

Module : Microbiologie Clinique
Niveau : Master 1 Microbiologie Appliquée
Enseignant : Dr. Charifi Samia

Université Mohamed Khider Biskra
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie
Matière : Microbiologie Clinique
Niveau : Master 1 Microbiologie Appliquée
Année universitaire 2024/2025

Durée: 3h

TP1 Examen cyto bactériologique des urines (ECBU)

Introduction

L'examen cyto bactériologique des urines (ECBU) est une analyse médicale couramment prescrite pour évaluer la santé de l'appareil urinaire. Cette procédure consiste à recueillir un échantillon d'urine et à le soumettre à divers tests en laboratoire afin de détecter la présence éventuelle de bactéries, de cellules anormales ou d'autres signes d'infection ou de troubles urinaires.

L'ECBU est souvent prescrit en cas de symptômes tels que douleur en urinant, fréquence urinaire anormale, sensation de brûlure, présence de sang dans l'urine ou toute autre indication d'une possible infection urinaire ou d'un problème de santé lié aux voies urinaires.

Les résultats de l'ECBU peuvent aider les médecins à diagnostiquer et à traiter efficacement les infections urinaires et d'autres affections associées. En fonction des résultats, un traitement approprié, tel qu'une antibiothérapie, peut être prescrit pour traiter l'infection et soulager les symptômes du patient.

En résumé, l'ECBU est une analyse essentielle pour évaluer la santé urinaire, permettant ainsi aux professionnels de la santé de poser des diagnostics précis et d'administrer des traitements adaptés aux besoins individuels des patients.

1. Matériel de prélèvement et de préparation :

- **Récipients stériles** pour le prélèvement des urines.
- **Lames de microscope** et **lamelles** pour l'observation au microscope.
- **Milieux Chromogènes , MacConkey**
- **Boîtes de Pétri stériles** pour l'ensemencement.
- **Boucles d'ensemencement** (1 μ L et 10 μ L).
- **Étuve** (37 °C) pour l'incubation.

2. Réactifs et consommables :

- **Colorants pour coloration de Gram** (cristal violet, lugol, décolorant, safranine ou fuchsine).

- **Huile à immersion** (pour l'observation au microscope).
 - **Eau physiologique stérile** (pour les dilutions si nécessaires).
 - **Antibiogrammes** (disques imprégnés d'antibiotiques pour tester la sensibilité bactérienne).
-

3. Matériel pour les analyses :

- **Microscope optique** (pour observer les leucocytes, hématies, cylindres, cristaux, bactéries, etc.)
 - **Comptoir de colonies** (ou loupe pour faciliter le comptage des colonies).
 - **Milieux spécifiques pour antibiogramme** (la gélose Mueller-Hinton).
-

4. Organisation et sécurité :

- **Gants** et blouse de laboratoire.
 - **Désinfectant** (pour nettoyer les surfaces avant et après le TP).
 - **Marqueurs** pour identifier les boîtes de Pétri et les échantillons.
-

5. Protocole :

1. Recueillir l'urine de façon stérile dans un contenant propre et stérile. Il est recommandé de réaliser le prélèvement du milieu de jet après une toilette soignée des organes génitaux externes.
2. Étiqueter le contenant avec les informations du patient (nom, prénom, date de naissance, etc.).
3. Remplir correctement la fiche de demande d'examen avec les informations du patient et les indications cliniques.
4. Envoyer rapidement l'échantillon au laboratoire de microbiologie pour éviter toute altération.
5. Au laboratoire, agiter l'échantillon d'urine et réaliser une première observation macroscopique pour détecter d'éventuels signes d'infection (couleur, odeur, turbidité).
6. Inoculer l'urine sur les milieux de culture appropriés Milieu Chromogène à l'aide d'une boucle de microbiologie. Pour une meilleure détection des entérobactéries, une inoculation sur agar MacConkey peut être réalisée en parallèle.
7. Si l'urine est claire, réaliser une centrifugation à faible vitesse (2000 tours/minute pendant 5 minutes) pour concentrer les éventuels microorganismes présents.
8. Incuber les milieux de culture à la température appropriée (généralement 35-37°C) pendant une période spécifique (généralement 24 à 48 heures).
9. Après incubation, observer les colonies bactériennes formées sur les milieux de culture.
10. Réaliser une identification préliminaire des bactéries en se basant sur leur morphologie, leur couleur, et leur réaction à la coloration de Gram.

