les plus facilement isolés en bactériologie clinique sont regroupés dans le tableau 1 [31]:

Tableau 1 : Classification des espèces d'Entérobactéries les plus fréquentes en clinique humaine [22].

Genres	Espèces
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>
<i>Shigella</i>	<i>S. dysenteriae, S. sonnei, S. boydii, S. flexerii</i>
<i>Salmonella</i>	<i>S. typhi, Paratyphi A, B, C... >2000 sérotypes</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae, K. oxytoca</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>E. cloacae, E. aerogenes</i>
<i>Serratia</i>	<i>S. marcescens</i>
<i>Proteus</i>	<i>P. mirabilis, P. vulgaris</i>
<i>Providentia</i>	<i>P. rettgerii, P. stuartii</i>
<i>Morganella</i>	<i>M. morganii</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i>
<i>Hafnia</i>	<i>H. alvei</i>
<i>Yersinia</i>	<i>Y. pestis, Y. enterocolitica, Y. pseudotuberculosis</i>

4.1.4. Caractères morphologiques

Les Entérobactéries sont des bacilles droits à Gram négatif, non sporulés, d'une longueur de 1,0 à 6,0 μm et d'un diamètre de 0,3 à 1,0 μm . Ils ont une ciliature péritriche pour les formes mobiles. On rencontre parfois des formes capsulées [32].

4.1.5. Caractères cultureux

Les Entérobactéries se développent sur tous les milieux gélosés ordinaires à base de peptone ou d'extraits de viande en 18 heures à 35-37 °C en donnant des colonies rondes, lisses, à contour régulier dont le diamètre est de 2 à 3 mm. En milieu liquide, elles causent un trouble homogène en bouillon [8].

4.1.6. Caractères biochimiques

Les Entérobactéries sont : chimio-organotrophes, fermentent le glucose (avec ou sans production de gaz), possèdent à la fois un métabolisme respiratoire et fermentatif [3, 6, 8]:

4.1.7. Caractères antigéniques

Le sérotypage des Entérobactéries est défini par différents antigènes [32]:

L'antigène O : est un antigène de paroi, thermostable c'est-à-dire résistant 2 h à un chauffage de 100°C, très toxique, responsable de la toxicité (endotoxine).

L'antigène H : est un antigène flagellaire de nature protéique, thermolabile détruit par l'alcool à 50 % et par les enzymes protéolytiques.

L'antigène K : est un antigène capsulaire de nature polysaccharidique.

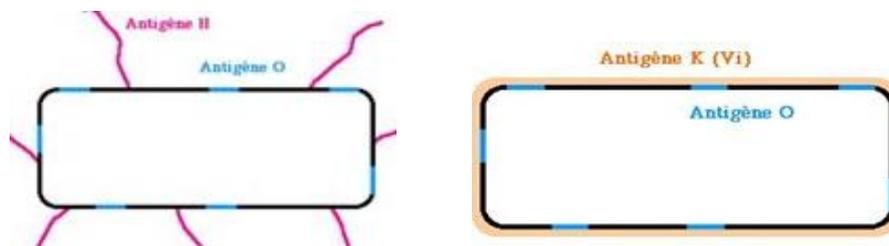


Figure 2 : Schéma représentant les différents antigènes (K, O, H) des Entérobactéries.

4.1.8. Pouvoir pathogène

Il s'agit d'une très vaste famille qui représente près des trois quarts des isollements d'un laboratoire de bactériologie médicale. Elle est responsable de deux grands types de manifestations pathologiques [26]:

- Une pathologie spécifique telle que la typhoïde
- Une pathologie opportuniste avec, pour certaines, une notion d'hospitalisme infectieux marqué.

4.2. ETUDE DES PRINCIPALES ESPECES

Il s'agit en l'occurrence d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae*.

4.2.1. *Escherichia coli*

a) Définition

Escherichia coli est une bactérie naturellement présente dans la flore intestinale. Si la plupart des souches de cette bactérie sont sans danger pour la santé, certaines sont à l'origine d'infections intestinales plus ou moins graves [33].

b) Habitat

Cette bactérie, potentiellement mortelle, a pour principal habitat l'intérieur des intestins des bovins et de l'homme. Ceci explique qu'elle soit surtout responsable d'intoxications alimentaires transmises par la viande hachée [24].

c) Caractéristiques biochimique et antigénique

Ce sont des bacilles à gram négatif, chimio-organotrophes, parfois capsulés, ils possèdent une ciliature péritriche pour les espèces mobiles. Ces bacilles fermentent le glucose (avec ou sans production de gaz), ils sont aéro-anaérobies facultatifs et possèdent à la fois un métabolisme respiratoire et fermentatif [20].

d) Pouvoir pathogène naturel

E. coli est responsable d'infections extra-intestinales, infections urinaires, infections abdominales et septicémies avec choc septique du à l'endotoxine O et d'infections intestinales : l'existence des diarrhées à *E. coli* est connue depuis 1940. Ces diarrhées sont

dues à des souches de sérotypes particuliers qui provoquent soit des cas sporadiques, soit des petites épidémies [1].

e) Résistance aux antibiotiques

-Résistance naturelle

Escherichia coli est une entérobactérie, qui comme toutes les entérobactéries présente une résistance naturelle aux glycopeptides et à la pénicilline G. Elle appartient au groupe 1 des Entérobactéries qui sont naturellement sensibles à l'ensemble des bêta-lactamines [25].

- Résistance acquise

Certaines souches ont acquis de nouveaux mécanismes de résistance leur permettant d'échapper aux antibiotiques. La résistance d'*E. coli* aux bêta-lactamines est due à une inactivation de l'antibiotique par l'acquisition d'enzymes. Trois principaux types d'enzymes sont répertoriés : les pénicillinases, une enzyme dite TRI (pour TEM résistant inhibiteur) et les céphalosporinases [25].

4.2.2. *Klebsiella pneumoniae*

Le genre *Klebsiella* fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae*, il se distingue par son immobilité constante, et son groupement en diplobacilles, il est souvent encapsulé. Ce genre comporte 5 espèces différenciées par des caractères biochimiques : *Klebsiella pneumoniae* (comportant 2 sous espèces : *ozaenae* et *rhinosckeromatis*), *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella terrigena* et *Klebsiella ornithinolytica*.

L'espèce type est *Klebsiella pneumoniae* parce qu'elle est la plus fréquemment retrouvée en clinique humaine [7, 8].

a) Définition et habitat

Connue sous le nom de pneumobacille de Friedlander, c'est une bactérie commensale du tube digestif des animaux et de l'homme et de l'environnement, elle est isolée à partir du sol, des eaux de surface, des eaux usées et de végétaux. Elle appartient habituellement à la flore intestinale correspondant à l'ensemble des germes non pathogènes contenus dans les intestins. Cette bactérie ne devient pathogène que dans certaines conditions, par exemple quand un individu est fragilisé [16].

b) Caractères bactériologiques

Sur les milieux classiques gélosés d'isolement d'Entérobactéries (Hektoen, Mac Conkey), les colonies de *K. pneumoniae* sont volumineuses : de 3 à 4 mm de diamètre, bombées, muqueuses, parfois filantes à l'anse de platine.

Sur milieu liquide (bouillon nutritif, eau peptonée), la culture est rapide : quelques heures à 30 et 37 °C. On note la formation d'un trouble dense avec collerette visqueuse en surface. Sous microscope, *Klebsiella* est Gram négatif, immobile, encapsulée et très polymorphe [7].

c) Caractères biochimiques

Les principaux caractères de *K. pneumoniae* se présentent comme suit :

Gaz	Lactose	Urée	Indole	VP	ODC	ONPG
+	+	+	-	+	-	+

d) Pouvoir pathogène

Klebsiella pneumoniae est responsable d'infections communautaires et d'infections nosocomiales. Parmi les infections communautaires, *K. pneumoniae* est responsable d'infections bronchopulmonaires incluant les pneumonies lobaires nécrosantes et les abcès pulmonaires. Cette espèce est également responsable d'infections urinaires et digestives, ainsi que de bactériémies et d'infections neuroméningées post-traumatiques ou post-chirurgicales. Isolée surtout dans le service de réanimation, elle représente 10% des infections hospitalières [16].

e) Résistance aux antibiotiques

- Résistance naturelle

Klebsiella pneumoniae est naturellement résistante à l'aminopénicilline (l'ampicilline, amoxicilline) et à la carboxypénicilline (carbénicilline, ticarcilline) par production d'une bêta-lactamase de classe A d'espèce chromosomique appelée K2, inhibée par l'acide clavulanique. Elle est sensible aux antibiotiques actifs sur les bactéries Gram négatifs. Donc elle confère une résistance à l'ensemble des bêta-lactamines. Ce mécanisme de résistance varie entre 5 % et 40 % en fonction des centres hospitaliers [34].

- Résistance acquise

De nombreuses souches de *Klebsiella pneumoniae* sont productrices de bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE).

Klebsiella pneumoniae rencontrée des bêta-lactamases plasmidiques qui dérivent des céphalosporinases chromosomiques.

La résistance aux céfépime, cefpirome ainsi qu'à l'imipénème est récemment décrite chez *K. pneumoniae*. La résistance à l'imipénème peut être due à l'association d'une imperméabilité de la membrane externe et à une production de haut niveau d'une bêta-lactamase plasmidique [34].

