

TP 0 : Laboratoire de bactériologie médicale : Structure, organisation et manipulation.

Objectifs : Se familiariser avec un laboratoire de bactériologie médicale, son équipement et son fonctionnement.

Le laboratoire de bactériologie médicale réalise l'étude bactériologique des prélèvements provenant des patients infectés. Ce qui permet :

- De confirmer le diagnostic d'infection.
- De déterminer quelle est l'espèce ou les espèces bactériennes responsables de cette infection.
- De déterminer à quels antibiotiques ces bactéries sont sensibles c'est-à-dire avec quels antibiotiques il faudra traiter le patient pour le guérir de son infection.

1. Niveaux de sécurité biologiques (confinement)

Selon le risque issu des bactéries isolées, il existe 4 niveaux de sécurité biologiques (confinement) :

1.1 Niveau de confinement 1

Ce niveau de confinement concerne le laboratoire de base pour la manipulation des agents du groupe de risque 1 (aucune conception spéciale, pas d'enceintes de sécurité biologique (hotte à flux laminaire)). **Agents du groupe de risque 1 :** Agents biologiques peu susceptibles d'infecter une personne saine. Ils présentent un risque faible pour l'utilisateur et la collectivité.

1.2 Niveau de confinement 2

Ce niveau de confinement est adapté à la manipulation des agents du groupe de risque 2. Les principaux risques d'exposition liés à des organismes devant être manipulés en niveau de confinement 2 sont l'ingestion, l'inoculation et l'exposition de membranes muqueuses. Les agents pathogènes traités dans un niveau de confinement 2 ne sont généralement pas transmissibles par voie aérienne, mais il est important d'éviter la production d'éclaboussures et d'aérosols qui peuvent se projeter dans l'air (manipulation dans des enceintes de sécurité biologique, port des équipements de protection personnels appropriés tels que les gants, les lunettes, etc...). **Agents du groupe de risque 2 :** Agents pathogènes susceptibles de provoquer une maladie chez l'homme et l'animale, mais qui constitue exceptionnellement, un danger grave pour le personnel du laboratoire, pour la collectivité, pour le bétail ou pour l'environnement.

1.3 Niveau de confinement 3

Ce niveau de confinement permet la manipulation des agents du groupe de risque 3. Les agents pathogènes étudiés en niveau de confinement 3 sont transmissibles par voie aérienne même à faible dose infectieuse, qui est susceptible de provoquer des maladies graves, voire mortelles. Des barrières primaires et secondaires additionnelles sont nécessaires pour limiter la libération d'organismes infectieux dans le laboratoire et dans l'environnement. Il est par conséquent exigé une protection respiratoire appropriée, des filtres spéciaux pour traiter l'air évacué du laboratoire et un accès strictement contrôlé au laboratoire pour la prévention de la transmission de tels organismes. **Agents du groupe de risque 3 :** Agents pathogènes responsables généralement d'une maladie humaine grave ou présentant de lourdes conséquences économiques, mais qui se transmet exceptionnellement par simple contact de personne à personne et qui cause rarement des maladies ne pouvant pas être traitées par des agents antimicrobiens ou antiparasitaires. Les risques sont importants pour les manipulateurs mais faibles pour la collectivité.

1.4 Niveau de confinement 4

C'est le niveau de confinement extrême. Il autorise la manipulation d'agents transmissibles par aérosol avec une faible dose infectieuse et entraînant des graves maladies souvent mortelles, pour lesquelles en général il n'existe pas de traitement ou de vaccin disponible. Le périmètre du laboratoire sera scellé afin d'isoler complètement l'agent infectieux (port de combinaison d'isolement de l'agent pathogène) ou bien l'agent sera maintenu dans une enceinte de sécurité biologique de niveau 3. L'air et les autres effluents produits en laboratoire doivent être décontaminés. **Agents du groupe de risque 4 :** agents pathogènes entraînant généralement de très grave maladie humaine, souvent impossible à traiter, facilement transmissible par

simple contact par les voies direct ou indirect, de personne à personne ou d'un animal à une personne et vice-versa. Les risques sont élevés pour les manipulateurs et pour la collectivité.

