



UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES-FES
DEPARTEMENT DE SCIENCE DE LA VIE



PROJET DE FIN D'ETUDES

Licence Sciences & Techniques :
Sciences Biologiques Appliquées et Santé
(LST - SBAS)

La Résistance Aux Antibiotiques Des Entérobactéries Uropathogènes chez l'enfant au CHU Hassan II de Fès

Présenté le : 09/06/2017

Par : **Wiame BENSLIMANE**

Encadré par :

➤ **Pr. Kaouakib ELABIDA**

➤ **Dr. Ghita YAHYAOUI**

Soutenu

Devant le jury composé de :

- **Pr. El Abida K**
- **Pr. Ouhmidou B**
- **Dr. Yahyaoui G**

Année universitaire : 2016/2017

Table des matières

Liste des abréviations	i
Liste des tableaux et figures	ii
Introduction générale :.....	II
L'objectif du travail :	IV
Lieu de stage	V
Rappels Bibliographiques	1
I. Infection urinaire :	1
I.1. Définition :	1
I.2. Epidémiologie clinique :	1
I.3. Types d'infections urinaires :.....	2
I.4. Symptômes :	3
II. Les entérobactéries	3
II.1. Escherichia coli.	4
II.2. Klebsiella pneumoniae -- Enterobacter	4
II.3. Proteus mirabilis.....	4
III. Les Antibiotiques :	5
III.1. Familles d'antibiotiques	5
III.2. Mode d'action des antibiotiques.....	5
IV. La résistance bactérienne aux antibiotiques.....	7
IV.1. Définition	7
IV.2. Les types de résistance	7
IV.3. Mécanismes bactériens de la résistance :	8
Matériel et Méthodes	10
I. Matériel	10
I.1. Lieu & population d'étude.....	10
I.2. Matériel utilisé.....	10
II. Méthodes	12
II.1. Prélèvement et transport :	13
II.2. ECBU : Technique proprement dite :	14
Résultats et discussion	26
I. Résultats :	26
I.1. Répartition l'IU selon le sexe:.....	26
II.3. Répartition des patients selon l'âge :	27
II.4. Répartition des entérobactéries en fonction des services :	28

II.5. Répartition de l'IU selon les espèces d'entérobactéries :	28
II.6. Profil de résistance aux antibiotiques :	29
III. Discussion :	33
IV. Conclusion :	36
Bibliographie	37
Annexes.....	38

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
ADH	Arginine Dihydrolase
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ATB	Antibiogramme
BCP	Bromocrésol Pourpre
BGN	Bacille Gram Négatif
BHI	Brain Heart Infusion
BMR	Bactérie Multi Résistante
CIT	Citrates
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CLED	Cystine Lactose Electrolyte Déficient
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
DGU	Dénombrement des Germes Urinaires
ECBU	Examen Cytobactériologique des Urines
E.coli	Escherichia coli
EMB	Eosine Bleu de Méthylène
GEL	Gélatine
H ₂ S	Sulfure d'Hydrogène
IU	Infection Urinaire
LDC	Lysine Décarboxylase
ODC	Ornithine Décarboxylase
ONPG	Ortho-Nitro-Phényle-Galactopyranoside
RCP	Résumé des Caractéristiques du Produit
UFC	Unité Formant Colonies
URE	Uréase
VP	Voges-Proskauer

Liste des tableaux et figures

Tableau 1 : Classification des familles d'antibiotiques selon leur mode d'action	5
Tableau 2 : Interprétation de l'ECBU	22
Tableau 3 : Répartition des patients selon l'âge	27
Liste des figures	
Figure 1 : Arbre hiérarchique du laboratoire	VI
Figure 2 : Les différents mécanismes de résistance à l'antibiotique	9
figure3: L'automate Phoenix® 100 (Becton Dickinson).	10
Figure4 : Automate UF500 sysmex®	10
Figure 5 : Différentes étapes de la réalisation de l'examen cytbactériologique des urines (ECBU)	12
Figure 6 L'anse calibrée	17
Figure 7 : Techniques d'épuisement	17
Figure 8 : Résultat de test catalase	20
Figure 9 : Résultat de test coagulase	20
Figure 10 : La galerie Api 20E	21
Figure 11 : Analyse d'un Antibiogramme	23
Figure 12 : Répartition de l'infection urinaire selon le sexe	26
Figure 13 : Répartition des patients selon l'âge	27
Figure 14 : Distribution des ECBU positifs selon leur provenance des différents services hospitaliers et externes	28
Figure 15 : Fréquence des entérobactéries responsables de l'infection urinaire	29
Figure 16 : Profil de résistance aux antibiotiques des entérobactéries uropathogènes isolées chez l'enfant au CHU Hassan II de Fès	30
Figure 17 : Résistance aux β -lactamines de souches entérobactéries	31
Figure 18 : Résistance aux Quinolones de souches entérobactéries	32
Figure 19 : Résistance aux sulfamides des entérobactéries	32
Figure 20 : Résistance aux Aminosides de souches entérobactéries	33

DEDICACES

A ma petite famille :

Aucune dédicace ne pourrait exprimer la profondeur des sentiments que j'éprouve pour vous.

Vos sacrifices, vos prières, vos soutiens aussi bien moral que matériel, vos encouragements et vos aides précieux ne cessent de m'impressionner.

Que dieu tout puissant vous protèges et vous procure santé et longue vie.

A mes Professeurs :

Je serais vaniteuse si je me devais énumérer en quelques lignes vos remarquables qualités humaines et professionnelles. Trouvez dans ce travail ma gratitude pour tout votre savoir-faire qui m'a guidée dans mon travail, vos soutiens et vos encouragements.

A mes amis et collègues :

Pour tous les bons moments qu'on a passés ensemble. Avec mes souhaits d'un avenir plein de joie et de succès.

A tous ceux qui m'ont aidée de près ou de loin.

Avec ma grande considération

REMERCIEMENT

Durant deux mois d'enthousiasme et d'ambiance, je ne saurais comment expliquer la fierté que j'ai partagée avec le personnel du Laboratoire central des analyses médicales, CHU HASSAN II-FES. Pour moi, le stage me fait toujours rêver d'une vie professionnelle.

J'ai été impressionnée par l'hospitalité du personnel qui m'a accompagnée durant ce stage.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont assistée dans la réalisation de ce mémoire.

Tout d'abord, j'adresse mes remerciements au chef du laboratoire : **Professeur Mahmoud Mustapha**, Vous avez manifesté à notre égard une grande disponibilité et vous m'avez accueillie avec bienveillance et sympathie

Que ce projet soit pour moi l'occasion de vous exprimer ma respectueuse considération et ma profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines. Et de vous témoigner ma gratitude.

Je tiens à remercier **Docteur YAHYAOUI Ghita**, Professeur de microbiologie pour l'amabilité et la simplicité par laquelle vous m'avez accueillie dans votre laboratoire.

Je remercie également les techniciens du laboratoire Mme. **FATIMA ZAHRA**, ainsi que **Mr. FERRAT** qui m'ont beaucoup soutenue à l'élaboration de ce rapport, j'ai aussi apprécié leur disponibilité et leur patience.

Mes vifs remerciements à notre encadrante **Pr. Kaouakib ELABIDA** pour son aide et son encouragement qu'elle n'a cessé de nous communiquer.

Mes remerciements les plus chaleureux sont aussi adressés au **Pr. Ouhmidou Bouchra**, pour m'avoir honorée de sa présence et d'avoir accepté de juger mon travail...

Introduction générale :

L'intérêt porté ces dernières années aux infections urinaires recouvrent des réalités cliniques diverses : la cystite aiguë non compliquée, la bactériurie asymptomatique, voire des situations à risque comme la pyélonéphrite, la prostatite, l'urétrite ou une uropathie et leur prise en charge en thérapeutique anti-infectieuse restent encore d'actualité.

L'infection urinaire est l'une des infections bactériennes les plus fréquentes en pédiatrie car l'arbre urinaire est l'un des sites de l'organisme les plus touchés par l'infection, mais cette fréquence varie en fonction de l'âge. Le tractus urinaire de l'enfant est le deuxième appareil après l'arbre respiratoire à s'infecter.

En effet, Les infections urinaires sont une cause courante de maladie aiguë chez les nourrissons et les enfants. Ces infections, à l'origine de nombreuses prescriptions d'antibiotiques en médecine générale, participent à l'apparition de résistance aux antibiotiques. Elles sont principalement causées par des entérobactéries, dont en premier lieu *Escherichia coli* (*E. coli*), qui est présente naturellement dans les intestins et qui représente 70 à 80 % des bactéries isolées en cas de prélèvement urinaire.

L'examen cytot bactériologique urinaire (ECBU) est l'un des examens les plus fréquemment demandé au laboratoire d'analyse médical, il représente plus de la moitié des examens réalisés par le laboratoire de bactériologie. Il permet, par une étude parallèle de la cytologie (notamment de la leucocyturie) et de la bactériurie d'établir le diagnostic d'infection urinaire.

L'analyse est complétée par l'isolement puis l'identification du ou des entérobactérie(s) uropathogène(s) et la réalisation d'antibiogramme(s) qui permettront au clinicien d'instaurer une antibiothérapie.

L'infection urinaire reste l'infection la plus rapportée en pédiatrie surtout en cas d'une uropathie obstructive acquise ou congénitale. La fréquence de la résistance aux antibiotiques ne cesse de s'accroître conduisant parfois à des impasses thérapeutiques.

L'objectif du travail :

Dans ce cadre, nous avons mené un stage au sein du laboratoire d'analyse médical CHU Hassan II Fès durant une période d'un mois et demi, allant de 03/04/17 au 20/05/17, dans le but de déterminer les différentes espèces d'entérobactéries en cause d'infection urinaire, et de préciser leur niveau de résistance aux antibiotiques usuels.

Lieu de stage

Les travaux de construction du CHU Hassan II de Fès ont démarré fin novembre 2001 et c'est en janvier 2009 que le nouveau complexe hospitalier a été inauguré par SM le Roi Mohammed VI. Cet édifice sanitaire, prévu pour répondre aux besoins de plus de quatre millions d'habitants (Régions Fès Boulemane, Meknès-Tafilalet et Taza-Al Hoceima-Taounate), a pour objectif d'améliorer le taux de couverture médicale de cette population et de décongestionner les structures sanitaires déjà existantes dans ces régions.

Le matériel médical haut de gamme dont est doté le CHU Hassan II (pharmacie avec gestion informatisée et automatisée des médicaments, blocs opératoires multimédias avec télé-médecine, appareils de radiologie sophistiqués...) permet d'offrir aux patients les meilleurs soins et de garantir aux étudiants et aux stagiaires un cadre d'apprentissage adéquat.

Depuis sa création, le CHU Hassan II ne cesse de déployer des efforts pour relever le niveau de la médecine dans la région Fès-Boulemane et développer des efforts pour relever le niveau de la médecine dans la région Fès-Boulemane et développer certains pôles d'excellence.

Ce complexe comprend :

- Un hôpital de spécialités
- Un hôpital mère enfant
- Un bloc opératoire
- Une salle de diagnostic
- Un pavillon de consultation externe
- Un laboratoire central

Le laboratoire centrale d'analyse est situé au bâtiment J et comporte plusieurs spécialités d'analyses médicales :

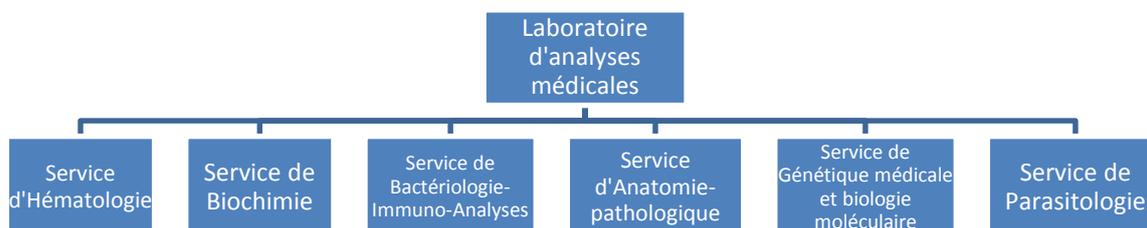


Figure 1 : Arbre hiérarchique du laboratoire

Notre stage s'est déroulé au sein du service de bactériologie médicale dont le rôle principal est de rechercher les microorganismes pathogènes (bactéries, champignons et parasites).