MATERIEL ET METHODES

1. LIEU DE TRAVAIL

Nous avons réalisé notre travail au niveau des laboratoires d'analyses médicales Lina (Casbah) et El-Mahmoudi (Ali Mendjli) à Constantine.

2. DURÉE DE L'ÉTUDE

Notre stage a été effectué durant la période de 5 semaines. Notre étude a porté sur 142 examens cytot bactériologiques des urines (ECBU).

3. PRELEVEMENT

Les urines sont recueillies de la première miction du matin en évitant la contamination de l'urine par les germes de l'environnement et en désinfection locale avec une solution antiseptique.

Les premières gouttes d'urine seront éliminées et les 20 à 50 ml suivants seront recueillis dans un pot stérile.

Chez la femme, le recueil se fait, si possible, en dehors des périodes menstruelles ou d'infection vaginale.

Chez le nourrisson, après désinfection locale, le prélèvement se fait par la pose d'une poche collectrice stérile adhésive maintenue en place pendant moins d'une heure.

Le nom et le prénom sont notés sur le flacon gardé au frais avant de l'amener au laboratoire.

4. MATERIEL

Matériel biologique

- Echantillons d'urine.
- Souches bactériennes isolées à partir des prélèvements urinaires.

Appareillage et petit matériel

- Microscope optique.
- Etuve réglée à 37°C.
- Vitek 2 compact avec ses instruments (automate).

- Tubes d'écouvillons (écouvillons livrés sous tube plastique avec étiquette de marquage disponibles avec tige en bois, en plastique, en aluminium ou papier avec embout pointe synthétique ou naturelle et stérile).
- Densichek Plus : un densimètre qui vérifie la densité de l'inoculum.
- Carte d'identification : c'est une carte pour faire l'identification, elle est spécifique de Vitek 2 compact.
- Cassette : c'est un portoir pour les tubes de Vitek 2 compact.
- Disques d'antibiogramme.
- Système API 10 S.

Milieux de culture

- Boîtes de Pétri à trois compartiments prêtes à l'emploi à triple usage comportant les géloses de Mac Conkey, de Chapman et au chocolat.
- Gélose nutritive.
- Milieu de Mueller Hinton.
- Milieu TSI.
- Milieu Urée Indole.

5. METHODES

5.1 Au niveau des moyens classiques

L'infection urinaire est actuellement définie par la présence de bactéries (généralement des *Enterobacteriaceae*) dans les urines qui, normalement, sont stériles. L'infection des voies urinaires se fait presque toujours par voie ascendante et par des bactéries commensales de l'intestin [14].

5.1.1. Examen cyto bactériologique des urines (ECBU)

C'est un examen microbiologique qui permet à la fois de diagnostiquer une infection urinaire en identifiant le germe responsable et d'aider à choisir le meilleur traitement.

C'est l'examen le plus demandé en pratique médicale et son interprétation est relativement facile, en théorie.

Un manque de rigueur dans les étapes de sa réalisation peut néanmoins conduire à des résultats de qualité assez moyenne et, par conséquent, peu fiables [14].

Généralement l'ECBU débute par l'examen microscopique et se poursuit par l'examen macroscopique.

- **Examen microscopique**

L'examen cytot bactériologique des urines est un examen microbiologique qui permet à la fois de diagnostiquer une infection urinaire en examinant la forme (cocci, bacillaire) et la mobilité des germes donc de les identifier de façon précise (examen bactériologique) et de déterminer aussi la présence de leucocytes, d'hématies, de cristaux et de levures (examen cytologique) [14].

A partir d'une culture, l'examen à l'état frais se pratique sur les cultures en milieu liquide (en milieu solide, la mobilité s'exprime mal et de façon aléatoire).

L'examen direct est réalisé par une homogénéisation à l'aide du vortex de l'échantillon d'urine puis dépôt d'une goutte à l'aide d'une pipette Pasteur sur une lame de verre bien propre, recouverte par une lamelle en partant d'une position inclinée à 45°, le liquide ne doit pas déborder. L'observation se fait au grossissement 10 x 40.

Les différents éléments qui peuvent exister dans les urines sont:

- les hématies (globules rouges) : normalement l'urine ne doit pas contenir d'hématies.
- les leucocytes (globules blancs) : la présence de nombreux leucocytes, notamment en amas indique, généralement, une infection des voies urinaires.
- les levures : elles accompagnent parfois la présence de glucose dans les urines (la fraîcheur de celles-ci doit être vérifiée) de cellules épithéliales, de cristaux, de cylindres et de germes (soit des formes cocci, soit bacillaires) [5].

- **Examen macroscopique après culture**

Cet examen permet de déterminer la forme, le relief, la consistance et l'aspect des colonies sur boîte de Pétri à l'œil nu.

Dans cet examen le milieu de culture GN (gélose nutritive) a été utilisé pour les bactéries non exigeantes, et l'ensemencement est fait à l'aide de l'anse calibrée de 10 µl par stries serrées sur la gélose nutritive, ensuite les boîtes ensemencées sont incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

La lecture se fait par l'observation des boîtes à l'œil nu.

En cas d'observation de deux types de germes (bacilles et cocci), les milieux utilisés pour l'isolement de ces germes sont les géloses de Mac Conkey, de Chapman et au chocolat sur une boîte de Pétri de trois compartiments.

Le milieu de Mac Conkey contient deux inhibiteurs de la flore Gram positive, les sels biliaires et le cristal violet qui permettent, en plus des bactéries à Gram positives, l'inhibition du développement en nappe des *Proteus*.

Le milieu de Chapman est utilisé pour l'isolement des *Staphylococcus* ; il inhibe la grande majorité des autres bactéries

Le milieu au chocolat permet la culture des bactéries exigeantes et des bactéries non exigeantes.

L'isolement est effectué sur les boîtes de Pétri par la méthode des stries serrées. Celles-ci sont incubées 18 à 24 heures à 37 °C.

5.1.2. Identification

a) Galerie biochimique

- Préparation de la suspension bactérienne

A l'aide d'une anse de platine bien stérile une colonie isolée est prélevée puis déposée dans un tube à essais contenant de l'eau distillée ; cette suspension est homogénéisée.

Les différents tests pratiqués avec la galerie biochimie classique sont représentés dans les tableaux suivants :

Tableau 2 : Test d'urée-indole.

Technique	Caractères recherchés	Résultat	
- Ce test permet d'hydrolyser l'urée. - Une suspension est réalisée en milieu urée-indole. - Incubation à 37°C pendant 24 heures.	-uréase -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 anneau coloré en rouge.	Formation d'un anneau rouge : indole+	Absence d'anneau rouge : indole-
			

Tableau 3 : Test TSI.

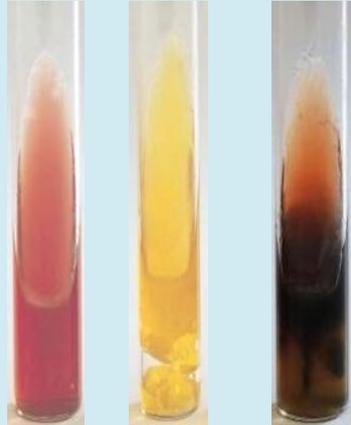
Principe	Technique	Résultats
<p>La gélose TSI permet l'identification des Entérobactéries par la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose, du saccharose et de la production de sulfure d'hydrogène H₂S.</p>	<p>- La surface est abondamment ensemencée à la surface par stries serrées ou par inondation, puis le culot par simple piqûre, à l'aide de la même pipette boutonnée. Il est important de ne pas oublier de dévisser partiellement le bouchon afin de permettre les échanges gazeux.</p>	 <p>Glu - Glu + Glu + Lac /Sac - Lac /Sac - Lac /Sac - H₂S - H₂S - H₂S + Gaz - Gaz + Gaz +</p>

Tableau 4 : Test ONPG.

Technique	Caractères recherchés	Résultats	
<ul style="list-style-type: none"> - L'otonitrophényl-galacto-pyranoside (ONPG) est utilisée ; - Une suspension épaisse de bactéries est réalisée en eau distillée. - Un disque d'ONPG est déposé dans cette suspension. - Incubation 30 min à 37°C puis lecture. 	<ul style="list-style-type: none"> - une bêta-galactoside perméase qui permet au lactose de pénétrer dans la bactérie. - une bêta-galactosidase qui catalyse l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose. 	<p>-Milieu jaune : ONPG +</p> 	<p>-Milieu sans couleur : ONPG-</p> 

b) Galerie API 10 S

La galerie API 10 S est un système standardisé pour l'identification des bactéries selon les caractères biochimiques.

Elle comporte 10 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue en consultant la liste de profils à l'aide du logiciel d'identification.

- Préparation de l'inoculum

Une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé est prélevée à l'aide d'une pipette, les cellules jeunes (18 à 24 heures) sont préférentiellement utilisées.

La suspension bactérienne est soigneusement homogénéisée dans le milieu. Elle doit être utilisée extemporanément.

- Inoculation de la galerie

A l'aide d'une pipette, 1 à 4 colonies morphologiquement identiques sont prélevées et mises en suspension dans de l'eau physiologique.

Les tubes des tests (et non les cupules) sont remplis avec la suspension précédente pour éviter la formation de bulles d'air au fond des tubes. La pointe de la pipette est posée sur le côté de la cupule en inclinant légèrement la boîte chargée de la suspension bactérienne vers l'avant.