2. Règles à suivre durant les travaux pratiques

Quels que soient le but recherché et en conséquence, les méthodes à appliquer dans le laboratoire de bactériologie médicale, le bactériologiste doit impérativement respecter certaines règles essentielles :

- **éviter d'être contaminé par le produit pathologique manipulé** : cette règle importante doit toujours être respectée quelles que soient les bactéries en question.

- **éviter de contaminer le produit pathologique manipulé** : La contamination d'un poste de travail et par conséquent du produit pathologique risque de compromettre le résultat du diagnostic.

Pour répondre à ces règles impérieuses, le bactériologiste doit s'astreindre au respect de gestes précis de travail que certains auteurs ont qualifiés de «gestes rituels de la bactériologie » et d'autres, de réflexes conditionnés.

2.1. Les consignes de sécurité

- Porter une blouse blanche fermée et manches longue.

- Interdiction formelle de boire, manger, de fumer, de mâcher du chewing-gum... pendant les TP ou de sortir de la salle de TP sans motif valable.

- Cheveux longs attachés (flamme...) et les ongles courts.

- Ne pas manipuler les téléphones portables pendant les TP.

- Ne porter aucun bijou aux poignets et surtout aux doigts.

- Attention à l'alcool + flamme et des autres produits inflammables.

- Éviter le contact des réactifs de Gram avec la peau.

- Procéder à un lavage minutieux des mains, avec brossage des ongles avant et après les manipulations, et avant toute sortie même momentanée de la salle de TP.

- Éviter les ouvertures des fenêtres, de portes pendant les manipulations.

- L'étudiant(e) doit éviter de se déplacer en cours de travail, il doit travailler assis(e), sans geste brusque.

- Ouvrir avec précaution dans la zone de stérilité d'un bec bunsen [un espace restreint délimité par un rayon de 10cm autour de la flamme d'un bec Bunsen réglé en intensité moyenne (flamme bleu) les récipients contenant des cultures microbiennes, afin d'éviter toute projection.

- Les tubes ou les flacons ne sont jamais tenus verticalement mais obliquement, leur ouverture dirigée vers la flamme. Les pipettes, pipettes Pasteur ou pipettes graduées doivent être maintenues en position oblique, leurs pointes dirigées vers le bas.

- Flamber, avant et après manipulations, l'anse de platine utilisée pour les prélèvements, en commençant par chauffer la partie moyenne de l'instrument afin de dessécher les restes de culture avant de porter l'extrémité dans la flamme, ceci pour éviter toute projection.

- Prévenir immédiatement le responsable de TP en cas de bris d'un récipient contenant une culture, en cas de contamination accidentelle d'un manipulateur ou tout incident dispersant le matériel microbien.

- Stériliser tout le matériel septique à la fin de la manipulation.

- Prendre toutes dispositions indispensables pour la mise à l'abri des souches microbiennes ainsi que leur destruction afin d'éviter toute contamination.

- Vérification avec l'enseignant avant de quitter la salle des robinets d'eau et de gaz.

2.2. Consignes de propreté

• Nettoyer les paillasses avec l'eau de Javel à l'aide d'un torchon.

• Nettoyer les éviers des colorants et remplir les pissettes d'eau et d'alcool.

• Ramener tout le matériel sur les paillasses et ranger le matériel utilisé.

• Jeter le verre et le matériel souillé (tubes à usage unique, lames...) dans le bac d'eau de Javel.

• Nettoyer les objectifs du papier joseph et de l'alcool iso-amylque et couvrir les microscopes et la loupe.

• Déposer les tubes et les boîtes de culture ensemencés dans l'étuve ou le réfrigérateur.

- Lavage minutieux des mains.

3. Présentation du matériel

En plus de l'ameublement, du matériel informatique et de la verrerie, le laboratoire est équipé du matériel suivant :

- petit matériel : bec bunsen, anse de platine, pipettes Pasteur, micropipettes, pinces, lames, ...).
- matériel d'optique : microscopes et loupes binoculaires.
- matériel d'incubation et de conservation : incubateurs (étuves), réfrigérateur et congélateur.
- matériel de stérilisation et de décontamination : hotte à flux laminaire, autoclaves, stérilisateurs et centrifugeuses.
- matériel de préparation de milieux de culture ou autre (d'identification, de transport et de conservation) : agitateurs, balance à précision, bains Marie, distillateur.