Suivant les germes, l'analyse se fait par détection directe dans l'échantillon ou enrichissement par culture.

Les bactéries d'intérêt clinique sont cultivées, identifiées et testées quant à leur résistance aux antibiotiques.

Les résultats contribuent au diagnostic et aident le médecin à soigner efficacement les patients infectés.

Rappels Bibliographiques

I. Infection urinaire :

I.1. Définition :

I.1.1. La colonisation :

L'arbre urinaire est normalement stérile à l'exception de la partie distale de l'urètre.

Une colonisation correspond à la présence d'un (ou de plusieurs) micro-organisme dans l'arbre urinaire sans qu'il ne génère par lui-même de manifestations cliniques.

Le terme de colonisation est préférable à celui de bactériurie asymptomatique.

I.1.2. Infection urinaire:

Une infection urinaire correspond à l'agression d'un tissu par un (ou plusieurs) microorganisme, générant une réponse inflammatoire et des signes et symptômes de nature et d'intensité variable selon le terrain. Elle associe au moins un des signes suivants :

- Fièvre (>38 °C).
- Pollakiurie.
- Brûlures mictionnelles ou douleur sus-pubienne.
- Une uro-culture positive ; en l'absence d'autre cause infectieuse.

I.1.3. Infection urinaire nosocomiale :

L'infection urinaire représente selon les études actuelles environ 40 % des infections nosocomiales. Il s'agit d'un véritable problème de santé publique.

1. Une infection urinaire est dite nosocomiale lorsqu'elle est acquise dans une structure de soins, ou d'une manière plus générale reliée à la prise en charge du patient.[1]

I.2. Epidémiologie clinique :

Chez l'enfant de sexe masculin entre 0 et 10 ans et chez l'enfant de sexe féminin avant l'âge de 2 ans, une IU doit faire rechercher une malformation urinaire.

1- Conférence de Consensus: Infections urinaires nosocomiales de l'adulte- mercredi 27 novembre 2002.

A l'âge scolaire, la fréquence augmente progressivement chez la fillette avec l'âge (diminution des uropathies malformatives, augmentation des vulvo-vaginites).

A l'adolescence et l'âge adulte, on note une augmentation de l'incidence des IU, favorisées par les rapports sexuels et la grossesse. 2 à 3 % des femmes adultes présenteraient un épisode de cystite tous les ans.

Entre 0 et 2 ans, la fréquence des IU est la même dans les deux sexes (2 %). Dans le sexe masculin, entre 10 et 30 ans, le risque d'IU est très faible. Il augmente après 60 ans en raison des pathologies prostatiques et du nombre plus important d'explorations urinaires instrumentales.

Le problème de l'IU cliniquement asymptomatique est généralement estimé chez le sujet âgé à 10 et 5 % pour les sexes respectivement féminin et masculin.

Enfin certaines populations sont particulièrement exposées aux IU asymptomatiques : Diabétiques, femmes enceintes.[2]

I.3. Types d'infections urinaires :

Classiquement, on distingue **IU basse** et **IU haute**.

L'IU basse se rapporte à une IU du bas appareil (vessie, voire urètre). C'est ce que l'on nomme communément cystite.

L'IU haute concerne le haut appareil (reins) et sous-entend une pathologie associant, aux signes cliniques rencontrés lors de cystite, une hyperthermie avec douleurs lombaires (pyélonéphrite aigue). Sa signification pronostique est plus péjorative et son traitement plus lourd.

On doit lui préférer la distinction **IU simple/IU compliquée**.

L'IU simple est une infection cliniquement et bactériologiquement définie, limitée à l'urine et à l'urothélium, sans atteinte parenchymateuse.

L'IU compliquée est une IU avec infection parenchymateuse (rénale, prostatique ou épидидymo-testiculaire).

Enfin, une IU est dite récidivante lorsqu'il existe une reprise de l'infection dans les 2 mois, malgré un traitement initial correct, avec plus de 3 épisodes annuels.[3]

I.4. Symptômes :

Les symptômes les plus communs :

- Des douleurs ou des brûlures au moment d'uriner.
- Des urines troubles, qui dégagent une odeur désagréable.
- Une pression dans le bas-ventre.
- Parfois, du sang dans l'urine.

Dans le cas d'une infection des reins :

- Des douleurs lombaires.
- Des frissons.
- De la fièvre.
- Des vomissements.

Chez les enfants, l'infection urinaire se traduit aussi par de l'énurésie (pipi au lit) et par des plaintes ou des pleurs au moment d'uriner.[4]

II. Les entérobactéries

Les entérobactéries constituent une famille hétérogène de bactéries Gram-négatif qui est fréquemment impliquée dans les infections humaines. Elle se compose d'environ 30 genres de bactéries et de plus de 100 espèces, Mobiles par ciliature péritriche ou immobiles. Une de leurs caractéristiques est de réduire les nitrates en nitrites, et d'acidifier le glucose par voie fermentative avec souvent la production de gaz.

Dans le cadre de notre étude, les entérobactéries incriminées sont : *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*. Pour cela, il semble nécessaire de rappeler brièvement quelques caractéristiques générales de ces bactéries et les types d'infections qu'elles génèrent.

3 www.spiral.univ-lyon1.fr

4 www.spiral.univ-lyon1.fr

II.1. *Escherichia coli*.

C'est une entérobactérie commensale du tube digestif, c'est un bacille gram négatif (BGN) et représente 80 % de la flore aérobie de l'intestin.

Les *Escherichia coli* uropathogène sont les bactéries les plus fréquentes dans les infections urinaires.

L'infection se fait en général par voie ascendante ; les bactéries en provenance de la flore fécale gagnent la vessie et se multiplient dans les urines si les conditions sont favorables.

De point de vue bactériologique, *E. coli* exprime les caractères généraux des entérobactéries. Il est en outre lactose +, Indole +, VP- (ou acétoine), Citrate-, H₂S-, Gaz +, URE-.[5]

II.2. *Klebsiella pneumoniae* -- Enterobacter

Ce sont des entérobactéries (BGN) qui ont un métabolisme fermentaire particulier, c'est-à-dire qui produit de l'acétoine, elles sont dites VP+, (réaction de Voges-Proskauer positive).

Espèces commensales du tube digestif souvent impliquées dans les infections nosocomiales, *Klebsielle* provoque des infections urinaires (5% des infections en ville), et est naturellement résistante à l'ampicilline par production de pénicillinase chromosomique.[6]

II.3. *Proteus mirabilis*

Ce sont des bactéries très mobiles qui se distinguent facilement des autres entérobactéries par leurs caractères biochimiques (URE+, Tryptophane désaminase+) et leur résistance naturelle à la colistine. C'est un commensal du tube digestif.

Proteus mirabilis vient au second rang, après *E. coli*, dans l'étiologie des infections urinaires de ville (10% des cas). C'est une espèce bactérienne habituellement sensible aux antibiotiques[7]

5Bernar, Debré Abrégé en urologie 1999

6 www.chups.jussieu.fr

7 www.chups.jussieu.fr

III. Les Antibiotiques :

III.1. Familles d'antibiotiques

CHARBERT en 1985 a classé les familles d'antibiotiques selon leurs modes d'action et selon leurs propriétés physico-chimiques (tableau1).

Tableau 1 : Classification des familles d'antibiotiques selon leur mode d'action

Famille d'antibiotique	Mode d'action
Bêta-lactamines : <ul style="list-style-type: none">• Penicillines• Céphalosporines• Carbapénèmes	Inhibent la synthèse de la paroi
Glycopeptides	
Cyclines Macrolides Aminosides	Interagissent avec les sous unités ribosomiques entraînant une inhibition de la synthèse des protéines.
Sulfamides Triméthoprimes	Inhibent la synthèse de l'acide folique par compétition avec l'acide p-aminobenzoïque, Inhibent la synthèse du tétrahydrofolate par compétition avec le substrat de la dihydrofolate réductase.

III.2. Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques agissent sur les bactéries par plusieurs mécanismes dont certains sont connus.

Selon la classe des antibiotiques, ils agissent sur différents sites de la bactérie :

- Paroi bactérienne,
- Membrane cytoplasmique,
- Acides nucléiques,

- Métabolismes intermédiaire[8]

III.2.1. Action sur la paroi bactérienne

Neal en 2008 a relaté les différentes actions des antibiotiques sur les bactéries et les a résumé en trois types d'action :

- Inhibition de la synthèse de précurseurs de la paroi,
- Inhibition du transfert des précurseurs de la paroi sur un lipide porteur, permettant leur transport à travers la membrane plasmique,
- Inhibition de l'insertion des unités glycaniques, précurseurs de la paroi, et de la transpeptidation.

Les Cocci Gram positif sont plus sensibles à ces antibiotiques que les Cocci Gram négatifs, du fait de la richesse de la paroi des premiers en peptidoglycanes.[9]

III.2.2. Action sur la membrane cytoplasmique

La Polymyxine, la colistine, la Bacitracine et la tyrothricine, qui sont des polypeptides cycliques à caractère basique agissent sur les bactéries en se fixant sur les phospholipides de la membrane cytoplasmique, entraînant une altération de la perméabilité de cette membrane.

Les constituants cellulaires s'échappent du cytoplasme bactérien ce qui provoque la mort de la cellule.[10]

III.2.3. Action sur la réplication de l'ADN

Certains antibiotiques perturbent la formation de l'acide désoxyribonucléique : l'actinomycine D, les rifamycines et l'acide nalidixique agissent ainsi.

III.2.4. Action sur la traduction de l'ARN messenger

L'ARN messenger et l'ARN de transfert sont les cibles de certains antibiotiques et les mécanismes de traduction de l'ARN messenger sont troublés.

La Streptomycine et les Aminosides se fixent sur la sous unité ribosomale 30S.

8 Neal M. 2003. Pharmacologie médicale. 2^{ème} édition française de Boeck..

9<http://resistance-aux-antiotiques.eklablog.fr/les-differents-modes-d-action-des-antibiotiques-a37610417?noajax&mobile=0>

10<http://docplayer.fr/42947947-Un-peuple-un-but-une-foi-annee-academique.html>

La Tétracycline, le Chloramphénicol et macrolides interviennent de diverses manières sur la grande sous unité ribosomiale 50S.[11]

III.2.5. Action sur le métabolisme intermédiaire

La Cyclosérine, les Bêta-lactamines, les sulfamides, l'Acide para-aminosalicyclique, le Triméthoprim et l'Isoniazide inhibent le système enzymatique formé par la dihydropholate réductase et la mycolate synthétase etc.

IV.La résistance bactérienne aux antibiotiques

IV.1. Définition

La résistance est la capacité que possède une bactérie de s'opposer à l'action d'un antibiotique. Par définition, une souche bactérienne est dite résistante à un antibiotique si la concentration minimale de cet antibiotique capable d'inhiber sa croissance est supérieure aux concentrations obtenues dans le sérum d'un malade traité à doses standards par cet antibiotique.

IV.2. Les types de résistance

IV.2.1. Résistance naturelle

Pour chaque classe d'antibiotique, il existe des espèces bactériennes sur lesquelles l'antibiotique est inactif par défaut de cible ou d'accès à la cible. On parle d'espèces bactériennes naturellement résistantes et de mécanismes de résistance intrinsèques.

IV.2.2. Résistance acquise

Les bactéries peuvent également acquérir la résistance à un antibiotique. Les gènes de résistance aux antibiotiques peuvent être portés par des chromosomes (résistance chromosomique) ou par des éléments extrachromosomiques appelés plasmides (résistance plasmidique).

a. Résistance chromosomique :

La résistance chromosomique résulte généralement d'une mutation au niveau de l'ADN chromosomique, affectant spécifiquement le mécanisme d'action d'un antibiotique ou d'un groupe d'antibiotiques. Cette résistance se caractérise par :

11 <http://docplayer.fr/12016620-L-antibiotherapie-pediatrique.html>

Sa faible fréquence d'apparition de l'ordre du milliardième au millionième. Ainsi, la résistance chromosomique à plusieurs antibiotiques à la fois, à une très infime probabilité d'apparition ;

Sa spontanéité car elle apparaît en absence d'antibiotique ;

b. Résistance extrachromosomiques ou plasmidique :

Les plasmides sont des structures extrachromosomiques constituées d'ADN bi-caténaire circulaire, se répliquant de façon autonome. Leur transmission, stable au cours des générations, peut se faire entre des bactéries de la même espèce ou d'espèces différentes. L'une des conséquences de cette facilité de transmission intra et interspécifique est que la résistance plasmidique peut intéresser plusieurs antibiotiques à la fois (BMR multirésistance).