Module : Microbiologie Clinique
Niveau : Master 1 Microbiologie Appliquée
Enseignant : Dr. Charifi Samia

11. Effectuer des tests biochimiques supplémentaires si nécessaire pour confirmer l'identification des bactéries.
12. Rappporter les résultats à l'équipe médicale avec les recommandations appropriées pour le traitement.

6. Préparation de l'échantillon

1. **Centrifugation :**
 - Prenez 10 à 15 mL d'urine fraîche.
 - Centrifugez à 2000-3000 rpm pendant 5 minutes pour obtenir un culot.
 2. **Élimination du surnageant :**
 - Jetez délicatement le surnageant en conservant environ 0,5 mL avec le culot.
 3. **Re-suspension du culot :**
 - Mélangez doucement en agitant pour homogénéiser le culot.
 4. **Préparation de la lame :**
 - Déposez une goutte du culot sur une lame propre.
 - Couvrez avec une lamelle sans créer de bulles d'air.
-

7. Observation au microscope

- **Microscope recommandé :** Utilisez un microscope optique avec un objectif 10x pour le repérage, puis 40x pour les détails.

8. Prélèvement et ensemencement :

- Les urines stériles sont déposées sur une gélose chromogène à l'aide d'une boucle de 1 mL (pour évaluer le nombre d'unités formant colonie, UFC).
 - Incubation des boîtes pendant 24 heures à 37 °C.
 2. **Observation macroscopique :**
 - Lecture des résultats sur la gélose (colonies colorées spécifiques en fonction des bactéries présentes, ex. *E. coli* en rose).
 3. **Coloration de Gram :**
 - Une préparation microscopique est réalisée à partir d'une colonie isolée pour vérifier la morphologie bactérienne (cocci, bacilles, Gram + ou Gram -).
 4. **Antibiogramme :**
 - Si une bactérie pathogène est identifiée, un antibiogramme est réalisé pour évaluer la sensibilité aux antibiotiques.
 5. **Interprétation des résultats :**
 - Déterminer s'il y a une infection (le seuil d'infection est généralement $\geq 10^5$ UFC/mL pour les infections urinaires).
 - Identification du germe pathogène et propositions thérapeutiques.
-

9. Compte Rendu :

Veillez fournir un compte rendu détaillé des observations et résultats suivants :

1. Décrivez l'aspect **macroscopique** de l'échantillon d'urine frais avant la culture, après incubation, décrivez l'aspect des colonies observées sur les milieux chromogène et MacConkey.
2. Décrivez l'observation **microscopique** de l'échantillon d'urine frais avant culture en précisant le type d'éléments observés .
3. Après la coloration de Gram, décrivez la morphologie des bactéries observées sous **microscopie**, en précisant leur forme, leur arrangement et leur coloration. Déterminez si elles sont Gram positives ou Gram négatives . En fonction de la couleur observé sur milieu chromogène, quel est le contaminant probable ?
4. Calculez le nombre d'UFC (Unité Formant Colonie) par millilitre. Veillez expliquer le raisonnement derrière ce calcul et les résultats obtenus.
5. Si un antibiogramme a été réalisé, mesurez le diamètre des zones d'inhibition autour des disques antibiotiques sur les milieux de culture. En fonction des résultats obtenus, indiquez la sensibilité ou la résistance des bactéries aux antibiotiques testés. Proposez les antibiotiques les plus appropriés pour le traitement de l'infection, selon les résultats de l'antibiogramme.