4. La stérilisation

- La stérilisation est l'opération qui consiste à éliminer les micro-organismes d'un objet, et ce de manière durable.
- En bactériologie, le but de la stérilisation est d'une part de maîtriser les microorganismes introduits dans le milieu d'étude, et d'autre part d'éviter la contamination du milieu extérieur et des personnes.
- Il existe deux grands moyens de stérilisation : La chaleur et la filtration. Concernant la stérilisation par la chaleur : la chaleur détruit les bactéries et les spores. On distingue les procédés à chaleur « sèche » ou « humide »

4.1. Chaleur sèche

a). Flambage : c'est le passage dans la flamme (bec Bunsen) de la surface de matériel non inflammable assure une parfaite stérilisation. On stérilise de cette façon les fils de platine et les pipettes Pasteur.

b). Four pasteur ou stérilisateur: C'est un four-étuve à air chaud et sec. Il est utilisé à 180°C pendant 90 minutes. Cet appareil n'est utilisé que pour la stérilisation de la verrerie préalablement nettoyée et séchée ou de matériels métalliques (instruments de dissection, ...) pouvant tolérer de très hautes températures. Le matériel ainsi stérilisé sera laissé dans le stérilisateur jusqu'à son refroidissement complet, puis stocké à l'abri des poussières.

4.2. Chaleur humide

La stérilisation par la chaleur humide, reconnaît trois modalités : la stérilisation à l'autoclave, la pasteurisation et la tyndallisation.

a). Autoclave : c'est un appareil indispensable dans un laboratoire de microbiologie. Le chauffage a lieu sous pression de vapeur d'eau, à une température de 120°C pendant une durée qui varie en fonction du milieu, de la température utilisée et du volume des récipients. Ce procédé tue toutes les cellules végétatives et les endospores.

b). Pasteurisation : la pasteurisation est un traitement à chaud de liquides, tuant des pathogènes mais pas forcément toutes les bactéries. Les températures de la pasteurisation se situent entre 75 à 80°C.

c). Tyndallisation : La tyndallisation est une série de 3 chauffages brefs à des températures de 70°C à intervalles réguliers, ceci afin de laisser aux formes résistantes la possibilité de germer pour les tuer au chauffage suivant.

4.3. Autres procédés de stérilisation

Certaines matières (plastiques, caoutchous ...) ne tolèrent pas l'autoclave ou se détériorent rapidement après des expositions répétées à la chaleur.

a).Radiations : La stérilisation par les U.V. est utilisée au laboratoire pour la décontamination de l'air et des paillasse situées sous la hotte de protection (hotte à flux laminaire). Le rayonnement n'agit que de façon directe et sa pénétration est faible. D'autres radiations (rayons X), peuvent servir pour la stérilisation industrielle des boites de Pétri en matière plastique et de produit pharmaceutiques.

b). Agents chimiques : Ils sont utilisés en général pour la désinfection des salles de travail et pour la destruction des germes portés par des instruments souillés. Ce mode de stérilisation doit être systématiquement pratiqué dans le laboratoire pour les lames et pour la verrerie qui ne passe pas en autoclave.

5. Les étapes de la préparation et la stérilisation du matériel

La stérilisation du matériel est un travail important dans tout laboratoire de microbiologie car toute contamination extérieure fausse totalement le résultat de contrôle et cette évidence doit devenir un réflexe chez les microbiologistes. Les étapes sont les suivantes :

a. Le lavage (nettoyage) : la stérilisation sera plus efficace lorsque le matériel à stérilisé est propre. Le matériel (tubes à essai, bécher, boîte de Pétri, fioles, Heerlen....) est nettoyé avec l'eau de javel puis lavé plusieurs fois avec l'eau courante (robinet), ensuite rincer à l'eau distillé pour éliminer les trace de calcaire et matière organique.

b. Bouchage : les récipients peuvent être bouchés au coton qui ne conserve pas l'humidité après l'autoclavage. Les tubes sont bouchés avec les capsules à vis en aluminium. Les pipettes graduées doivent être cotonné de leur partie supérieure.

c. La charge à stérilisé doit être disposé de manière à assure une bonne répartition de vapeur.

d. La stérilisation : est effectuée le plus souvent à l'autoclave à 120°C pendant 20 min.