IV.3. Mécanismes bactériens de la résistance :

Quatre mécanismes peuvent expliquer l'apparition d'une résistance à un antibiotique (figure 1):

Une modification des enveloppes bactériennes qui empêche l'antibiotique de traverser la paroi et donc d'atteindre sa cible.

La production d'enzymes inactivatrices qui modifient l'agent antibactérien et le rendent inactif.

Une modification de la cible qui ne reconnaît donc plus l'antibiotique.

Une substitution de la cible : dans ce cas une nouvelle cible insensible à l'action de l'antibiotique est apportée par un ADN exogène (plasmide).

Mécanismes de résistance à l'antibiotique

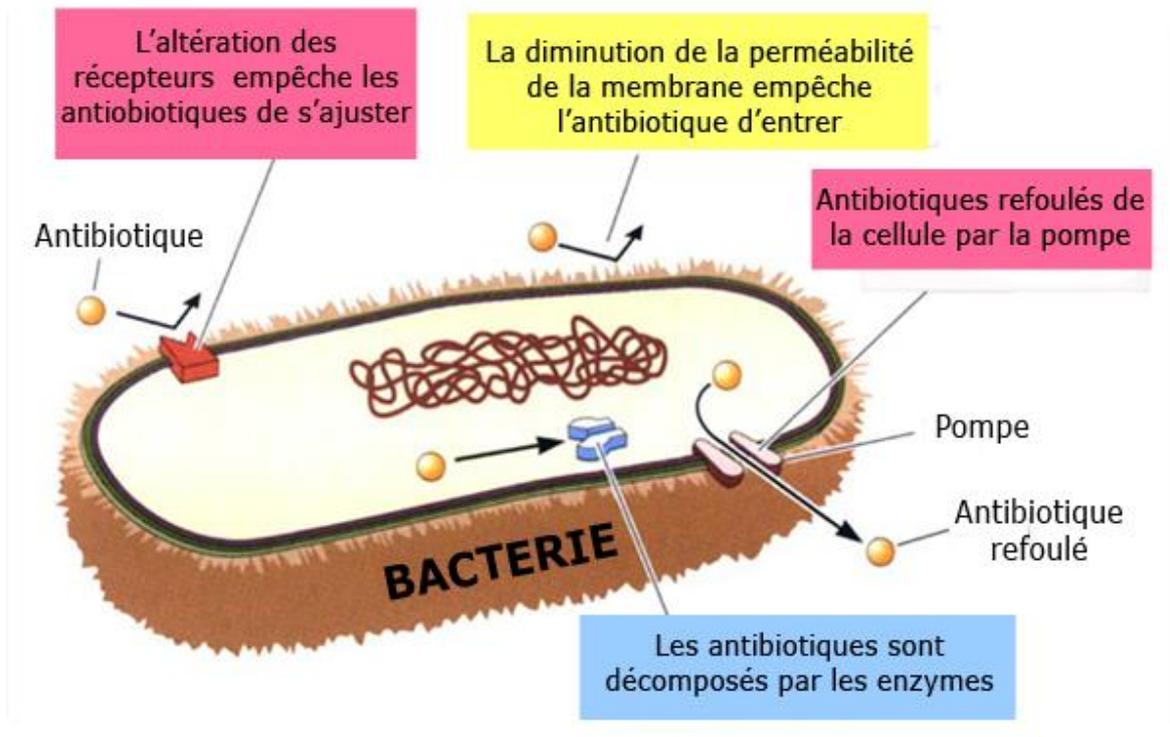


Figure 2 : Les différents mécanismes de résistance à l'antibiotique

Matériel et Méthodes

I. Matériel

I.1. Lieu & population d'étude

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de bactériologie de CHU Hassan II de Fès sur une période de six semaines allant du 03 / 04 / 17 au 19 / 05 / 17. Cette étude a été effectuée sur 281 échantillons qui proviennent soit des différents services de CHU Hassan II et correspond à des patients hospitalisés, soit des patients qui se présentent au laboratoire pour l'analyse ECBU.

I.2. Matériel utilisé



Figure3: L'automate Phoenix® 100 (Becton Dickinson).

- BD Phoenix® grâce à sa galerie unique permettant de réaliser l'identification et l'antibiogramme facilement, sans tests supplémentaires (Voir annexe).



Figure4 : Automate UF500 sysmex®.

- Automate UF 500 nous permet d'effectuer la cytologie sur les différents échantillons d'urines.

1.2.1. Réactifs

Réactifs et milieu nécessaire à la galerie d'identification biochimique des germes isolés.

Réactifs pour la coloration de Gram (voir annexe)

1.2.2. Milieux utilisés dans l'ECBU

i. Gélose lactosée au bromocrésol pourpre (PCB)

C'est un **milieu non sélectif** utilisé pour l'isolement de nombreuses espèces autre que les entérobactéries.

Il contient un critère de différenciation : la fermentation du lactose, qui se traduit par le virage du bromocrésol pourpre à sa teinte acide jaune.

Colonies jaunes (bactéries lactose +).

Colonies bleues (bactéries lactose -).[12]

ii. Gélose de Mueller Hinton

C'est un milieu dans la formule ; le pH, la concentration en magnésium et en calcium, et l'épaisseur de sa gélose une fois coulée en boîte de Pétri sont adaptés à la pratique de l'antibiogramme ainsi qu'aux tests de résistance à diverses substances.[13]

iii. Milieu CLED

Le milieu CLED est un **milieu non sélectif**, très utilisé dans l'étude des bactéries contenues dans l'urine. Etant un milieu non sélectif de nombreuses bactéries, tant que Gram + que Gram -, pourront s'y développer.

Les bactéries : - Lactose + apparaissent jaunes.

- Lactose – apparaissent bleues vertes.[14]

iv. Milieu Chapman

Le milieu Chapman est un **milieu sélectif**, permettant la croissance des germes halophiles.

12 P.Y.GUILLAUM : Milieux de culture utilisés en microbiologie, 2004

13 P.Y.GUILLAUM : Milieux de culture utilisés en microbiologie, 2004

14 P.Y.GUILLAUM : Milieux de culture utilisés en microbiologie, 2004

Parmi ces germes figurent au premier rang les bactéries du genre *Staphylococcus*, mais aussi les *Enterococcus* et de rares bactéries à Gram négatif.

La fermentation du mannitol se traduira par une acidification du milieu, provoquant le virage au jaune de l'indicateur de pH. **Les colonies mannitol + sont entourés d'une auréole jaune.**[15]

I.2.3. La composition des milieux culture

Elle est relatée en annexe

II. Méthodes

La réalisation de l'ECBU comprend l'examen macroscopique et microscopique dont les différentes étapes sont indiquées dans le schéma ci-dessous :

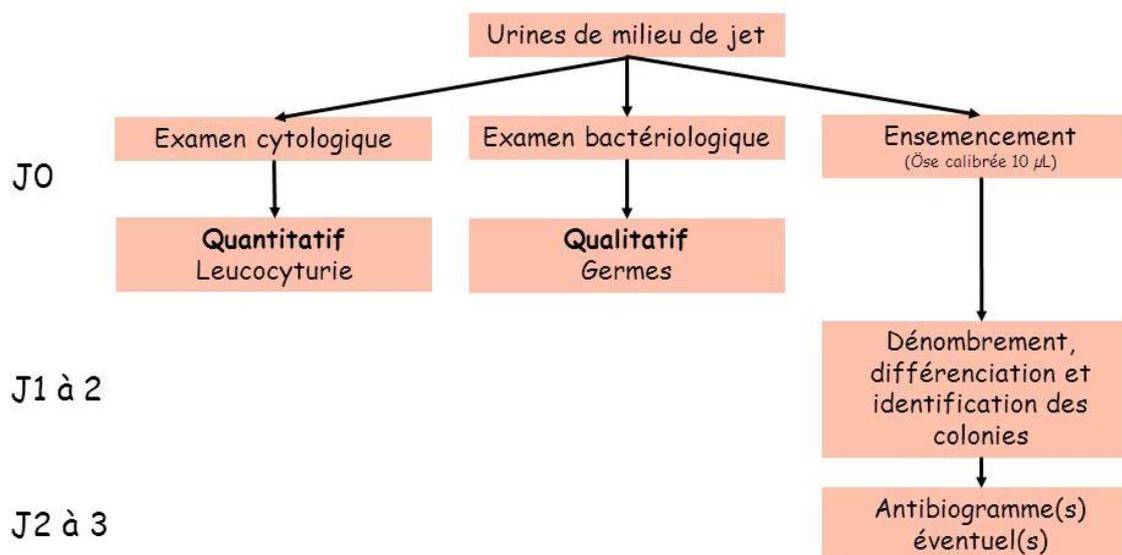


Figure 5 : Différentes étapes de la réalisation de l'examen cyto bactériologique des urines (ECBU)

II.1. Prélèvement et transport :

II.1.1. Prélèvement de l'échantillon :

Préparation du patient :

Après lavage hygiénique des mains au savon et brossage des ongles, le patient doit faire une toilette locale soignée avec un antiseptique doux (par ex. le soluté de Dakin stabilisé), puis rinçage à l'eau.

Le premier jet (environ 20 ml) est éliminé et le deuxième jet est ensuite recueilli dans un récipient stérile. Pour éviter toute souillure, les doigts ne doivent pas effleurer les bords du flacon stérile et ne toucher que l'extérieur du couvercle. Il est important de bien expliquer au patient comment exécuter le prélèvement.[16]

Mode de prélèvement :

Nourrisson : chez le petit enfant on doit utiliser un collecteur stérile spécifique. Ce dispositif à usage unique adapté à l'anatomie se pose après désinfection soignée et ne peut être laissé en place plus de 30 minutes. Passé ce délai, si l'enfant n'a pas uriné, le dispositif est éliminé et remplacé par un collecteur neuf en prenant soin de refaire une toilette. A la fin de la miction, le collecteur est enlevé et les urines sont traversées soigneusement dans un flacon stérile puis acheminées rapidement vers le laboratoire.[17]

Choix du récipient :

En général, flacon plastique de 40 ml à vis qui doit être hermétiquement clos.

Identification :

Patient, service ;

Etiquette du patient à coller sur le flacon et sur le bon de demande d'examen.

Renseignements éventuels à inscrire sur le bon de demande d'examen.

Préciser le type de prélèvement tel ; sonde à demeure, par miction...

Date et heure de prélèvement

16 www.uvp5.univ-paris5.fr/MICROBES/Technique/Ecbu/ecbu1.asp

17 www.uvp5.univ-paris5.fr/MICROBES/Technique/Ecbu/ecbu1.asp

II.1.2. Transport de l'échantillon :

Le flacon doit être fermé hermétiquement, étiqueté précisément et acheminé le plus rapidement possible au laboratoire.

L'urine ne doit pas séjourner plus d'une heure à température ambiante pour éviter toute multiplication bactérienne. En cas d'empêchement (les échantillons qui viennent la nuit), elle peut être conservée à 4°C pendant quelques heures.

II.2. ECBU : Technique proprement dite :

✓ Premier Jour

On homogénéise l'urine par retournement du flacon et on note :

II.2.1. Le pH :

A l'aide d'un papier indicateur (1 - 10).

Le pH normal de la première urine du matin est acide. Un pH alcalin suggère une infection urinaire.

II.2.2. Examen macroscopique :

Où on doit noter les éléments suivants :

Aspect, couleur et présence éventuelle de sédiments et leur abondance.

Dans tous les cas, l'examen macroscopique est étayé par l'examen microscopique du culot urinaire.

II.2.3. Examen microscopique :

Réalisé à l'aide d'un microscope photonique ou à l'aide d'automate UF500 Sysmex®. L'examen microscopique doit toujours précéder l'ensemencement. Il comprend un examen cytologique et un examen bactériologique.[18]

a. Examen cytologique :

Cytologie quantitative : A l'aide d'un dispositif à numération type cellule de Mallasez ou de préférence à usage unique, on dénombre les différents éléments figurés contenus dans un volume donné de l'urine à étudier. Leur nombre est rapporté au ml.