Les tubes et cupules des tests qui portent un cadre tels que GLU ont été remplis avec la suspension et les cupules des tests soulignés tels que ADH et URE ont été remplis aussi avec la suspension sur laquelle a été ajoutée une couche d'huile de paraffine (anaérobiose).

Il faut remplir la boîte d'incubation des tubes des tests avec un peu d'eau pour éviter la dessiccation lors de l'incubation à 35°C pendant 24 heures.

Après incubation, la galerie sera lue et les résultats comparés au tableau de lecture.

Sur la fiche de résultats sont notées toutes les réactions spontanées ou révélées par l'addition des réactifs.

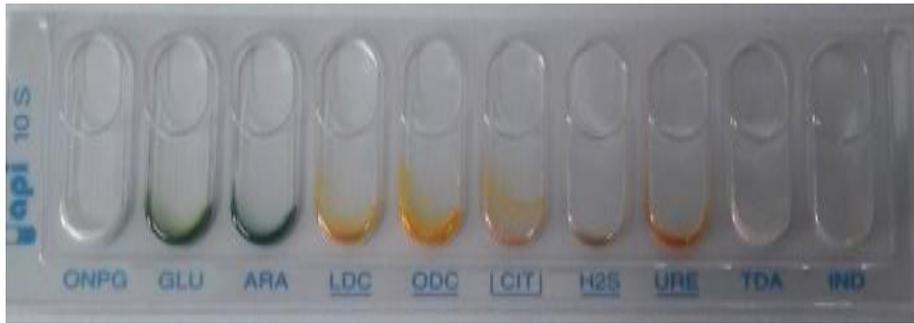


Figure 3 : Galerie API 10 S avant l'utilisation.

c) Antibiogramme

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une bactérie vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques.

Le principe consiste à placer la culture de bactéries en présence des antibiotiques et à observer les conséquences sur le développement et la survie de celle-ci.

Il existe trois types d'interprétation selon le diamètre du cercle qui entoure le disque d'antibiotique : souche ou bactérie sensible, intermédiaire ou résistante.

La gélose de Mueller Hinton est un milieu de base qui permet la réalisation de l'antibiogramme standard. Elle est coulée en boîtes de Pétri.

La surface de la gélose est séchée pendant 15 minutes à 37°C.

L'inoculum est préparé à l'aide de 3 à 5 colonies isolées et prélevées puis mises dans un tube qui contient du bouillon nutritif. Ce dernier est étuvé pendant 30 min puis une goutte d'inoculum est homogénéisée dans un tube contenant de l'eau physiologique.

L'ensemencement se fait :

- par inondation : l'inondation se fait avec 5 ml de la suspension sur la gélose de Mueller Hinton, laissée en contact 30 secondes puis mise à sécher 15 minutes à 37°C.
- par écouvillonnage (méthode de Kirby) : le milieu est ensemencé par stries très serrées en 3 passages en faisant pivoter de 60°.

Les disques d'antibiotiques sont déposés sur la gélose avec une pince métallique stérile. Les boîtes sont incubées 24 h à 37°C.

La lecture doit se faire dans les délais recommandés : 18 à 24 heures pour la méthode par diffusion pour les bactéries de croissance rapide et 2 à 3 jours pour les espèces de croissance difficile.

La zone d'inhibition circulaire est mesurée par le diamètre en millimètres selon divers moyens (règle, compas ou pied à coulisse).

Il sera possible de calculer la CMI (mg/l) de l'antibiotique c'est-à-dire la concentration minimale inhibitrice pour la souche examinée en reportant ce diamètre sur une courbe de concordance, préétablie à l'avance avec une centaine de souches (échantillonnage) de sensibilités différentes.

5.2. Au niveau des moyens automatisés

- Préparation de la suspension bactérienne

La préparation de l'inoculum est toujours manuelle :

- deux tubes secs contenant 3ml de solution saline sont utilisés l'un pour l'identification et l'autre pour l'antibiogramme.
- avec une pipette, les colonies isolées sont sélectionnées et mises en suspension homogène dans les tubes précédents et bien mélangées avec le vortex.

Cette suspension bactérienne est standardisée selon les méthodes appropriées en utilisant le Densichek Plus.

Le volume de l'inoculum doit être de 0,5 à 0,63 Mac Farland pour les bactéries Gram négatives.

- Une carte d'identification et une autre d'antibiogramme, sont placées sur la cassette en plongeant les pailles de transfert dans les tubes contenant la suspension mère.
- Fermeture de la porte après le chargement de la cassette dans l'instrument (chambre d'inoculation).
- Le bouton « lancer le remplissage » est actionné ; un voyant lumineux indique au bout de 70 secondes que le cycle de remplissage est terminé.
- La cassette est retirée de la chambre d'inoculation puis placée à l'intérieur du lecteur-incubateur (dans un délai maximum de 10 minutes).
- Un voyant lumineux indique que le chargement des cartes est terminé. La cassette vide est retirée du lecteur-incubateur.
- L'instrument lit les codes à barres des cartes et de la cassette et envoie automatiquement les informations au logiciel.

Tableau 5 : Conditions de culture et d'incubation des souches destinées à l'identification et à l'antibiogramme sur Vitek 2 Compact.

Cartes Vitek	Milieu de culture validé	Age de la culture	Conditions d'incubation
Bacilles Gram négatifs	- Gélose Trypticase Soja - Gélose au sang - Gélose de Mac Conkey	18-24 h	35-37°C, aérobiose
Cocci Gram positifs	- Gélose Trypticase Soja - Gélose au sang	12-48 h	35-37°C, aérobiose

La lecture des résultats se fait par un logiciel associé à la machine Vitek 2 compact. Les résultats sortent sous la forme d'un tableau imprimé par l'ordinateur de Vitek.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS

1. OBSERVATION MICROSCOPIQUE

Notre examen de l'urine entre lame et lamelle à l'objectif x 40 a permis l'observation de leucocytes, d' hématies, de cristaux et de quelque germes en forme de cocci ou de bacilles.

2. IDENTIFICATION DE SOUCHES ISOLEES SUR LA GELOSE NUTRITIVE

2.1. Observation macroscopique

Différents caractères cultureux ont été observés après 24 heures d'incubation à 37°C sur la gélose nutritive (Tableau 6).

Tableau 6 : Caractères cultureux sur la gélose nutritive.

Caractères cultureux	Forme	Relief	Transparence	Surface	Consistance	Pigments
Résultats	ronde	bombée	opaque	lisse, brillante	crémeuse	non pigmentée

2.2. Identification par la galerie biochimique classique

Le Tableau 7 montre l'identification de microorganismes préalablement isolés et caractérisés en milieu gélose nutritive à l'aide des tests biochimiques : Urée, Indole, TSI et ONPG.

Tableau 7 : Caractères biochimiques par la galerie classique.

Caractères	Urée -Indole		TSI				ONPG
	Urée	Indole	Glu	Lac-Sac	Gaz	H ₂ S	
Résultats	-	+	+	+	+	-	+

Le signe (+) : signifie que la réaction du test a été positive.

Le signe (-) : signifie que la réaction du test a été négative.

2.3. Identification par la galerie API 10 S

Après incubation, nous avons obtenu les résultats suivants avec la galerie API 10S (Tableau 8) :

Tableau 8 : Caractères biochimiques à partir de la galerie API 10 S.

Tests	ONPG	GLU	ARA	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND
Résultats	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+

A partir des techniques classiques utilisées, il ressort que la souche bactérienne responsable de l'infection urinaire est *Escherichia coli*.

3. IDENTIFICATION DES SOUCHES ISOLEES SUR LES MILIEUX DE MAC CONKEY, CHAPMAN ET AU CHOCOLAT

3.1. Observation macroscopique

Après ensemencement sur les trois milieux de Mac Conkey, de Chapman et au chocolat et incubation à l'étuve à 37°C, nous avons observé au bout de 24 heures la formation de colonies sur les milieux de Mac Conkey et au chocolat mais aucune pousse sur le milieu de Chapman (Figure 4 et Tableau 9).

Tableau 9 : Caractères cultureux sur les deux milieux de Mac Conkey et au chocolat.

Caractères cultureux	Forme	Relief	Transparence	Surface	Consistance	Pigment
Résultats	ronde	bombée	opaque et souvent confluyente	lisse	muqueuse	non pigmentée



Figure 4: Formation de colonies sur les deux géloses Mac Conkey et au chocolat.

3.2. Identification par la galerie biochimique classique

L'identification des microorganismes préalablement isolés et caractérisés sur les milieux de Mac Conkey et au chocolat a été suivie par des tests biochimiques (Tableau 10).

Tableau 10 : Caractères biochimiques à partir de la galerie classique.

Caractères	Urée Indole		TSI				ONPG
	Urée	Indole	Glu	Lac-Sac	Gaz	H ₂ S	
Résultats	-	-	+	+	+	-	+

Le signe (+) signifie que la réaction du test a été positive.

Le signe (-) signifie que la réaction du test a été négative.

3.3. Identification par la galerie API 10 S

Après la période d'incubation, les résultats obtenus ont été consignés dans le Tableau 11 :

Tableau 11 : Caractères biochimiques à partir de la galerie API 10 S.

Tests	ONPG	GLU	ARA	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND
Résultats	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-

Ces différents caractères montrent que la souche isolée est *Klebsiella pneumoniae*.