L'ensemencement semi-quantitatif est une méthode utilisée principalement en microbiologie clinique, notamment pour **quantifier approximativement la concentration de bactéries dans un échantillon**

1. **Préparation :**

- Une anse calibrée (généralement de 1 μL ou 10 μL) est stérilisée et utilisée pour prélever l'échantillon liquide (urine, liquide céphalorachidien, etc.).

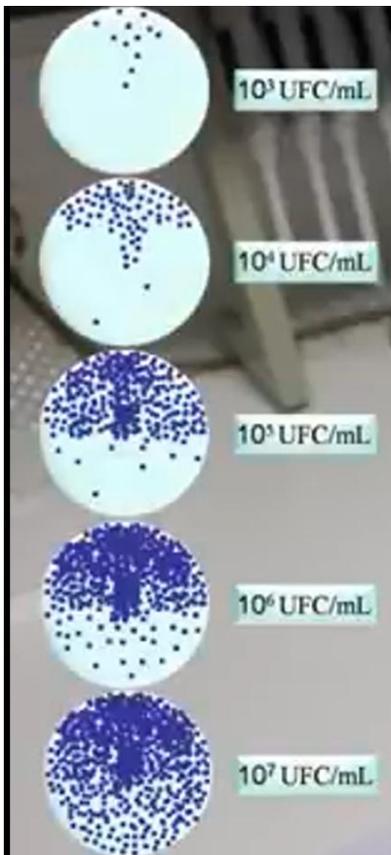
2. **Ensemencement :**

- L'échantillon prélevé est étalé sur la surface d'un milieu de culture solide (comme une gélose au sang ou un milieu chromogène) en zigzag ou en stries uniformes, couvrant toute la surface.

3. **Incubation :**

- La boîte de Pétri est incubée à une température appropriée (souvent 37 °C) pendant 24 à 48 heures.

4. **Interprétation :**

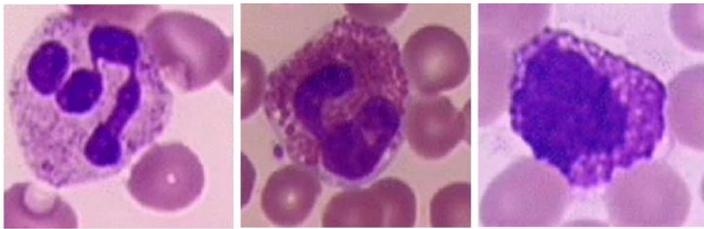


Calcul des UFC : Lors de l'ensemencement semi-quantitatif, les colonies sont comptées après incubation, et le nombre de colonies est multiplié par un facteur correspondant au volume estimé pour obtenir une estimation des **unités formant colonie (UFC) par millilitre** dans l'échantillon initial.

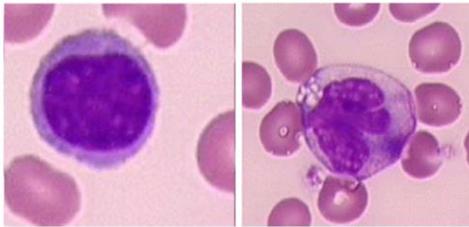
$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{Nombre de colonies comptées} \times \text{Facteur de dilution}}{\text{Volume ensemencé (en mL)}}$$

Les seuils standards pour les analyses d'urine en microbiologie clinique sont :

1. **< 10³ UFC/mL** : Contamination probable, pas d'infection.
2. **10³ – 10⁵ UFC/mL** : Possible infection, à interpréter avec les symptômes cliniques.
3. **> 10⁵ UFC/mL** : Infection significative (bactériurie significative).



(a) Neutrophils (b) Eosinophils (c) Basophils



(d) Lymphocytes (e) Monocytes