A l'état physiologique, l'urine contient moins de 10 000 leucocytes et 5 000 hématies par ml.[19]

Cytologie qualitative : Dans les urines claires on utilise la technique de centrifugation afin d'augmenter les chances d'études des cellules.

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

Les leucocytes, les hématies, les cellules épithéliales, les cylindres, les cristaux, les germes, les levures et les parasites.

b. Examen bactériologique

L'examen direct du frottis du culot urinaire coloré au Gram permet de voir la composition de la flore bactérienne (bacilles ou cocci) et le Gram (Gram+ ou Gram-).

II.2.4. La mise en culture :

L'évaluation quantitative de la bactériurie est aussi indispensable que l'identification de l'espèce en cause. Mais il n'est pas nécessaire qu'elle soit très précise. Il suffit de connaître l'ordre de grandeur du nombre de bactéries. Elle est réalisée en faisant ensemercer une quantité précise d'urine (diluée ou non) sur un milieu de culture approprié.[20]

a. Ensemencement et isolement des bactéries :

L'obtention de cultures pures s'effectue en isolant les bactéries les unes des autres, soit par la méthode de dilution, soit par la méthode d'épuisement (sur les milieux de culture appropriés), soit par le procédé de la lame immergée.

Ces techniques permettent d'obtenir des bactéries séparées, ou plus souvent de petits agrégats de bactéries (unités formant colonie ou UFC) qui vont se développer sur milieu gélosé, en donnant une seule colonie qui correspond souvent à un clone car issue d'une même cellule mère.[21]

✚ Séparation des bactéries par dilution :

On obtient cette séparation en réalisant un certain nombre de dilutions. On étale soigneusement 0,1 ml de cette dilution, moyennant un râteau ou un étaloir, sur milieu non sélectif BCP, puis on incube à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

Après on compte le nombre de colonies à la surface du milieu gélosé.[22]

$$N \text{ bactéries / ml} = n \text{ colonies comptées} \times \text{Facteur de dilution}$$

✚ Séparation des bactéries par épuisement :

Elle constitue l'une des techniques le plus fréquemment utilisées. L'isolement est réalisé sur un milieu gélosé sélectif ou non. Dans cette technique, l'inoculum est prélevé à l'anse calibrée (figure7). 1 ou 10 µl est d'abord déposé selon un trait (I) en bordure de la boîte de Pétri. Ce dépôt est ensuite repris par une série de stries jointives sur la moitié de la boîte (II) (on peut sans inconvénient repasser sur la strie précédente). Une autre série de stries jointives est réalisée sur le 3^{ème} quadrant (III) en rechargeant au début dans le quadrant II. Enfin le quadrant IV estensemencé, toujours par stries jointives, sans repasser dans le quadrant I et III depuis l'extérieur vers l'intérieur de la boîte.

Les colonies qui se développent sont parfaitement séparées les unes des autres dans le dernier quadrant si le milieu choisi et les conditions d'incubation (température, atmosphère) sont adéquats. Sans oublier les conditions aseptiques dans lesquelles la manipulation doit être faite.

21 Projet de fin d'étude : KouzeybraLababidi R : ECBU, Laboratoire Mutualiste d'Analyses Médicales- Casa, février 2005

22 Projet de fin d'étude : KouzeybraLababidi R : ECBU, Laboratoire Mutualiste d'Analyses Médicales- Casa, février 2005



Figure 6 L'anse calibrée

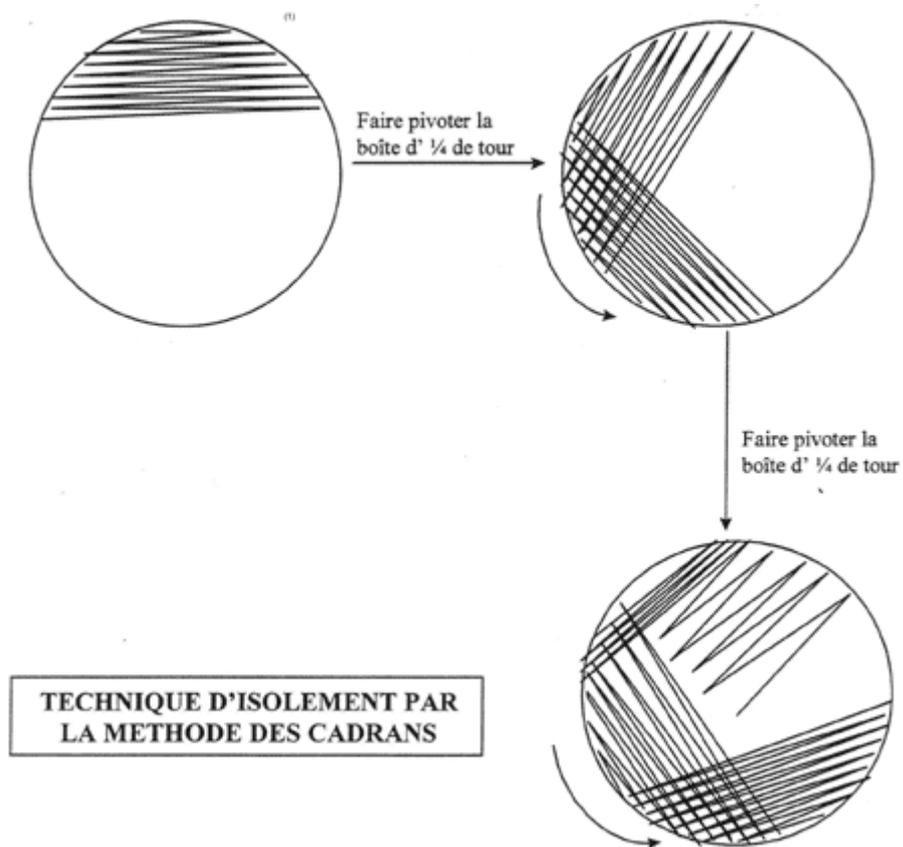


Figure 7 : Techniques d'épuisement

Pratiquement, on suit le protocole suivant :

- ✓ Noter la référence du flacon à analyser sur la boîte de Pétri.
- ✓ Flamber l'anse puis la refroidir, éventuellement dans le couvercle de la boîte de Pétri.
- ✓ Déboucher le flacon du produit à analyser dans la zone stérile du bec bunsen et garder le capuchon dans la main droite.

- ✓ Prélever l'inoculum à l'aide de l'anse.
 - ✓ Refermer le flacon de prélèvement.
 - ✓ Ouvrir la boîte de Pétri du côté de la flamme, en la tenant par la main gauche et ensemercer selon le schéma de la figure 8.
 - ✓ Fermer la boîte pour pouvoir la tourner pour l'ensemencement de chacun des quadrants.
 - ✓ Flammer l'anse, puis incuber la boîte de Pétri couvercle en bas (pour éviter que l'eau de condensation ne tombe sur la gélose).
- ✚ Procédé de lame immergé

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

Elle consiste à ensemercer par trempage dans les urines pendant quelques secondes, d'une lame avec deux milieux gélosés, coulés sur un même support (2faces), l'une avec gélose non sélective et l'autre sélective pour les bacilles Gram (-).[23]

✓ Deuxième jour

II.2.5. Dénombrement des germes urinaires :

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

- Compte au DGU :

La numération des bactéries dans les milieux de la lame immergée se fait principalement sur milieu CLED en raison de son caractère non sélectif.

Le compte des germes est réalisé en dénombrant les « unités formant colonies »(UFC) sur le milieu CLED : les bactéries donnent naissance à une colonie visible si leur nombre est supérieur à 10³, ensuite on compare la densité des colonies présentes sur la gélose à celle du schéma fourni par Biomérieux (voir annexe)

En général l'interprétation de la bactériurie est basée sur les travaux de KASS (1956) :

23 Projet de fin d'étude N° : 467. Ouenzar Faissal : ECBU étude statistique des germes et leurs antibioresistance, 2004

- Bactériurie < 10³ CFU / ml : absence d'infection.
- Bactériurie > 10⁵ CFU / ml : infection probable.
- Bactériurie 10³ et 10⁴ CFU / ml : zone d'incertitude (valeurs à contrôler si besoin).

II.2.6. Identification des bactéries :

L'identification est l'étape qui précède toujours l'antibiogramme, elle est effectuée par la méthode conventionnelle, à l'aide de l'automate Phoenix® 100 (Becton Dickinson) ou à l'aide de la galerie Api 20E.

L'identification est orientée par l'examen des frottis colorés au Gram effectués à partir des différents types de colonies isolées. A cet égard, il faut souligner que le succès de l'identification du germe pathogène repose sur le prélèvement des colonies sur le milieu de culture, car un prélèvement erroné d'une autre souche bactérienne conduirait à un antibiogramme erroné et par conséquent, à une prescription thérapeutique inadéquate.[24]

- Le test de catalase
 - Principe :

La catalase est une enzyme catalysant la dismutation de l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène)
 $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$

Il s'agit de mettre en contact une colonie de la bactérie à étudier en présence eau d'oxygénée, Une effervescence (dû à un dégagement de dioxygène) signe la présence d'une catalase. La recherche de la catalase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à Gram +.

- Méthode :

-Déposer une goutte d'eau oxygénée sur une lame.

- Déposer, à l'aide de l'anse de platine, une colonie isolée (ou plusieurs si petites colonies) de la souche à tester.

-Observer l'apparition de bulles.

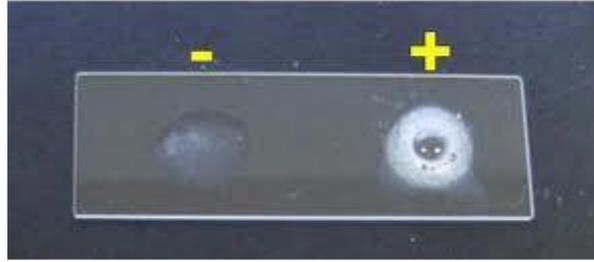


Figure 8 : Résultat de test catalase

- Le test de coagulase

- Principe :

Ou staphylocoagulase est une enzyme capable de faire coaguler le plasma sanguin.

- Méthode :

On ensemence quelques colonies dans bouillon BHI et puis on incube à 37°C pendant 24h, après 24h on ajoute 300µl du plasma de lapin, et on incube à 37°C pendant 24H. Si le fibrinogène, soluble dans le plasma, se transforme en fibrine solide, un caillot se formera au fond du tube.

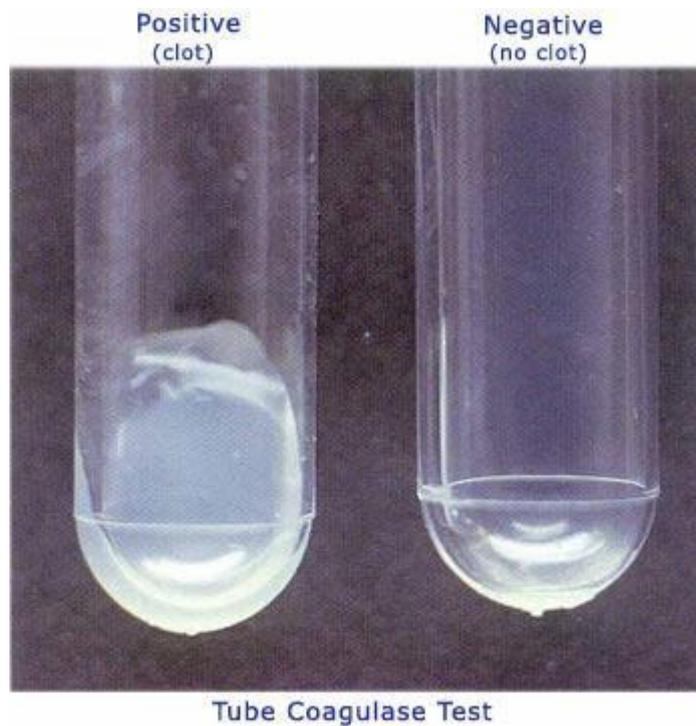


Figure 9 : Résultat de test coagulase

a. La galerie Api 20E :

On réalise 20 tests pour avoir le plus de caractères possibles de manière à identifier de façon plus certaine les différentes Entérobactéries.