4. DISTRIBUTION GLOBALE DES SOUCHES ISOLEES

Sur les 142 échantillons (Figure 5 et Tableau 12) :

- 20 cas se sont révélés positifs, soit 14,1 %.
- 118 cas se sont montrés négatifs, soit 83,0 % et 2,81 % des cas sont jugés contaminés suite à un mauvais prélèvement ou ensemencement.

Tableaux 12 : Distribution des souches selon les cas d'ECBU.

Cas d'ECBU	ECBU positif	ECBU négatif	ECBU contaminé	Total
Nombre de cas	20	118	4	142
Pourcentage	14 ,1	83,09	2,81	100

Toutes les études s'accordent pour mentionner *Escherichia coli* comme première cause des infections urinaires (Figure 6 et Tableau 13).

Viennent ensuite à des fréquences et dans des proportions variables selon les études les autres Entérobactéries : *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* et également d'autres bacilles Gram négatifs tel que *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau 13 : Fréquence des bactéries isolées.

Espèces	Nombre	%
<i>Escherichia coli</i>	15	75
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	15
Autres espèces	2	10
Total	20	100

5. DISTRIBUTION DES SOUCHES SELON L'ESPECE

Sur les 137 échantillons (Figure 7 et Tableau 14) :

- 15 cas se sont révélés positifs, soit 10,94%.

- 118 cas se sont montrés négatifs, soit 86,13% et 2,91% des cas sont jugés contaminés suite à un mauvais prélèvement ou ensemencement.

Tableau 14 : Distribution d'*Escherichia coli*.

Espèce	Positive	Négative	Contaminée	Total
<i>E. coli</i>	15	118	4	137
Pourcentage	10,94	86,13	2,91	100

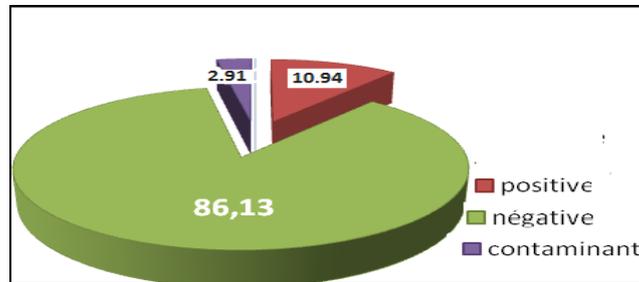


Figure 7 : Distribution d'*Escherichia coli*.

Sur les 125 échantillons (Figure 8 et Tableau 15) :

- 3 cas se sont révélés positifs, soit 2,4%.
- 118 cas se sont montrés négatifs soit 94,4% et 3,2% des cas sont jugés contaminés suite à un mauvais prélèvement ou ensemencement.

Tableau 15 : Distribution de *Klebsiella pneumoniae*.

Espèce	Positive	Négative	Contaminée	Total
<i>K. pneumoniae</i>	3	118	4	125
Pourcentage	2,4	94,4	3,2	100

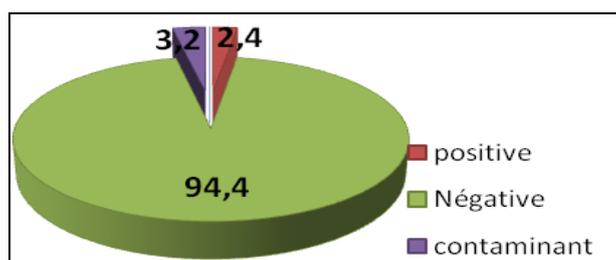


Figure 8 : Distribution de *K. pneumoniae*.

6. ETUDE DE LA SENSIBILITE ET DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DES SOUCHES ISOLEES

6.1. Profil de résistance des souches d'*Escherichia coli*

La souche *Escherichia coli* (15%) est résistante à l'amoxicilline, à l'amoxicilline + acide clavulanique, à la ticarcilline et à la céfazoline.

La souche *E. coli* est sensible à la céfoxitine, la céfotaxime, l'imipénème, l'acide nalidixique, la ciprofloxacine, l'amikacine, la gentamycine haute charge, la colistine et le cotrimoxazole (Figure 9 et Tableau 16).

Tableau 16 : Résistance et sensibilité d'*E. coli* aux antibiotiques.

Famille	Antibiotiques	Interprétation	
		Résistance	Sensibilité
Bêta-lactamines	Amoxicilline	100%	0%
	Amoxicilline + acide clavulanique	100%	0%
	Ticarcilline	100%	0%
	Céfazoline	100%	0%
	Céfoxitine	0%	100%
	Céfotaxime	0%	100%
	Imipénème	0%	100%
Quinolones	Acide nalidixique	0%	100%
	Ciprofloxacine	0%	100%

Aminosides	Amikacine	0%	100%
Aminosides	Gentamycine haute charge	0%	100%
Polymyxines	Colistine	0%	100%
Mixte entre sulfamides et diaminopyrimidine	Cotrimoxazole	0%	100%

6.2. Profil de résistance des souches de *Klebsiella pneumoniae*

La souche *Klebsiella pneumoniae* est résistante à l'amoxicilline, à l'amoxicilline + acide clavulanique, à la ticarcilline, à la céfazoline et au cotrimoxazole.

La souche *K. pneumoniae* est sensible à la céfoxitine, à la céfotaxime, à l'imipénème, à l'acide nalidixique, à la ciprofloxacine, à l'amikacine, à la gentamicine haute charge, à la colistine et au cotrimoxazole (Figure 10 et Tableau 17).

Tableau 17 : Résistance et sensibilité de *K. pneumoniae* aux antibiotiques.

Famille	Antibiotiques	Interprétation	
		Résistance	Sensibilité
Bêta-lactamines	Amoxicilline	100%	0%
	Amoxicilline + acide clavulanique	100%	0%
	Ticarcilline	100%	0%
	Céfazoline	100%	0%
	Céfoxitine	0%	100%
	Céfotaxime	0%	100%
	Imipénème	0%	100%
Quinolones	Acide nalidixique	0%	100%
	Ciprofloxacine	0%	100%
Aminosides	Amikacine	0%	100%
Aminosides	Gentamicine haute charge	0%	100%
Polymyxines	Colistine	0%	100%
Mixte entre sulfamides et diaminopyrimidine	Cotrimoxazole	100%	0%

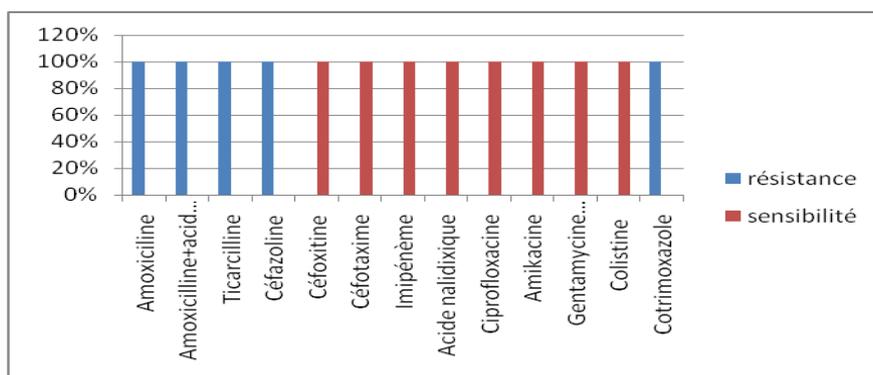


Figure 10 : Profil de résistance et sensibilité de *K. pneumoniae* aux antibiotiques.

7. Identification et antibiogramme des souches étudiées par Vitek 2 compact

Les résultats d'identification et d'antibiogramme par Vitek 2 compact sont affichés avec le logiciel lié à l'automate sur des rapports du laboratoire dont :

- *Escherichia coli*

- La souche *Escherichia coli* est résistante à l'ampicilline et à la ticarcilline, sensible à la pipéracilline /tazobactam, au céfotaxame, à l'ertapénème, à l'imipénème, à la gentamicine, à la tobramycine, à l'acide nalidixique, à la céfoxitine, à la céfotaxime, à la céfotazidime, à la ciprofloxacine, à l'ofloxacine, à la nitrofurantine, à la triméthoprim /sulfaméthoxazole et elle est intermédiaire à l'amikacine (Figures 11 et 12 et Tableau 11).

Tableau 18 : Résistance et sensibilité d'*E. coli* (Vitek 2 compact).

Antibiotiques	Interprétation		
	Résistance	Intermédiaire	Sensibilité
Ampicilline	100%	0 %	0 %
Ticarcilline	100%	0 %	0 %
Pipéracilline/tazobactam	0 %	0 %	100 %
Céfalotine	0%	0 %	100 %
Ertapénème	0%	0 %	100 %
Imipénème	0%	0 %	100 %
Amikacine	0%	0 %	100 %
Gentamicine	0%	0 %	100 %
Tobramycine	0%	0 %	100 %
Acide Nalidixique	0%	0 %	100 %
Ciprofloxacine	0%	0 %	100 %
Ofloxacine	0%	0 %	100 %
Nitrofurantïne	0%	0 %	0 %
Triméthoprim/Sulfaméthoxazole	0 %	0 %	100 %
Amikacine	0 %	0 %	100 %
Céfoxitine	0 %	0 %	100 %
Céfotaxime	0 %	0 %	100 %
Céfotazidime	0 %	0 %	100 %
Amoxicilline + acide clavulanique	0 %	100 %	0 %

Figure 11 : Profil de résistance et sensibilité d' *E. coli* aux antibiotiques (Vitek 2 compact).