Figure 10 : La galerie Api 20E

Présentation de la galerie :

La galerie Api 20E comporte 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux à une turbidité bien définie selon Mac farland. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par additions de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture d'identification qui est obtenu avec le catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

Mode opératoire :

- La préparation de l'inoculum nécessite le prélèvement à l'aide de l'anse d'une seule colonie bien isolée, on la met en suspension dans 5ml d'eau physiologique stérile et on l'homogénéise.
- On répartit un peu d'eau distillée dans les alvéoles de la plaque d'incubation pour créer une atmosphère humide et on inscrit la référence de la souche sur la languette latérale de la plaque.
- On remplit avec la suspension grâce à une pipette, tubes et cupules des tests CIT, VP, GEL.
- De la même manière on remplit les tests ADH, LDC, ODC, H2S, URE, avec la suspension bactérienne, tout en créant une anaérobiose en remplissant leur cupule avec l'huile de paraffine.
- On remplit uniquement les tubes et non pas les cupules des autres tests avec la suspension bactérienne.
- On referme la plaque et on l'incube à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

II.2.7. Interprétation de l'ECBU :

C'est une partie très importante de l'ECBU. Elle s'appuie sur : la leucocyturie, la bactériurie, la nature des espèces en cause et le fait que l'on retrouve un seul ou plusieurs types de bactéries à la culture.

Le tableau ci-dessous résume les différentes situations qui peuvent être rencontrées et la conduite à suivre.

Tableau 2 : Interprétation de l'ECBU

Leucocyturie	Bactériurie	Types de colonie	Eventualités Interprétation	Suites Conduites
Non	Non	0	ECBU stérile	Normal
Oui	Non	0	Traitement antibiotique Bactérie exigeante (BK) Leucocytes génitaux	A refaire et adapter les techniques
Non	Oui	Une sorte	Infection débutante Infection aplasique Contamination	Identification et antibiogramme ou à contrôler
Oui	Oui	Une sorte	Infection typique	Identification et antibiogramme
Non	Non	>1	Souillure	Aucune
Oui	Non	≥ 2	Infection sur sonde ?	A contrôler
Non	Oui	≥ 2	Souillure	Aucune
Oui	Oui	≥ 2	Infection polymicrob. ?	A refaire

II.2.8. L'antibiogramme :

Principe :

L'antibiogramme consiste à déposer à la surface d'une gélose (généralement le milieu d'isolement Mueller-Hinton) ensemencé par la souche bactérienne à étudier, des disques de papier filtre imprégnés des antibiotiques à tester. Ces derniers diffusent dans la gélose à partir des disques sources. Il s'établit ainsi un gradient de concentration d'antibiotique au sein de la gélose. Ces concentrations sont inversement proportionnelles à la distance du disque. Près de ce dernier, où il y a une forte concentration d'antibiotique, la bactérie est inhibée et ce, jusqu'à une distance correspondant à une concentration dans la gélose égale à la CMI du germe vis-à-vis de cet antibiotique.

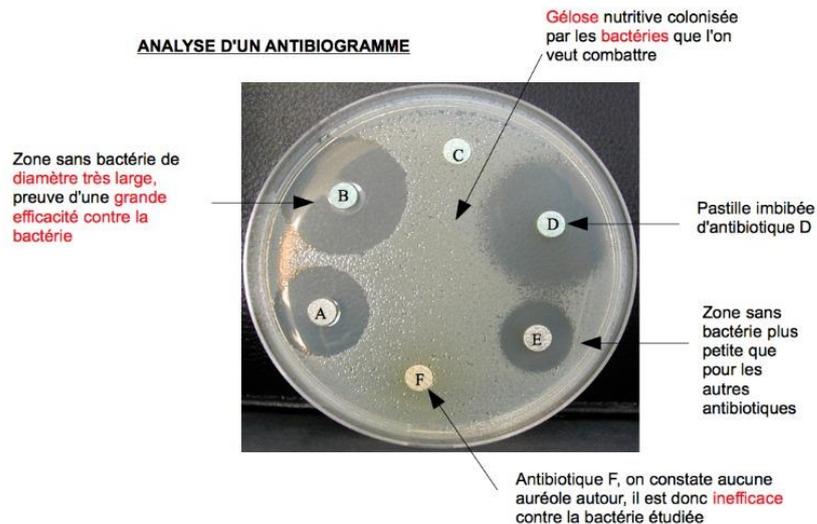


Figure 11 : Analyse d'un AntibioGramme

Lorsque la technique est parfaitement standardisée, les diamètres des zones d'inhibition dépendent uniquement de la sensibilité du germe. [25]

➤ Mode opératoire :

- On prélève à l'aide d'une anse d'ensemencement une colonie à partir du milieu EMB (pour les BGN ou PBC pour les cocci GP) et on la met dans environ 5 ml du bouillon BHI.
- On ensemence par inondation la surface du milieu Muller-Hinton avec la suspension bactérienne.
- On élimine l'excès du liquide en inclinant la boîte, avec aspiration des dernières gouttes à l'aide d'un papier.
- On sèche la boîte à 37 °C environ 5min.
- On dépose les disques d'antibiotiques sur la gélose à l'aide d'une pince flambée, à 15 mn du bord de la boîte, en appuyant légèrement pour assurer le contact avec la gélose.
- La boîte est immédiatement placée dans l'étuve à 37 °C pendant 16 à 18 h.

✓ **Troisième Jour**

II.2.9. Lecture des résultats :

On fait la lecture de l'antibiogramme et la galerie Api 20E :

a. Lecture de l'antibiogramme :

Les résultats quantitatifs (CMI en $\mu\text{g/ml}$) sont le plus souvent interprétés par les laboratoires en termes de possibilité thérapeutique. Cette interprétation consiste à comparer les valeurs des CMI avec les concentrations critiques établies pour chaque antibiotique.

Schématiquement, la concentration critique supérieure correspond à la plus grande quantité d'antibiotique actif que l'on peut obtenir dans le sérum et les tissus à la suite d'un traitement effectué à la posologie habituelle et la concentration critique inférieure correspond à la plus faible concentration humorale et tissulaire d'antibiotique actif.

La lecture s'effectue en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition avec une règle, cette distance est reportée sur l'échelle de concordance correspondante :

- Si le diamètre mesuré est inférieur au diamètre correspondant à la concentration critique supérieure, la souche est résistante.
- Si le diamètre mesuré est supérieur au diamètre correspondant à la concentration critique inférieure, la souche est sensible.
- Si le diamètre mesuré est compris entre les diamètres correspondant aux deux concentrations critiques, la souche est de sensibilité intermédiaire.

La confrontation des CMI aux concentrations critiques permet donc aux laboratoires de donner les résultats sous la forme de bactérie sensible, intermédiaire ou résistante à un antibiotique.

Selon le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, les définitions de bactérie sensible, intermédiaire ou résistante sont les suivantes :

- Une souche sensible (grand diamètre) est une souche pour laquelle la probabilité de succès thérapeutique est forte dans le cas d'un traitement par voie systémique avec la posologie recommandée dans le résumé des caractéristiques du produit (RCP).
- Une souche de sensibilité intermédiaire (diamètre moyen) est une souche pour laquelle le succès thérapeutique est imprévisible. Ces souches forment un ensemble hétérogène pour lequel les résultats obtenus *in vitro* ne sont pas prédictifs d'un succès thérapeutique.

- Une souche résistante (petit diamètre) est une souche pour laquelle il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quel que soit le type de traitement et la dose d'antibiotique utilisée.[26]

b. Lecture de la galerie Api 20E :

Après incubation, la lecture doit se faire en révélant les réactions de la galerie par des réactifs spécifiques. Le profil biochimique est transformé en profil numérique et à l'aide d'un catalogue, on détermine le nom de l'espèce bactérien

La lecture se fait de la manière suivante :

Sur la fiche de résultat ci-dessous, les tests sont séparés par groupe de trois, et une valeur de 1,2 ou 4 est indiqué pour chacun.

La galerie Api 20E comporte 20 tests, en additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres ; la réaction d'oxydase qui constitue le 21^{ème} test est affectée de la valeur 4 quand elle est positive.

NB : Si l'identification et ATB sont effectués par l'automate le rapport final est donné directement par l'appareil.

Résultats et discussion

Les résultats de cette étude portent sur 281 échantillons d'urines reçues au laboratoire de bactériologie de CHU Hassan II de Fès sur une période de 12 mois, provenant de différents services de Pédiatrie de CHU où des enfants âgés de 1 jour à 15 ans reçus en consultation.

Il s'agit d'une étude menée à partir du registre de l'ECBU positif, dans le but est de déterminer les entérobactéries en cause de l'infection urinaire, et préciser leur niveau de résistance vis-à-vis des antibiotiques testés, à savoir les familles de β -lactamines, les quinolones et les sulfamides.

I. Résultats :

I.1. Répartition l'IU selon le sexe :

Sur 281 ECBU positifs, on a trouvé que :

175 patients, soit 62 % des cas sont de sexe féminin.

106 patients, soit 38 % sont de sexe masculin.

La figure ci-dessous montre la répartition de l'infection urinaire selon le sexe.

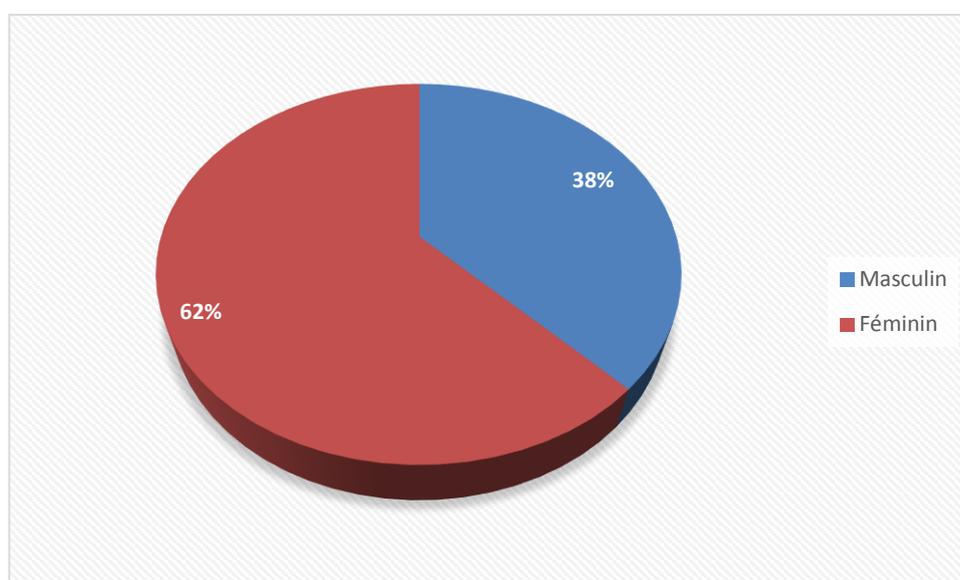


Figure 12 : Répartition de l'infection urinaire selon le sexe

On remarque que le pourcentage de l'infection urinaire est de l'ordre de 62 % chez le sexe féminin, alors que chez le sexe masculin, il est de l'ordre de 38 %.

On peut conclure que les patients de sexe féminin sont plus susceptibles à l'infection urinaire que les patients de sexe masculin.

Le calcul de la sex-ratio fille/garçon de 1,65. Donc l'infection urinaire en service Pédiatrique est une pathologie à dominance féminine.

II.3. Répartition des patients selon l'âge :

Nous avons étudié la répartition de notre échantillon d'étude selon l'âge. Les résultats obtenus sont illustrés ci-dessous :

Tableau 3 : Répartition des patients selon l'âge

Age (Jour à Ans)	Nombre des patients	Pourcentage
Nouveau-nés/Nourrissons	141	50
Enfants	140	50

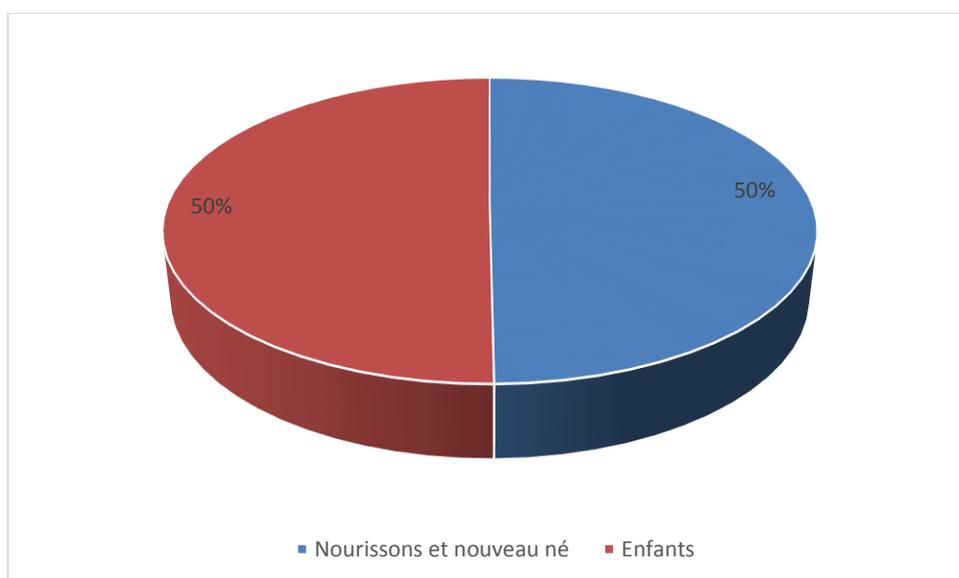


Figure 13 : Répartition des patients selon l'âge

D'après le tableau et la figure 2, on remarque que l'infection urinaire touche tous les enfants tout âge confondu. On peut remarquer que les nouveau-nés, les nourrissons et les enfants représentent un pourcentage identique d'atteinte par infection urinaire.

II.4. Répartition des entérobactéries en fonction des services :

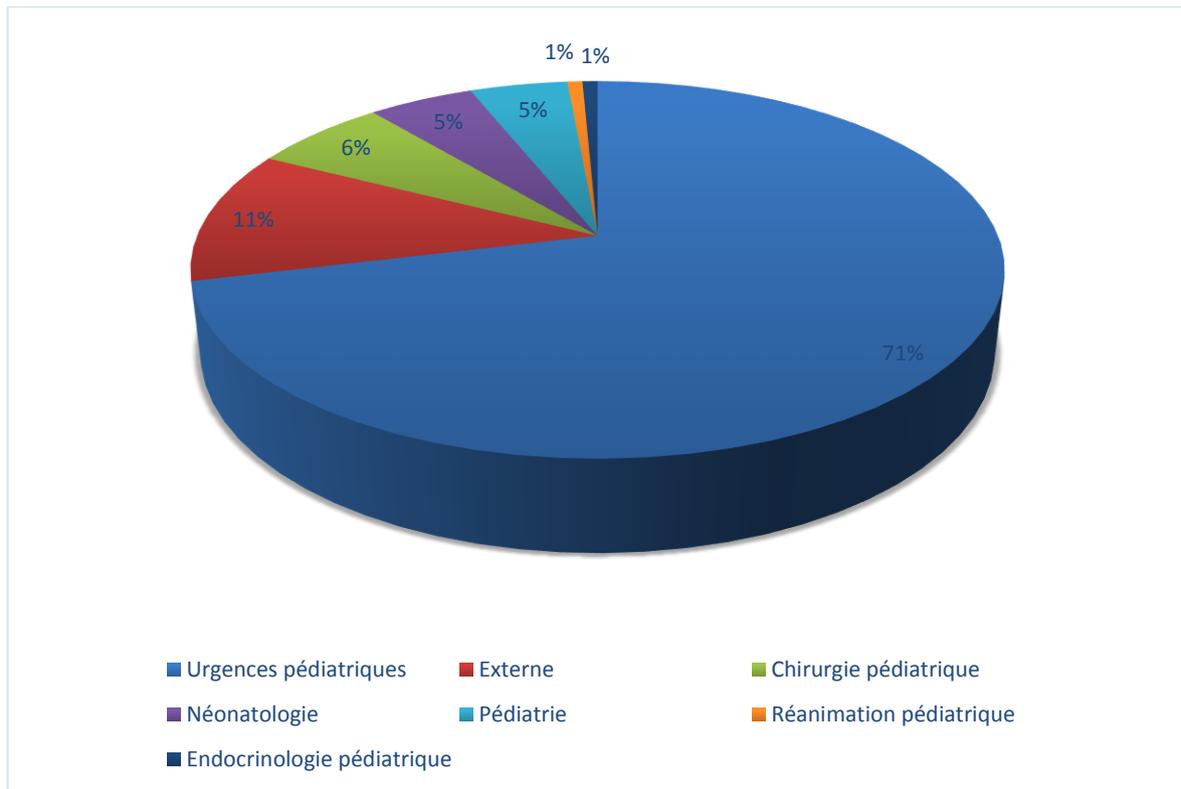


Figure 14 : Distribution des ECBU positifs selon leur provenance des différents services hospitaliers et externes

La répartition des différents échantillons d'urine reçue au laboratoire provient à 89 % des différents services de Pédiatrie à savoir les urgences pédiatriques, la chirurgie pédiatrique, la néonatalogie, l'endocrinologie et la réanimation. Les 11 % qui restent sont des ECBU correspondant à des enfants en consultation externe.

Les services les plus touchés sont par ordre décroissant : les urgences pédiatriques avec une prévalence élevée de l'ordre de 71 %, suivi par le service de chirurgie pédiatrique avec une prévalence de 6 %, la Néonatalogie et Pédiatrie arrivent ensuite avec un pourcentage de 5 %.

Les infections sont peu fréquentes dans les services de réanimation et endocrinologie pédiatrique avec un taux de 1 %.

II.5. Répartition de l'IU selon les espèces d'entérobactéries :

Nous avons étudié la répartition de l'infection urinaire chez différentes espèces d'entérobactéries à savoir : *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* et *Enterobacter cloacae*. Les résultats de la répartition des entérobactéries sont représentés sur la figure ci-dessous :

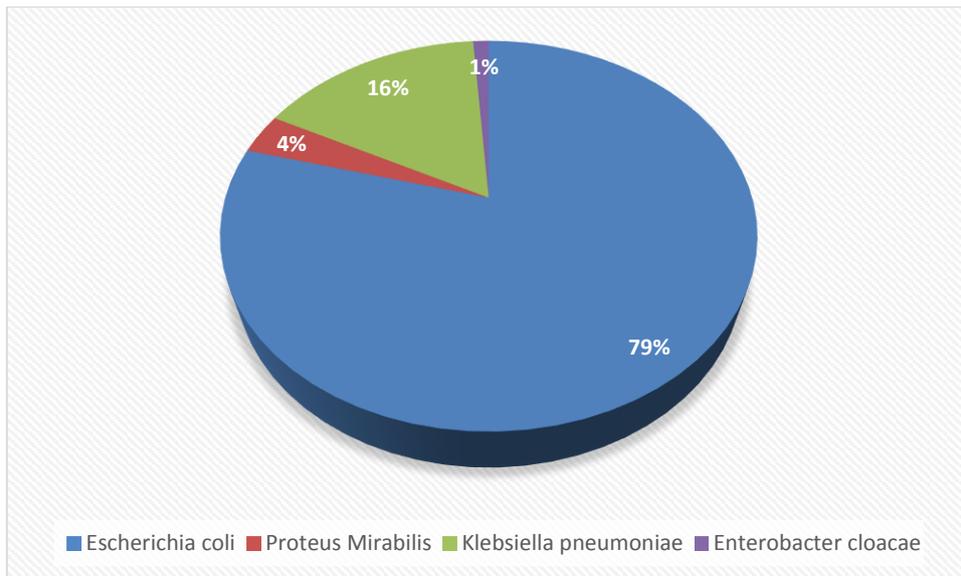


Figure 15 : Fréquence des entérobactéries responsables de l'infection urinaire

D'après les résultats on remarque que :

Sur les 281 bactéries identifiées, 256 échantillons soit 91 % sont des entérobactéries uropathogènes.

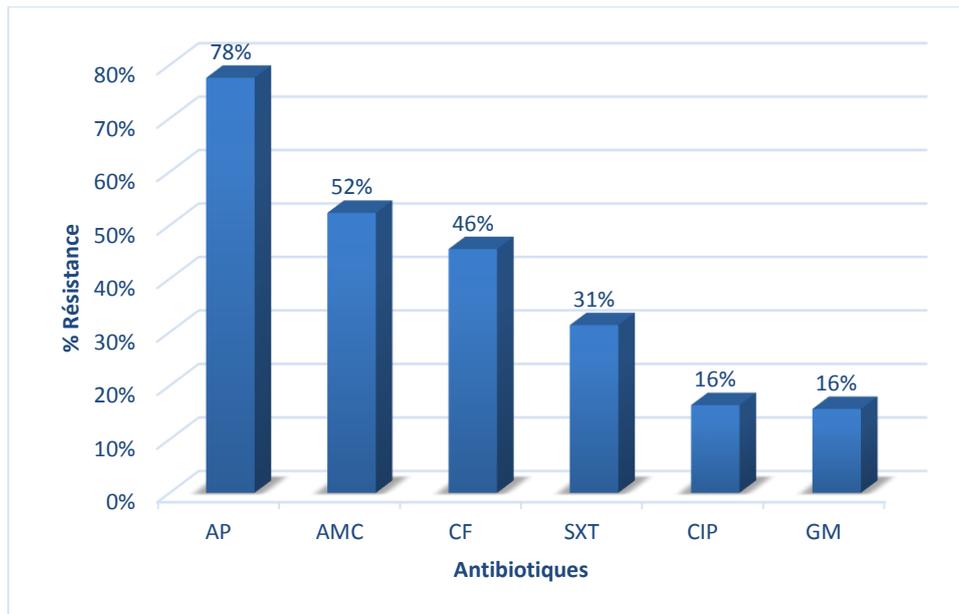
Les entérobactéries dominent avec *E. coli* en tête (79 %), suivies par *Klebsiella pneumoniae* (16 %).

La fréquence des autres germes était plutôt négligeable, avec *Proteus mirabilis* (4 %) et *Enterobacter cloacae* avec une fréquence de 1 %.

II.6. Profil de résistance aux antibiotiques :

Sur les 281 échantillons étudiés, L'antibiogramme effectué sur chaque espèce des entérobactéries a permis d'étudier leurs profils de résistance vis-à-vis des antibiotiques testés à savoir : les aminopenicillines, l'association amoxicilline+Acide clavulanique, les céphalosporines de 3^{ème} génération, ciprofloxacine, gentamicine, et l'association sulfaméthoxazole-triméthoprime.

La figure 5 représente les résultats obtenus :



AP : Aminopénicillines **AMC** : Amoxicilline + Acide Clavulanique **CF** : Céfaloine **SXT** : Sulfaméthoxazole + Triméthoprimine **CIP** :Ciprofloxacine **GM** : Gentamicine

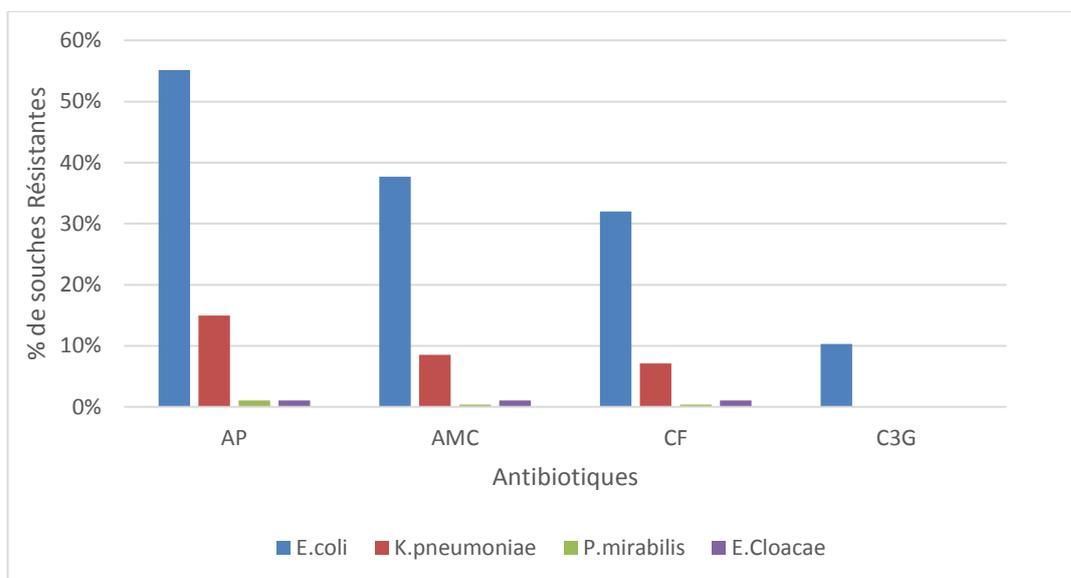
Figure 16 : Profil de résistance aux antibiotiques des entérobactéries uropathogènes isolées chez l'enfant au CHU Hassan II de Fès

La prévalence de la résistance des entérobactéries aux aminopénicillines est de 78%. Elle est de 52 % pour l'association amoxicilline+Acide clavulanique. 46% des souches isolées sont résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération.