Laboratoire d'Analyses Médicales LINA

Rapport du laboratoire

Imprimé 1 avr. 2015 10:12 WAT
Imprimé par : LabTech

N° Client bioMérieux :
Référence du système :

Paillasse : ECBU

Groupe d'isolats : Cherqui yasmina(sali-1)
Profil biochimique : 0405610540424610
Germe sélectionné : Escherichia coli

Commentaires :						
Informations sur l'identification	Carte :	GN	N° de lot :	241318940	Péremption :	7 sept. 2015 12:00 WAT
	Terminée le :	31 mars 2015 15:28 WAT	État :	Final	Heure de l'analyse :	5,00 heures
Germe sélectionné	97% de probabilité Profil biochimique : 0405610540424610			Escherichia coli		Fiabilité : Excellente identification
Germe SRF						
Germes identifiés et tests discriminants :						
Commentaire sur l'ident. :						
Tests à l'encontre Escherichia coli PHOS(81).						

Résultats Antibiogramme	Carte :	AST-N233	N° de lot :	633330210	Péremption n° :	29 déc. 2015 12:00 WAT
	Terminé le :	31 mars 2015 18:43 WAT	État :	Final	Heure de l'analyse :	8,25 heures
	Antibiotique	CMI	Interprétation	Antibiotique	CMI	Interprétation
	Ampicilline	>= 32	R	Imipénème	<= 0,25	S
	Amoxicilline/acide clavulanique	16	I	Amikacine	<= 2	S
	Ticarcilline	>= 128	R	Gentamicine	<= 1	S
	Pipéracilline/tazobactam	<= 4	S	Tobramycine	<= 1	S
	Céfalotine	8	S	Acide nalidixique	<= 2	S
	Céfoxitine	<= 4	S	Ciprofloxacine	<= 0,25	S
	Céfotaxime	<= 1	S	Ofloxacine	<= 0,25	S
	Ceftazidime	<= 1	S	Nitrofurantoïne	<= 16	S
	Ertapénème	<= 0,5	S	Triméthoprim/sulfaméthoxazole	<= 20	S

+= Antibiotique déduit * = Modification AES ** = Modification Utilisateur

Figure 12: Rapport de laboratoire de l'automate Vitek 2 compact d' *E. coli*.

- *Klebsiella pneumoniae*

- La souche de *K. pneumoniae* est résistante à l'ampicilline, à l'amoxicilline + acide clavulanique, à la ticarcilline, au céfalotine, au céfotaxime, à la ceftazidime, à l'amikacine, à la gentamicine, au tobramycine, à l'acide nalidixique, au ciprofloxacine, au nitrofurantoïne et à l'association triméthoprim/sulfaméthoxazole. Elle est sensible à la céfoxitine, à l'ertapénème et l'imipénème et elle est affichée intermédiaire à l'ofloxacine (Figures 13 et 14 et Tableau 19).

Tableau 19 : Résistance et sensibilité de *K. pneumoniae* (Vitek 2 compact).

Antibiotiques	Interprétation		
	Résistance	Intermédiaire	Sensibilité
Ampicilline	100%	0 %	0 %
Amoxicilline + acide clavulanique	100%	0 %	0 %
Ticarcilline	100 %	0 %	0 %
Pipéracilline/tarzobactam	100%	0 %	0 %
Céfalotine	100%	0 %	0 %
Imipénème	0%	0 %	100 %
Amikacine	100%	0 %	0 %
Gentamicine	100%	0 %	0 %
Tobramycine	100%	0 %	0 %
Acide Nalidixique	100%	0 %	0 %
Ciprofloxacine	100%	0 %	0 %
Ofloxacine	0%	100 %	0 %
Nitrofurantoïne	100%	0 %	0 %
Céfoxitine	0 %	0 %	100 %
Céfotaxime	100 %	0 %	0 %
Céftazidime	100 %	0 %	0 %
Ertapénème	0 %	0 %	100 %
Triméthoprime/Sulfaméthoxazole	100 %	0 %	0 %

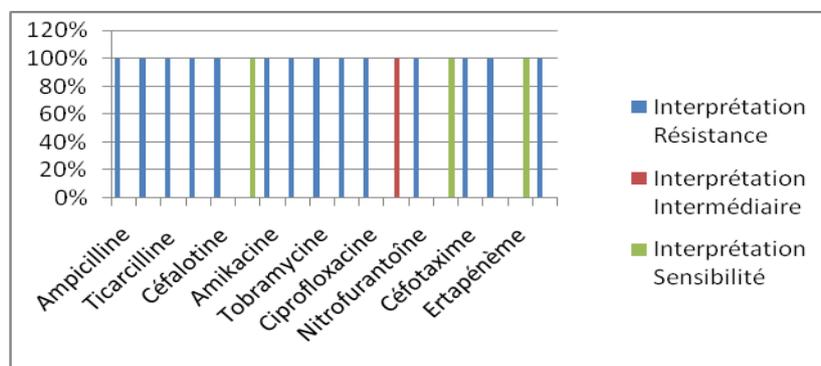


Figure 13 : Profil de résistance et sensibilité de *K. pneumoniae* aux antibiotiques (Vitek 2 compact).

Laboratoire d'Analyses Médicales LINA

Rapport du laboratoire

N° Client bioMérieux :
Référence du système :

Imprimé 21 juin 2015 10:06 WAT
Imprimé par : LabTech

Groupe d'isolats : Matmati Mohamed (GP)-1
Paillassé : ECBU

Profil biochimique : 6607735553765012
Germe sélectionné : *Klebsiella pneumoniae* ssp *pneumoniae*

Commentaires :					
----------------	--	--	--	--	--

Informations sur l'identification	Carte :	GN	N° de lot :	241325240	Péréemption :	9 nov. 2015 12:00 WAT
	Terminée le :	18 juin 2015 18:01 WAT	État :	Final	Heure de l'analyse :	7,75 heures
Germe sélectionné	94% de probabilité <i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i>					
Profil biochimique :	6607735553765012				Fiabilité :	Très bonne identification
Germe SRF						
Germes identifiés et tests discriminants :						
Commentaire sur l'ident. :						
Tests à l'encontre <i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> URE(76),AGLU(1).						

Résultats AntibioGramme	Carte :	AST-N233	N° de lot :	633343140	Péréemption :	6 mai 2016 12:00 WAT
	Terminé le :	18 juin 2015 21:16 WAT	État :	Final	Heure de l'analyse :	11,00 heures
	Antibiotique	CMI	Interprétation	Antibiotique	CMI	Interprétation
	Ampicilline	>= 32	R	Impénème	1	S
	Amoxicilline/acide clavulanique	>= 32	R	Amikacine	>= 64	R
	Ticarcilline	>= 128	R	Gentamicine	>= 16	R
	Pipéracilline/tazobactam	>= 128	R	Tobramycine	>= 16	R
	Céfalotine	>= 64	R	Acide nalidixique	>= 32	R
	Céfoxitine	<= 4	S	Ciprofloxacine	>= 4	R
	Céfotaxime	>= 64	R	Ofloxacine	4	I
	Ceftazidime	>= 64	R	Nitrofurantoïne	256	R
	Ertapénème	1	S	Triméthoprine/sulfaméthoxazole	>= 320	R

+ = Antibiotique déduit * = Modification AES ** = Modification Utilisateur

Figure 14 : Rapport de laboratoire de l'automate Vitek 2 compact de *K. pneumoniae*.

DISCUSSION

1. AU NIVEAU DES MOYENS CLASSIQUES

1.1. Identification des souches isolées

A partir des résultats d'ECBU obtenus par les moyens classiques, on a constaté que :

- d'après l'examen microscopique, les ECBU positifs sont caractérisés par la présence significative de leucocytes, de cristaux, de levures et de bactéries :
- la présence de leucocytes dans les urines signe l'existence d'une réaction inflammatoire.
- les cristaux observés peuvent correspondre à un constituant normal de l'urine ou bien à un métabolite anormal dont elle est physiologiquement dépourvue. L'examen macroscopique sur

gélose a confirmé la présence de bactéries dont on peut déterminer tous les caractères culturels (Figure 4).

Les tests biochimiques classiques et la galerie API 10 S ont déterminé les différents caractères biochimiques des bactéries inconnues étudiées et identifiées (Tableaux 7, 8, 10 et 11) par comparaison avec les caractères biochimiques de souches connues.

La répartition des souches montre qu'*E. coli* enregistre la fréquence la plus élevée parmi les souches isolées avec une fréquence de 75%, suivie par *K. pneumoniae* avec 15%, puis par les autres espèces bactériennes avec 10%.

Ces résultats concordent bien avec ceux obtenus dans la littérature [MANSOUR *et al*, 2009 ; BEN HAJ KHLIFA *et al*, 2010 ; ABHIJIT *et al*, 2013]. Ces chercheurs rapportent une prédominance d'*E. coli*, suivie par *K. pneumoniae*, suivie par d'autres germes.

Donc on constate que l'identification des bactéries par les moyens classiques permet au biologiste ou au technicien de laboratoire de déterminer les différents caractères morphologiques, culturels et biochimiques des bactéries inconnues et aussi de faire toutes les statistiques des résultats obtenus c'est-à-dire les calculs des résultats positifs, négatifs et contaminants la répartition des souches isolées selon l'espèce (Tableau 13).

1.2. Antibiogramme

Les souches d'*E. coli* sont à 100% résistantes à l'amoxicilline, à l'amoxicilline + acide clavulanique, à la ticarcilline et à la céfazoline.

Le céfoxitine, le céfotaxime, l'imipénème, l'acide nalidixique, le ciprofloxacine, l'amikacine, la colistine et la gentamicine haute charge ont une excellente activité car les souches y sont sensibles à 100 %.

Nos résultats sont proches de ceux obtenus par HAMDAN *et al*, 2011 à l'hôpital d'Elkhartoum (Soudan); mais s'éloignent des résultats rapportés par TAZBEW *et al*, 2012, où *E. coli* présente une résistance à l'amoxicilline de 75% et 60% consécutivement.

Dans notre étude ; le céfotaxime, l'imipénème et le ciprofloxacine appartenant à la classe des bêta-lactamines et des quinolones constituent les antibiotiques de choix dans le traitement d'*E. coli*.

Les souches de *K. pneumoniae* sont résistantes aussi à l'amoxicilline, l'amoxicilline + acide clavulanique, la ticarcilline et la cefazoline ce qui se rapproche de l'étude menée par HAMDAN et al, 2011 qui montre des résistances importantes des souches de *K. pneumoniae* aux bêta-lactamines, à l'amoxicilline et à l'amoxicilline + acide clavulanique.

Les antibiotiques utilisés pour traiter l'infection urinaire à *K. pneumoniae* sont ceux appartenant à la famille des bêta-lactamines (céfotaxime, céfoxitine et imipénème), les aminosides (amikacine) ainsi que les quinolones (ciprofloxacine).

On remarque que l'antibiogramme par la méthode de diffusion en gélose utilisant des disques chargés d'antibiotiques est une excellente méthode, mais nécessite une bonne standardisation. Il faut faire très attention aux principaux pièges de cette méthode qui sont la densité de l'inoculum et la bonne conservation des disques, en particulier pour les bêta-lactamines.

2. AU NIVEAU DES MOYENS AUTOMATISES (VITEK 2 COMPACT)

Les résultats d'identification et d'antibiogramme par Vitek 2 compact sont tout deux obtenus sur une fiche technique imprimée automatiquement avec l'ensemble des paramètres du malade.

L'automate Vitek 2 compact affiche l'espèce de la souche inconnue ainsi que le profil de résistance et de sensibilité de cette souche aux antibiotiques testés.

Il utilise 18 antibiotiques pour chaque souche étudiée. Par contre, l'antibiogramme classique utilise moins de 18 antibiotiques soit 13 à 15 antibiotiques.

Les résultats d'antibiogramme classique et automatisé d'*E. coli* montrent un profil de résistance globalement identique. On note, cependant une seule différence au niveau de l'antibiotique amoxicilline + acide clavulanique : l'antibiogramme classique conclue qu'*E. coli* est résistante à ce couple d'antibiotiques. Par contre, l'automate affiche que sa résistance est intermédiaire.

Les résultats concernant les autres antibiotiques sont identiques dans les deux moyens d'étude utilisés.

Mais l'automate utilise d'autres antibiotiques que ceux utilisés dans les méthodes classiques comme l'ertapénème, la tobramycine, l'acide nalidixique, l'ofloxacine, le nitrofurantoïne et la triméthoprine/sulfaméthoxazole. Ces antibiotiques manifestent une bonne activité sur *E. coli*.

Concernant *K. pneumoniae* les résultats d'antibiogramme par Vitek 2 compact sont regroupés dans le Tableau 19 et la Figure 14 qui indique le profil de résistance et de sensibilité aux antibiotiques testés, qui sont complètement différents de ceux obtenus par la méthode classique.

Ainsi, elle est résistante à la céfotaxime, l'amikacine, la gentamicine et à l'acide nalidixique au niveau de Vitek 2 compact. Par contre, la méthode classique d'antibiogramme montre qu'elle est sensible à ces antibiotiques.

L'automate Vitek 2 compact utilise d'autres antibiotiques que ceux utilisés dans la méthode classique comme le pipéracilline/tazobactam, la céfalotine, la ceftazidime, le tobramycine, le ciprofloxacine et la nitrofurantoïne. Ces antibiotiques manifestent une faible activité sur *K. pneumoniae*. Elle est constamment sensible à l'ertapénème et intermédiaire à l'ofloxacine.

Le reste des antibiotiques c'est-à-dire l'ampicilline, l'amoxicilline + acide clavulanique, la ticarcilline, le céfoxitine, l'imipénème et le cotrimoxazole (triméthoprine/sulfaméthoxazole) donne les mêmes résultats que ce soit par Vitek 2 compact ou par la méthode classique d'antibiogramme.

Dans notre étude effectuée à l'aide de Vitek 2 compact ; le céfoxitine, l'ertapénème et l'imipénème constituent les antibiotiques de choix dans le traitement de *K. pneumoniae*.

Les automates d'identification et d'antibiogramme facilitent au biologiste le travail au laboratoire de bactériologie clinique grâce à la diminution du nombre d'étapes manuelles et au fait qu'ils combinent l'identification et l'antibiogramme sur une seule fiche technique et qu'ils augmentent les choix des traitements pour les souches identifiées et responsables des infections urinaires grâce au grand nombre d'antibiotiques testés par l'automate.

CONCLUSION GÉNÉRALE

CONCLUSION GENERALE

L'identification et l'antibiogramme des souches sont des étapes manuelles au niveau des moyens classiques par contre, au niveau de l'automate Vitek 2 compact toutes les étapes sont automatisées sauf la préparation de la suspension bactérienne qui fait manuellement.

Les moyens classiques restent très importants au laboratoire d'analyse pour l'identification et l'antibiogramme malgré les nouvelles techniques qui peuvent les remplacer essentiellement à cause de la rapidité des automates.

Au cours de notre étude, l'identification et l'antibiogramme des souches d'*E.coli* et de *K. pneumoniae* par les moyens classiques et les moyens utilisant un automate d'identification et d'antibiogramme Vitek 2 compact montrent que :

- la fréquence des bactéries responsables d'infections urinaires est dominée par la famille des *Enterobacteriaceae* avec *E. coli* au premier rang avec 75%, suivie de *Klebsiella pneumoniae* avec 15% et d'autres bactéries (*Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*) avec 10%. Ainsi *E. coli* est le germe le plus isolé dans les infections urinaires.
- les souches *E. coli* et *K. pneumoniae* sont résistantes vis-à-vis de l'amoxicilline, de l'association amoxicilline + acide clavulanique.
- les souches *E. coli* et *K. pneumoniae* ont une sensibilité élevée à la céfotaxime, l'imépinème, le ciprofloxacine, l'amikacine, la colistine.
- *K. pneumoniae* est résistante à la cotrimoxazole alors que *E. coli* est sensible.

Le biologiste doit garder la maîtrise de l'identification bactérienne avec deux étapes fondamentales: un bon isolement et un suivi rigoureux de la technique d'identification employée.

Pour le biologiste gestionnaire, l'automatisation doit, par rapport au travail manuel, apporter une productivité améliorée sans erreur humaine et une optimisation du temps de travail. L'automatisation permet également de mieux connaître les coûts, de les anticiper, de mieux gérer les stocks de réactifs et de consommables ; le gain de temps de travail doit permettre d'optimiser d'autres secteurs de développement.

L'automatisation donne des outils au biologiste mais elle ne peut remplacer les connaissances bactériologiques, ni épidémiologiques qui sont indispensables pour valider l'identification finale.

Ainsi, la méthode classique est très importante au laboratoire d'analyse médicale de même que la méthode automatisée. En définitive, on peut proposer de garder l'utilisation des moyens classiques parce que sans ces moyens on ne peut pas bien identifier les germes inconnus. Les automates coûtant très cher, est recommandée leur utilisation uniquement pour les cas urgents qui nécessitent des résultats rapides.

ANNEXES

Annexe 1 : Composition des milieux de cultures

1. Gélose de Mac Conkey

Peptone bactériologique	20 g
Sels biliaires	1,5 g
Chlorure	5 g
Lactose	10 g
Rouge neutre	0,03 g
Crystal violet	0,001 g
Agar	15 g
pH = 7,1	

2. Gélose de Chapman

Peptones	11,0 g/l
Extrait de viande	1,0 g/l
Chlorure de sodium	75 g/l
Mannitol	10,0 g/l
Rouge de phénol	0,025 g/l
Agar	15,0 g/l
pH = 7,4	

3. Gélose nutritive

Extrait de viande	1,0 g
Extrait de levure	2,0 g
Peptone	5,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Agar	15,0 g
pH = 7	

4. Gélose de chocolat

Peptone tryptique de caséine	7,5 g/l
Peptone pepsique de viande	7,5 g/l
Amidon de maïs	1 g/l
Hydrogénophosphate de potassium	4 g/l
Dihydrogénophosphate de potassium	1 g/l
NaCl	5 g/l
Hémoglobine	10 g/l
Agar	15 g/l
pH final = 7,2	

5. Gélose de Mueller Hinton

Infusion de viande de bœuf	300 g/l
Peptone de caséine	17,5 g/l
Amidon de maïs	1,5 g/l
Agar	17 g/l
pH final = 7,4	