Les taux de résistance à la gentamicine, à l'association sulfaméthoxazole-triméthoprimine, et à la ciprofloxacine sont respectivement de 16%, 31% et 16% (figure 5).

II.6.1. Résistance des espèces d'entérobactéries aux β -lactamines :

Bêta-lactamines actuellement classées par sous-famille à savoir les pénicillines qui sont présentés par les molécules : Amoxicilline + Acide Clavulanique et aminopénicillines, la famille de Céphalosporines qui se sont présentés par les molécules : Céfaloine et céphalosporine de 3^{ème} génération.



AP : Aminopénicillines **AMC** : Amoxicilline + Acide Clavulanique **CF** : Céfalotine

C3G : Céphalosporines de troisième génération

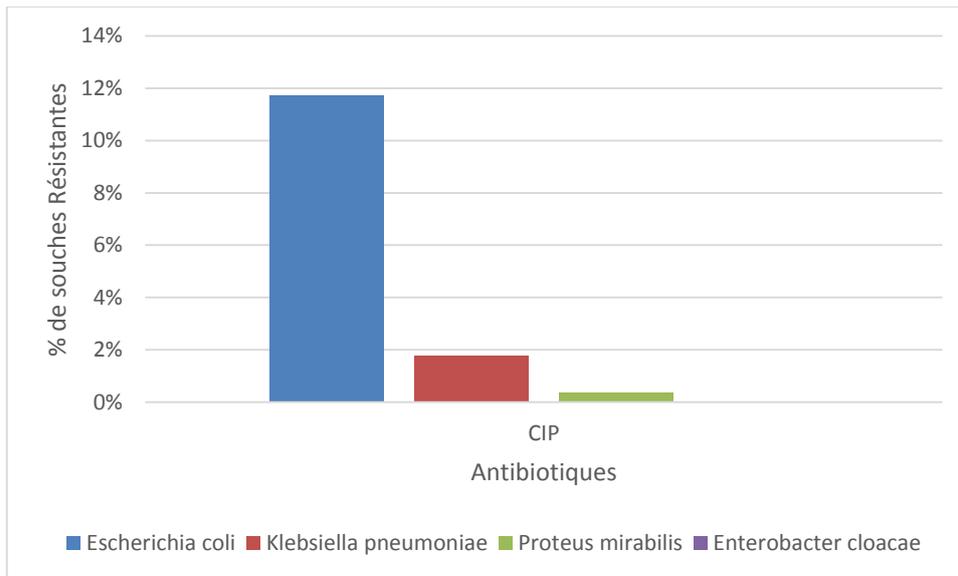
Figure 17 : Résistance aux β -lactamines de souches entérobactéries

E. coli présente une résistance importante avec des pourcentages de 55% et 38% respectivement pour aminopénicillines et l'association amoxicilline +Acide clavulanique.

Les céphalosporines de 3^{ème} génération et les céphalosporines de 1^{ère} génération qui sont présentés par la molécule de céfalotine, se sont montrés les antibiotiques les plus actifs sur les souches testées à savoir la souche de *Klebsiella*, suivi d'*Enterobacter* et *Proteus*, soit un taux de résistance quasiment nul.

II.6.2. Résistance des espèces d'entérobactéries aux quinolones :

Les quinolones sont des antibiotiques bactéricides rapides, représentés par plusieurs antibiotiques à savoir l'antibiotique Ciprofloxacine (CIP).



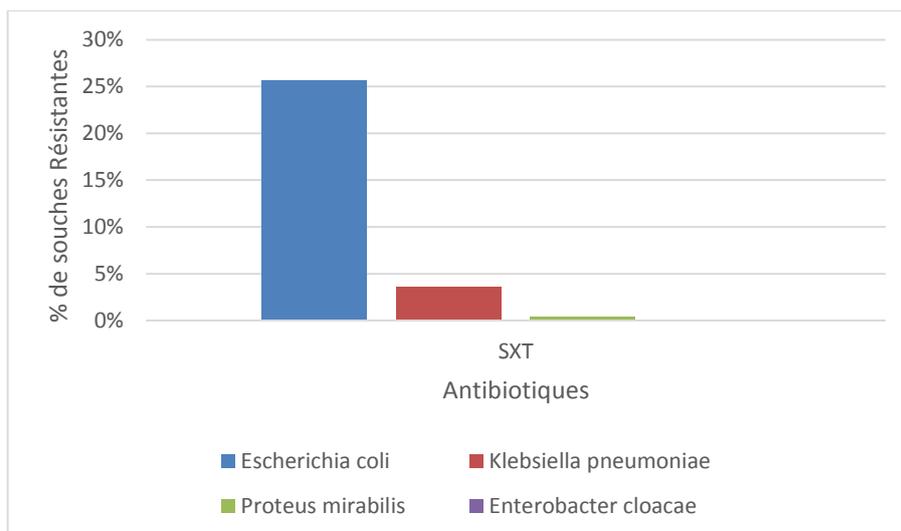
CIP : Ciprofloxacine

Figure 18 : Résistance aux Quinolones de souches entérobactéries

La résistance de souches E. coli au ciprofloxacine est de 12%, alors qu'elle est de 2% pour Klebsiella pneumoniae. Les souches Proteus mirabilis et Enterobacter cloacae étaient sensibles aux Quinolones.

II.6.3. Résistance des espèces d'entérobactéries aux sulfamides :

- Les sulfamides sont des substances soufrées qui permettent de lutter contre les **infections**, représentés par l'antibiotique Triméthoprime-sulfamides (SXT).



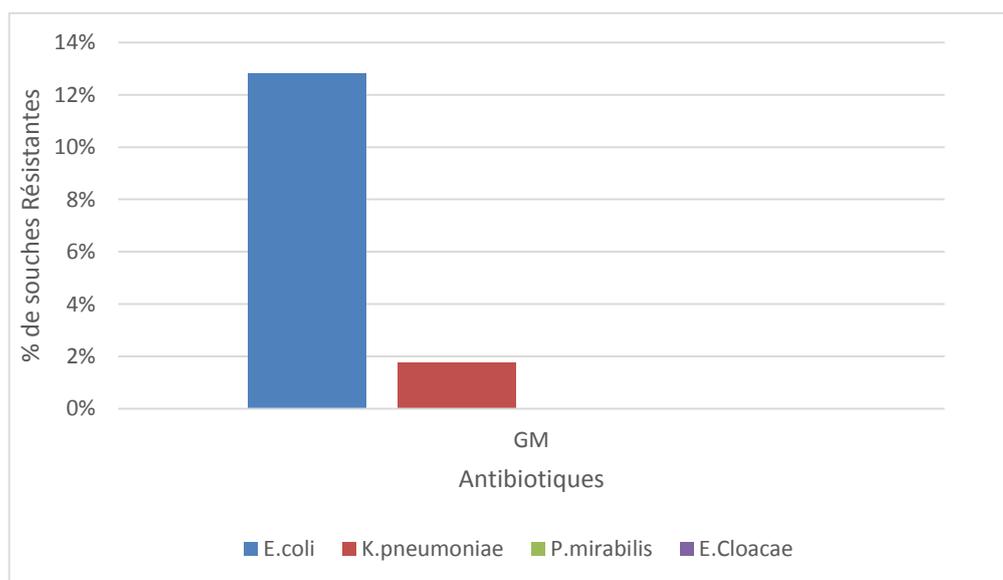
SXT : Sulfaméthoxazole + Triméthoprime

Figure 19 : Résistance aux sulfamides des entérobactéries

Seul *E. coli* présente une résistance aux sulfamides avec un taux de 25 %, alors que on ne note aucune résistance pour les autres souches des entérobactéries.

II.6.4. Résistance des espèces d'entérobactéries aux Aminosides

Les aminosides sont des antibiotiques bactéricides utilisables en première intention par voie parentérale dans les infections sévères à germes Gram négatif aérobies. Présentés par différents antibiotiques à savoir la Gentamycine.



GM : Gentamicine

Figure 20 : Résistance aux Aminosides de souches entérobactéries

On remarque que seul *E. coli* présente une résistance aux Aminosides avec un taux de 13 %, alors que on ne note aucune résistance pour les autres souches des entérobactéries.

III.Discussion :

Cette étude porte sur 281 ECBU positifs d'enfants âgés de 1 jour à 15 ans reçus pendant une période de 1 an ; en consultation dans différents services de Pédiatrie de CHU Hassan II de Fès.

Des identifications et des antibiogrammes sur les germes en cause de l'infection urinaire, en vue d'étudier leur résistance vis-à-vis des antibiotiques sélectionnés ont été réalisés.

L'infection urinaire est une des infections bactériennes les plus fréquentes en pédiatrie ; ces signes et symptômes sont souvent non spécifiques, en particulier chez le nouveau-né et le nourrisson. Elle revête une importance particulière pendant l'enfance parce qu'elle est responsable d'une

morbidité considérable pendant la phase aiguë de la maladie. De plus, à long terme, elle peut être responsable d'insuffisance rénale. Le traitement de l'infection urinaire chez l'enfant est soumis au problème de l'antibiorésistance croissante des bactéries impliquées dans cette infection ce qui limite le choix des antibiotiques.

L'étude en fonction de ces infections urinaires selon le sexe a montré une dominance féminine avec 62 %. Ceci peut être expliqué par la faible longueur de l'urètre chez la femme, la proximité de l'orifice vaginal de la femme et l'orifice urétral, certaines habitudes d'hygiène qui facilitent la colonisation du vagin et de l'urètre par des bactéries d'origine digestive.

L'étude concernant la nature des germes isolés qui interviennent dans l'infection urinaire, nous avons noté la prédominance des entérobactéries avec un taux de 91 %. Et en premier rang *E. coli* avec une proportion de 79 %, suivi de *Klebsiella* avec un taux de 16%, les autres sont représentés par (*Pseudomonas*, *Enterobacter*). Ces résultats rejoignent ceux de la littérature. Cependant une étude réalisée à l'Hôpital mère-enfant au CHU Mohamed VI de Marrakech sur une durée de deux ans (du janvier 2012 à décembre 2013), incluant 2258 échantillons urinaires, 406 souches d'entérobactéries ont été isolées. Montre que l'âge moyen était de 29 mois. Le sex-ratio fille/garçon de 1,04. *Escherichia coli* a dominé le profil épidémiologique (55 %) suivi de *Klebsiella pneumoniae* (30 %).[27]

Quel que soit le germe isolé, l'antibiogramme est indispensable, permettant d'adapter le traitement et de déceler la résistance bactérienne.

L'étude de la résistance des souches vis-à-vis des antibiotiques sélectionnés, a montré qu'*E. coli* présente une très bonne résistance aux β -lactamines, et aux sulfamides. De ce fait ces antibiotiques ne sont plus prescrits pour le traitement thérapeutique de l'infection.