5. Milieu TSI

Peptone	15,0 g
Extrait de viande	3,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Peptone pepsique de viande	5,0 g
Glucose	1,0 g
Lactose	10,0 g
Saccharose	10,0 g
Rouge de phénol	0.024 g
Chlorure de sodium	5.0 g
Sulfate de fer II (pasteur)	0.2 g
Thiosulfate de sodium	0.3 g
Agar	11.0g
pH = 7.5	

6. Milieu Urée Indole

Urée	2.0g
L-tryptophane	0.3g
KHPO ₄	0.1g
KH ₂ PO ₄	0.1g
Nacl	0.5g
Alcool à 95 °C	1.0g
Rouge de phénol à 1 %	0.25g
Eau distillée	100ml
pH = 7	

Annexe 2 : Les réactifs

1. Réactif de kovacs

Para dimethylamino benzaldehyde	0,5 g
Alcool iso anylique	75 ml
Acide chlorhydrique	25 ml

Annexe 3 : Tableau de lecture d'API 10 S des Entérobactéries

Tests	Composants actifs	Réactions/ enzymes	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	2-nitrophényl- β D-galactopyranoside	β -galactosidase (Ortho-Nitrophényl- β D-Galactopyranosidase)	incolore	jaune(1)
GLU	D-glucose	Fermentation/oxydation (Glucose) (3)	bleu/bleu-vert	jaune/jaune-gris
ARA	L-arabinose	Fermentation/oxydation (Arabinose) (3)	bleu/bleu-vert	jaune
LDC	L-lysine	Lysine Décarboxylase	jaune	rouge/orange
ODC	L-ornithine	Ornithine Décarboxylase	jaune	rouge/orange
CIT	Trisodium citrate	Utilisation de Citrate	vert pâle/jaune	bleu-vert/bleu(2)
H ₂ S	Sodium thiosulfate	Production de H ₂ S	incolore/grise	dépôt/noir Fin liseré
URE	Urée	Uréase	jaune	rouge/orangé
TDA	L-tryptophane	Tryptophane Désaminase	TDA immédiat	
			jaune	marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	Production d'Indole	JAMES/immédiat	
			incolore vert pâle/jaune	rose

(1) Une très légère couleur jaune est également positive.

(2) Lecture dans la cupule (zone aérobie).

(3) La fermentation commence dans la partie inférieure des tubes, l'oxydation commence dans la cupule.

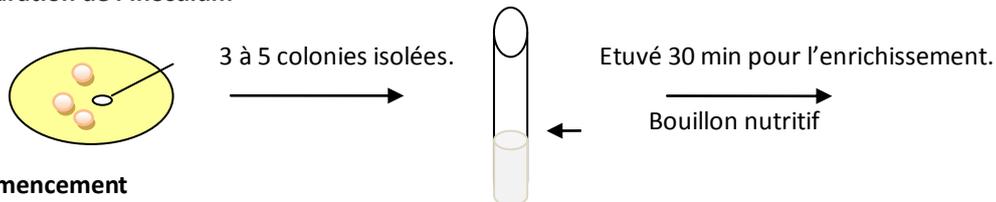
Annexe 4 : Technique d'antibiogramme

1 - Couler le milieu de Mueller Hinton



Faire sécher la surface de la gélose 15 min 37°C.

2 - Préparation de l'inoculum

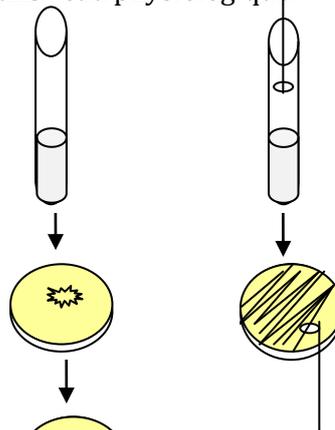


3 - Ensemencement

Ensemencement par inondation

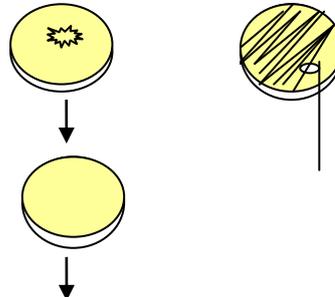
Ensemencement par l'écouvillonnage

- Ajouter une goutte d'inoculum dans l'eau physiologique.

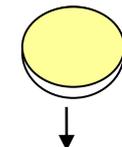


- stries très serrées
- 3 passages en faisant pivoter de 60°.

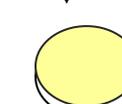
- Inonder avec 5 ml de la dilution.



- Lisser absorber 30 secondes.

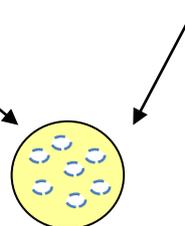


- Sécher 15 min à 37 °C.



4 - Dépôt des disques

Déposer les disques d'antibiotique avec une pince stérile.



Un disque déposé ne doit pas être déplacé.

5 - Incuber 24 h à 37°C

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

[1] ABHIJIT A *et al.* (2013).

Study of urinary isolates with reference to extended spectrum beta lactamases detection and antibiogram. Vol 2, Issue 9, p1052.

[2] AVRIL J.L., DENIS F., DABERNAT H *et* MONTIEL H. (2000).

Bactériologie Clinique. p 148-280. 2^{ème} Ed. Marketing. Paris.

[3] BAKHOUM I. (2004).

Contrôle de qualité et validation de différent micro méthodes d'identification bactérienne. Université Cheikh Anta diop de Dakar. Faculté de médecine, de pharmacif. Et d'odontostomatologie.

[4] BEN HAJ KHLIF A *et* KHEDHER M. (2010).

Fréquence et résistance aux antibiotiques des bactéries uropathogènes à l'hôpital universitaire Tahar Sfar de Mahdia. Rev. Tun. Infect. p 57-61.

[5] BOUDELLAA Y *et* BOUGATTOUCHA W. (2010).

Examen cytotbactériologique des urines. Mémoire en ligne. Ecole de formation paramédicale de Skikda Algérie.

[6] BOURJILAT M. (2009).

Etude prospective de la résistance chez *E. coli* dans l'hôpital de Meknès. Maroc. Eline. Microbial. Rev. 22, p 120-123.

[7] BRISSE S, GRIMONT F *et* GRIMONT P. A. D. (2006).

The Genus *Klebsiella*. Procaryotes. Chapitre 3.3.8.

[8] CARBONNELLE B., DENIS F., MARMONIER A., PINON G *et* VARGUES R. (1987).

Bactériologie Médicale : Techniques usuelles. S.I.M.E.P. S. A., Paris, p 121-137; 146-155.

[9] COMPTE RENDUE DE MICROBIOLOGIE. (2009).

Examen de l'état frais. Université Saad Dahlab. Blida.

[10] CROIZE J. RECULE C. PELLOUX C. CHANTEPERDRIX V et MORINE M. (2007).

L'automatisation en bactériologie : un challenge continu. L'expérience du Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble en technologie appliqué.

[11] DELARRAS C. (2007).

Microbiologie pratique pour le laboratoire (d'analyses ou de contrôle sanitaire). Ed médicales internationales TEC et DOC. p105 -107-108.

[12] DRAME B. (2001).

Microméthode d'identification et l'étude de la sensibilité des entérobactéries : intérêts thérapeutique. Thèse pharm. Université Dakar, n ° 86.

[13] ELLATIF O. (2011).

Place des fluoroquinolones dans le traitement des infections urinaires dans les établissements de santé lorrains, université Henri Poincaré-Nancy 1.

[14] FAUCHERE. J-L. (1997).

Bactériofiches, techniques en bactériologie clinique. Edition marketing S. A. Ellipses. Paris.

[15] FREDERIC J., ELVIRE M-K., AUDREY M et CAVALLOA J-D.

Les difficultés d'interprétation de l'examen cyto bactériologique des urines
Revue francophone des laboratoires - novembre 2008 - n°406 // p 52-53-57.

[16] FRENEY J, RENAUD P, LECLERCQ R et RIEGL P. (2007).

Précis de bactériologie clinique. 2^{ème} Ed ESKA. p153 et 1012 1013.

[17] HAMDAN Z et al. (2011).

Epidemiology of urinary tract infections and antibiotics sensitivity among pregnant women at Khartoum north hospital. Vol: 10.

[18] GERALDINE P et DELPHINE R. (2003).

Critères de choix d'une méthode d'identification. DES. p13.

[19] LIAZID A. (2012).

Etude sur de la résistance aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif non fermentaire au niveau de C. H. U. de Tlemcen. Université Abou Bekr Blkaid-Tlemcen.

[20] LOUKIADIS E. (2007).

Facteur de virulence et dissémination dans l'environnement via les effluents d'abattoirs d'animaux de boucherie d'*Escherichia coli* entérohémorragique (EHEC). Thèse de doctorat Université de Toulouse, France.

[21] MANSOUR A, MANDJEH M, ZOHREH P. (2009).

Study of bacteria isolated from urinary tract infections and determination of their susceptibility to antibiotics. Jun. J. Microbiol. 2 (3), p118-123.

[22] PHILIPPON A. (2000).

Cours de bactériologie général : Entérobactéries. Faculté de médecine Cochin-Port-Royal Paris, France.

[23] PHILIPPON A. (2000).

Cours de bactériologie médical : Entérobactéries. Faculté de médecine Cochin-Port-Royal Paris, France.

[24] PIERRE. , MARIE CURIE. (2002-2003).

Bactériologie. DCEM1. Université Paris-VI. Faculté de médecine Pitié-Salpêtrière.

[25] SAIDANI MARYLINE. (2012-2013).

Thèse en ligne : Epidémiologie des pyélonéphrites et prostatites communautaires : Les traitements probabilistes recommandés sont-ils toujours adaptés ?

Université Paris Diderot - Paris 7 faculté de médecine. France.

[26] SINGLETON P. (1994).

Abrégés de bactériologie. Ed Masson, Paris. p122.

[27] VILDE G et NAUCIEL C. (2005).

Bactériologie médicale connaissances et pratique. Masson. Paris.

Références webographique :

[28] <http://www.biomerieux.com/fr/les-applications-du-diagnostic-clinique>.

[29] <http://www.biomerieux.com/fr/focus-industrie>.

[30] <http://www.biomerieux-diagnostics.com/vitek-2-compact>.

[31] <http://coproweb.free.fr/pagbac/enterob2.htm>.

[32] <http://www.microbes-edu.org/etudiant/entero.html>.

[33] <http://Sante-medecine.Comment-ca-marche.net/faq/7594-Escherichia-coli-symptomes-et-traitement-definition>.

[34] <http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/resistlacta/POLY.Chp.9.html>.

Résumé:

Au cours de notre étude, nous nous sommes familiarisées avec la procédure opératoire de l'examen cyto bactériologique des urines (ECBU), pour isoler, identifier les microorganismes en cause et étudier leur sensibilité aux antibiotiques à l'aide des moyens classiques et des moyens automatisés (Vitek 2 compact).

L'étude des caractères biochimiques et du profil de résistance des souches isolées révéla : *E. coli* en tête de file avec 75% suivie par *K. pneumoniae* avec 15%, et suivie par d'autres bactéries (*Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*).

L'étude de la résistance des souches isolées *E. coli* et *K. pneumoniae* aux différents antibiotiques montre que ces souches sont résistantes à l'amoxicilline, l'association d'amoxicilline + acide clavulanique et à la ticarcilline et sont sensibles à plusieurs autres antibiotiques comme imipénème, acide nalidixique, Ciprofloxacine.

La méthode classique utilisée repose sur plusieurs étapes pour l'obtention d'un résultat après 18 à 24 heures (observation microscopique, macroscopique, galerie biochimique classique, galerie biochimique API 10 S miniaturisée et antibiogramme). La méthode automatisée utilise Vitek 2 compact qui est équipé du logiciel Advanced Expert Système (AESTM) permettant la lecture interprétative de l'antibiogramme en 8 à 15 heures selon la souche identifiée.

En définitive, on peut conclure que les méthodes classiques prennent beaucoup de temps pour l'identification et l'antibiogramme ce qui a un effet négatif, non seulement, sur le biologiste mais surtout sur le patient. Par contre, au niveau des moyens automatisés, le Vitek 2 qui est équipé du logiciel Advanced Expert Système (AESTM), malgré son coût élevé, assure une meilleure prise en charge du patient et des économies de dépense de santé.

Mots clés : identification, antibiogramme, moyens classiques, moyens automatisés, Vitek 2 compact.

Abstract:

During our study, we got familiar with the operating procedure of the cytobacteriologic of the urine to isolate, identify these microorganisms and study their sensibility to the antibiotics using the classical means and automatic means (Vitek 2 compact).

The study of the biochemical and of the profile of resistance of the counter foil isolated taken: *E. coli* on the head of the file with 75 % sustained by *K. pneumoniae* with 15 % and sustained by other bacteria (*Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*).

The study of the resistance of the stump isolated *E. coli* and *K. pneumoniae* to different antibiotics show that these stumps are resistant to the amoxicillin, the association of amoxicillin + acid clavulanic and at the ticarcilline and are sensitive to many other antibiotic like imipénème, nalidixique acid.

The classical methods used rely on several steps to obtain a result after 18 to 24 hours (microscopic, macroscopic observation, classical biochimic gallery, biochimic API 10 S miniaturise gallery and antibiogramme). The automatic method use Vitek 2 compact which is equipped with software Advanced Expert system (AES) allowing the interpretive lecture of the antibiogram in 8 to 15 hours according to the identified stump.

Finally, we can conclude that the classical methods take a lote of time to the identification and the antibiotgram which has a negative effet not only on the biologist. Butespecially on the patient. However, concerning the automatic means, the Vitek 2 compact which is equipped with an Advanced software Expert System (AESTM), although its high price assures a better charge of the patient and the economy of the feas of health.

Key words: identification, antibiogram, classical moyen, moyens automatisés, Vitek 2 compact.

ملخص :

خلال دراستنا، أصبحنا على دراية بإجراءات انجاز الفحص السيتوبكتريولوجي للبول (ECBU)، لعزل وتحديد الكائنات الحية المسببة ودراسة حساسيتها للمضادات الحيوية باستخدام الوسائل التقليدية والوسائل الآلية (Vitek 2 compact).

ودراسة الخصائص الكيميائية الحيوية للسلاسل وأنماط المقاومة معزولة كشفت بان *E. coli* في الصدارة بنسبة 75% تليها *K. pneumoniae* بنسبة 15% ، وتليها البكتيريات الأخرى (*aruginosa* , *Proteus mirabilis* , *Pseudomonas*).

وتظهر دراسة مقاومة السلاسل المعزولة *E. coli* و *K. pneumoniae* للمضادات الحيوية المختلفة أن هذه السلاسل هي مقاومة للأموكسيسيلين، حمض كلا فولانيك + أموكسيسيلين وتيكارسيلين وعرضة للعديد من المضادات الحيوية الأخرى كما ايميبينام ، حمض الناليديكسيك، سيبروفلوكساسين. وتستند هذه الطريقة القياسية المستخدمة في عدة خطوات للحصول على النتيجة بعد 18-24 ساعة (الملاحظة المجهرية، العينية، معرض الكيمياء الحيوية الكلاسيكية، معرض المنمنمة البيوكيميائية API 10 S والحساسية). يستخدم الأسلوب الآلي وقد تم تجهيز Vitek 2 compact ببرنامج نظام خبير المتقدم (AESTM) تسمح بالقراءة التفسيرية للمضادات الحيوية في 8-15 ساعة تبعا للسلسلة التي تم تحديدها.

في نهاية المطاف، يمكننا أن نستنتج أن الأساليب التقليدية تأخذ وقتا لتحديد واختبار الحساسية التي لها تأثير سلبي ليس فقط على عالم الأحياء ولكن في الغالب على المريض. على عكس، على مستوى الوسائل الآلية، Vitek 2 compact هو مجهز ببرنامج نظام خبير المتقدم (AESTM)، على الرغم من التكالفة العالية، فهو يقدم أفضل رعاية للمرضى و ادخار النفقات الصحية.

الكلمات المفتاحية :

تحديد السلسلة، مقاومة المضادات الحيوية، فحص السيتوبكتريولوجي (ECBU)، الأساليب التقليدية ، الوسائل الآلية ، Vitek 2 compact.

BOUTERSA Amina

Titre : Identification et antibiorésistance de souches d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* des infections urinaires à l'aide des moyens classiques et des moyens automatisés.

Nature de diplôme : Master.

Domaine : Science de la nature et de la vie.

Mention : Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes.

Résumé :

Au cours de notre étude, nous nous sommes familiarisées avec la procédure opératoire de l'examen cytbactériologique des urines (ECBU), pour isoler, identifier les microorganismes en cause et étudier leur sensibilité aux antibiotiques à l'aide des moyens classiques et des moyens automatisés (Vitek 2 compact).

L'étude des caractères biochimiques et du profil de résistance des souches isolées révélé : *E. coli* en tête de file avec 75% suivie par *K. pneumoniae* avec 15%, et suivie par d'autres bactéries (*Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*).

L'étude de la résistance des souches isolées *E. coli* et *K. pneumoniae* aux différents antibiotiques montre que ces souches sont résistantes à l'amoxicilline, l'association d'amoxicilline + acide clavulanique et à la ticarcilline et sont sensibles à plusieurs autres antibiotiques comme imipénème, acide nalidixique, Ciprofloxacine.

La méthode classique utilisée repose sur plusieurs étapes pour l'obtention d'un résultat après 18 à 24 heures (observation microscopique, macroscopique, galerie biochimique classique, galerie biochimique API 10 S miniaturisée et antibiogramme). La méthode automatisée utilise Vitek 2 compact qui est équipé du logiciel Advanced Expert Système (AESTM) permettant la lecture interprétative de l'antibiogramme en 8 à 15 heures selon la souche identifiée.

En définitive, on peut conclure que les méthodes classiques prennent beaucoup de temps pour l'identification et l'antibiogramme ce qui a un effet négatif, non seulement, sur le biologiste mais surtout sur le patient. Par contre, au niveau des moyens automatisés, le Vitek 2 qui est équipé du logiciel Advanced Expert Système (AESTM), malgré son coût élevé, assure une meilleure prise en charge du patient et des économies de dépense de santé.

Mots clés : identification, antibiogramme, moyens classiques, moyens automatisés, Vitek 2 compact.

Laboratoire de recherche : Laboratoire d'analyses médicales Lina (Casbah) et El-Mahmoudi (Ali Mendjli).

Jury d'évaluation :

Président (e) : KACEM CHAOUCHE N.	Pr	UFM Constantine
Rapporteur : AIT ABDELOUAHAB N.	MAA	UFM Constantine
Examinatrice : MERIANE I.	MAA	UFM Constantine