Avec les souches d'*E. coli* isolés, 55% sont résistantes à l'amoxicilline et 38 % à l'association amoxicilline+Acide clavulanique. Le principal mécanisme de cette résistance est la production d'une pénicillinase par la bactérie, capable d'hydrolyser les aminopénicillines. Selon le niveau de production de pénicillinase (élevé ou faible), l'association amoxicilline+ Acide clavulanique (Augmentin) est plus ou moins active.[28]

1. 27La résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries uropathogènes en milieu pédiatrique au CHU de Marrakech

28Projet de fin d'étude ; N° 500, Boulaleh A : ECBU à l'institut d'hygiène de Rabat, 2004

En ce qui concerne les *Proteus* et les *Enterobacter*, nous avons relevé une faible résistance à la plupart des antibiotiques utilisés : aminosides, β -lactamines, ainsi les quinolones.

La ciprofloxacine et à la gentamycine ont exercé une bonne activité sur les entérobactéries, alors que l'amoxicilline a montré une activité médiocre sur la majorité des germes.

IV. Conclusion :

La résistance aux antibiotiques constitue aujourd'hui l'une des plus graves menaces pesant sur la santé mondiale. Elle atteint désormais des proportions dangereuses dans toutes les régions du monde. Chaque jour de nouveaux mécanismes de résistance voient le jour et se propagent à l'échelle mondiale, compromettant notre capacité de traiter les maladies infectieuses les plus courantes.

Notre étude a été menée sur 281 des patients qui ont une infection urinaire, pour lesquels nous avons réalisé des antibiogrammes. Le présent travail avait pour objectif de déterminer la fréquence de la résistance aux antibiotiques ne cesse de s'accroître conduisant parfois à des impasses thérapeutiques. Les résultats ont montré que La consommation abusive des antibiotiques fait croître les résistances bactériennes surtout pour les antibiotiques de prescription courante. Une prescription rationnelle des antibiotiques, une amélioration de l'hygiène hospitalière ainsi qu'une surveillance continue de l'évolution de la résistance bactérienne se révèlent nécessaires.

Enfin, ce stage m'a été très fructueux, il m'a permis de me familiariser avec un environnement technique, de confronter mes acquis théoriques à la réalité pratique du monde de l'entreprise et de voir en quoi consiste le travail d'un biologiste au sein d'un laboratoire d'analyses.

Bibliographie

Boulaleh, A. (2004). *ECBU à l'institut d'hygiène*. Rabat.

Bernar, D. (1999). *Abrégé en urologie*. édition Masson.

Faissal, O. (2004). *ECBU étude statistique des germes et leurs antibioresistance*.

KouzeybraLababidi. (2005). *ECBU*. Casa.

Neal, M. (2003). *Pharmacologie médicale*. 2ème édition française de Boeck.

Moutachakkira, M. (2015). *a résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries uropathogènes en milieu pédiatrique*. Marrakesh.

Paterson. (2003, Janvier). Comité de l'Antibiogramme de la Société française de Microbiologie.

Stahl, J. (2002). Infections urinaires nosocomiales de l'adulte. *Conférence de Consensus*.

WWW.SPIRAL.UNIV-LYON1.FR

WWW.CHUPS.JUSSIEU.FR

[HTTP://RESISTANCE-AUX-ANTIOTIQUES.EKLABLOG.FR/LES-DIFFERENTS-MODES-D-ACTION-DES-ANTIBIOTIQUES-A37610417?NOAJAX&MOBILE=0](http://RESISTANCE-AUX-ANTIOTIQUES.EKLABLOG.FR/LES-DIFFERENTS-MODES-D-ACTION-DES-ANTIBIOTIQUES-A37610417?NOAJAX&MOBILE=0)

WWW.UVP5.UNIV-PARIS5.FR/MICROBES/TECHNIQUE/ECBU/ECBU1.ASP

http://www.memoireonline.com/04/12/5736/m_L-examen-cytobacteriologique-des-urines7.html

Annexes

- **L'automate Phoenix® 100**
- **Coloration de Gram**
- **Composition des milieux de culture**
- **Soluté Dakin stabilisé**
- **Dénombrement des germes urinaires**

BD Phoenix™ ID/AST Manual Panel Inoculation

- 1** Open panel package.
INOCULATE WITHIN
2 HOURS.



- 2** Prepare Phoenix™ ID Broth.
Inoculate panel with prepared
ID Broth within (≤) 60 MINUTES.

PREPARE ID BROTH.

- Add organism to ID Broth.
- Vortex.
- Make .50 - .60 McFarland (Standard inoculum)*.
- OR
- Make .20 - .30 McFarland (Low inoculum)**.
- OR
- Make 2.00 - 2.40 McFarland (Yeast inoculum).



- 4** After panel inoculation, place closures
securely on the panel to seal.

Prepare Purity Plate.
Using a sterile loop,
recover a small drop from
the inoculum fluid either
before or after inoculating
the panel. Inoculate an agar
plate (any appropriate medium)
for purity check. Incubate plates
for 18 - 24 hours or 18 - 48 hours
for yeast, at 35°C under appropriate
conditions.



- 5** Load panel(s) into BD Phoenix instrument
within (≤) 30 MINUTES after inoculation.



- 3** Prepare Phoenix™ AST or AST-S Broth.
(ID/AST, AST Panels only)
Inoculate panel with prepared broth within (≤) 30 MINUTES.

PREPARE AST or AST-S BROTH***

- Add one free falling drop of AST or AST-S Indicator**** into AST or AST-S Broth. Tube can be used for up to 2 hours if exposed to light or up to 8 hours in the dark. Mix by inverting.
- Add 25 µL prepared ID Broth (Standard inoculum).
- OR
- Add 50 µL prepared ID Broth (Low inoculum).



- * Not applicable for yeast ID panels.
- ** Not applicable for strep or yeast ID panels.
- *** For gram-negative or gram-positive panels use Phoenix AST Indicator and AST Broth. For strep panels use Phoenix AST-S Indicator and AST-S Broth.
- **** AST or AST-S indicator is good for 14 days after opening (refrigerated).



BD Diagnostics
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152-0999
800.638.8663
www.bd.com/ids

BD, BD Logo and Phoenix are trademarks of
Becton, Dickinson and Company. ©2012 BD
2-222341 January 2012
SHQ-226

Coloration de gram

Principe

La coloration de Gram doit son nom au bactériologiste danois Hans Christian Gram

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer.

Voici successivement les différentes étapes de cette coloration :

- 1 : coloration par le violet de gentiane ou le cristal violet ;
- 2 : Mordançage au lugol (Solution d'iode iodo-iodurée) ;
- 3 : Décoloration (rapide) à l'Alcool (+acétone) ;
- 4 : Recoloration à la Safranine ou à la Fuschine.

Les étapes 1 et 2 colorent en violet le contenu de la bactérie.

L'étape 3 (alcool) décolore par dissolution les bactéries dont la paroi est riche en lipides. Les bactéries dont la paroi est pauvre en lipides conservent leur teinte violette foncée.

L'étape 4 est une contre-coloration ayant pour but de redonner aux bactéries précédemment décolorées une teinte rose permettant de les visualiser au microscope.

A l'issue de cette coloration, certaines bactéries apparaîtront en violet foncé et seront dites à «Gram positives», leur paroi s'est opposée (du fait de son épaisseur) au passage de l'alcool et ont donc conservé leur coloration violette ; d'autres apparaîtront en rose pâle et seront dites à «Gram négatives» leur paroi, plus fine et plus riche en lipides (phospholipides, LPS) laisse l'éthanol.

Technique :

- Réaliser un frottis et le fixer.
- Recouvrir la lame de violet de gentiane phénique durant une minute.
- Laver à l'eau distillée (non obligatoire).
- Recouvrir la lame d'une solution de lugol durant 30 secondes.
- Laver à l'eau distillée (non obligatoire).
- Recouvrir la lame d'éthanol à 0,95 durant 10 secondes.

- Laver rapidement et recouvrir la lame de fuschine phéniquée pendant 10 secondes si elle est concentrée ou une minute si elle est diluée.
- Laver à l'eau distillée.
- Observer après séchage à l'immersion et à pleine lumière.

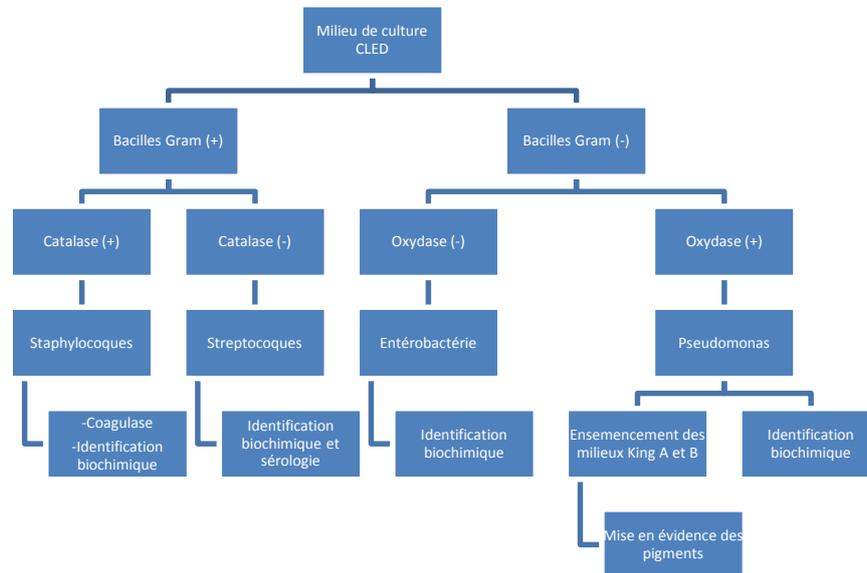


Schéma représentatif de la démarche à suivre selon le résultat de la coloration de Gram

Soluté de Dakin stabilisé

C'est une solution aqueuse antiseptique de couleur rosée constituée d'eau de Javel (Quantité correspondante à 5 grammes de NaClO (Hypochlorite de sodium) par litre de solution) et tamponnée par les excipients : le permanganate de potassium (0,01 g pour un litre de solution) et le dihydrogénophosphatedi-hydraté de sodium.

- **Spectre d'activité**

- Il y a un spectre d'activité étendu : Bactéries (formes végétatives et sporulées), champignons, levures, virus (nus et enveloppés), spores.

- **Mode d'action**

- Le délai d'action est rapide, dès la première minute de contact.
- Le pouvoir oxydant provoque la destruction de protéines au niveau membranaire et chromosomique.

- **Indications**

- Antisepsie de la peau, des muqueuses et des plaies.
- Impropre à la désinfection du matériel médico-chirurgical.
- Les agents à viser antiseptique ne sont pas stérilisants, ils réduisent temporairement le nombre de micro-organismes.

Composition des milieux de culture

Milieu BCP

Peptone	5g
Extrait de viande	3g
Lactose	10g
Agar	15g
Poudre de bromocrésol	0,025g
Eau distillée	11
Ph	6,8

Milieu EMB

Peptone	10g
Lactose	10g
Eosine	0,4g
Bleu de méthylène	0,065g
Hydrogénophosphate de potassium	2g
Agar	15g
pH	6,8

Milieu CLED

Peptone	4g
Extrait de viande	3g
Hydrolysât trypsique de caséine	4g
L-cystine	0,128
Lactose	10g
Bleu de bromothymol	0.02g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

Milieu BCP

Peptone	11g
Extrait de viande	1g
Chlorure de sodium	75g
Mannitol	10g
Rouge de phénol	0,025g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

Milieu Muller Hinton

Infusion de viande de bœuf	300g
Hydrolysât de caséine	17,5g
Amidon	1,5g
Agar	17g
Eau distillée	1000ml
pH	7,3

Dénombrement des germes urinaires

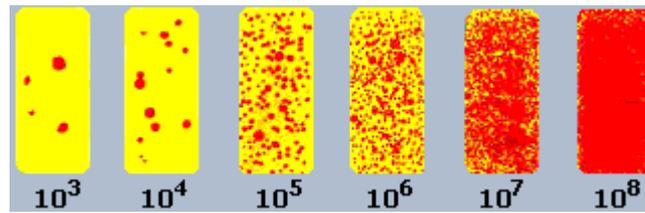


Schéma de Biométrieux

L'interprétation de la bactériurie est basée sur les travaux de de KASS (1956) :

- Bactériurie $< 10^3$ CFU / ml : absence d'infection.
- Bactériurie $> 10^5$ CFU / ml : infection probable.
- Entre 10^3 et 10^4 CFU / ml : zone d'incertitude (valeurs à contrôler si besoin).