

le laboratoire de bactériologie médicale

équipement
techniques de base
sécurité

n. marchal
j.l. bourdon
f. bimet

nouvelle édition

biologie appliquée



doyn

BL 144

biologie appliquée



le
laboratoire
de
bactériologie
médicale

équipement
techniques de base
sécurité

nouvelle édition

n. marchal

Professeur agrégé
Présidente de l'UNATEB et de l'ASSITEB

j.l. bourdon

Chef de travaux de microbiologie,
faculté de médecine de Bichat, Paris
Ex-chargé de cours
à l'école normale supérieure
de l'enseignement technique

f. bimet

Ingénieur CNAM
Unité d'écologie bactérienne
Institut Pasteur, Paris

doin éditeurs-paris



4902 $\frac{2}{2}$



Table des matières

PREMIÈRE PARTIE ORGANISATION ET MATÉRIEL

Chapitre 1 Organisation générale	3
I. L'installation des locaux	3
A. La surface	3
B. La répartition des locaux	4
C. L'alimentation du laboratoire	5
II. Les postes de travail	5
A. Les paillasse	5
B. Les postes de sécurité microbiologique	8
Chapitre 2 Matériel	15
I. Principaux appareils	16
A. Appareils destinés à la production de chaleur	16
B. Appareils producteurs de froid	28
C. Appareils producteurs de vide	29
D. Agitateurs	31
E. Broyeurs-homogénéisateurs - Sonificateurs	33
F. Autres matériels	35
II. Verrerie générale	36
A. Qualités exigibles du verre	36
B. Verrerie courante	37
C. Verrerie volumétrique de précision	42
D. Apport des matières plastiques en biologie	47
III. Matériel utilisé pour les prélèvements de produits pathologiques et pour les injections diverses	48
A. Avantages du matériel stérile à usage unique	48
B. Aiguilles	49
C. Seringues	52
D. Ecouvillons	55
E. Spirale de prélèvement	57
F. Vaccinostyles	57
G. Sondes ou cathéters	58
H. Accessoires divers	59
I. Matériel destiné à recueillir les prélèvements	60
J. Transport des produits pathologiques, des cultures bactériennes ou des animaux infectés : réglementation	62
IV. Matériel utilisé pour les examens microscopiques	64
A. Microscope optique (ou photonique) à fond clair	65
B. Microscope à fond noir	81
C. Microscope à contraste de phase	83

D. Microscope à fluorescence	86
E. Autres types de microscopes	89
F. Accessoires de microscopie	91
G. Petit matériel courant	96
H. Microscopie électronique	101
V. Matériel utilisé pour les ensemencements	106
A. Pipettes	106
B. Fils à ensemenecer	116
C. Matériel pour le conditionnement des milieux	119
D. Accessoires divers	128

DEUXIÈME PARTIE

LES SERVICES DE PRÉPARATION

Chapitre 1 Stérilisation	133
I. Généralités sur la stérilisation	133
A. Définition	133
B. Principaux modes de stérilisation	133
II. Stérilisation par la chaleur sèche	134
A. Chauffage direct	134
B. Stérilisateurs à air chaud	135
III. Stérilisation par la chaleur humide	140
A. Autoclavage	140
B. Ebullition	149
IV. Tyndallisation	150
V. Stérilisation par filtration	153
A. Généralités	153
B. Filtration sur bougies	156
C. Filtration sur membranes	159
VI. Action des radiations	167
VII. Action des agents chimiques	168
A. Principe	168
B. Stérilisation par l'oxyde d'éthylène	168
C. Les antiseptiques	170
Chapitre 2 Centrifugation	177
A. Principe	177
B. Intérêt de la centrifugation en bactériologie	178
C. Centrifugeurs d'usage courant	179
D. Centrifugeurs spéciaux	185
Chapitre 3 Technologie appliquée à la préparation des milieux et réactifs	187
I. Organisation et équipement du service de préparation	187
A. Matériel	187
B. Alimentation en eau	191

II.	Technique générale de préparation des milieux	193
A.	Préparation à partir des ingrédients de base	193
B.	Préparation à partir de milieux déshydratés	195
C.	Répartition avant la stérilisation	196
D.	Stérilisation	197
E.	Stockage	199
F.	Contrôles	200
III.	Adjonctions de produits stériles à des milieux de base	203
A.	Généralités	203
B.	Liquéfaction des milieux de base	203
C.	Ouverture aseptique d'ampoules stériles	204
D.	Incorporation des produits	205
E.	Présentation des milieux en vue de leur utilisation	206
IV.	Préparation des colorants	207
Chapitre 4 Les « annexes » du laboratoire de bactériologie		209
I.	Laverie	209
A.	Désinfection	209
B.	Lavage	211
C.	Stérilisation du matériel en vue de son utilisation	215
II.	L'animalerie	216
A.	Le local	216
B.	Les cages	217
C.	L'alimentation des animaux	221
D.	Conditions particulières d'élevage des animaux gnotobiotiques	222

TROISIÈME PARTIE

MÉTHODOLOGIE

Chapitre 1 Conditions générales de travail en bactériologie médicale		227
I.	Installation d'un poste de manipulations	227
II.	Caractéristiques principales de la pratique bactériologique	228
A.	Précautions générales	228
B.	Organisation du travail	229
III.	Étapes d'une analyse en bactériologie médicale	231
A.	Méthode d'application générale	231
B.	Examen macroscopique	232
C.	Examen microscopique	232
D.	Isolément	233
E.	Identification	235

Chapitre 2 Techniques d'examen microscopique. Etude de la morphologie des bactéries	237
I. Examen à l'état frais	238
A. But	238
C. Technique de préparation	239
C. Lutage	241
D. Observation. Mise en évidence de la mobilité	243
II. Colorations	244
A. Réactifs utiles	252
B. Préparation des frottis	255
C. Colorations usuelles	261
D. Colorations permettant l'étude de certains détails de la structure bactérienne	269
E. Colorations particulières à certains genres bactériens	277
F. Conservation des préparations colorées	
Chapitre 3 Techniques générales de culture des bactéries	279
I. Principales techniques d'ensemencement	279
A. Quelques définitions	279
B. Règles générales des ensemencements bactériens	279
C. Transfert stérile - Protocole général de manipulation aseptique	283
D. Principaux procédés d'ensemencement	286
E. Incubation et lecture	289
II. Principales techniques d'isolement	289
A. Buts de l'isolement	290
B. Etudes préliminaires	291
C. Techniques d'application générale	302
D. Techniques particulières d'isolement	306
E. Applications des techniques d'isolement à l'étude des produits pathologiques	
Chapitre 4 Conduite de l'identification d'une souche bactérienne aérobie	311
I. Orientation préliminaire	311
A. Etude morphologique	314
B. Aspect sur les milieux d'isolement usuels	315
C. Etude des métabolismes bactériens	317
II. Identification proprement dite	317
A. Principe	317
B. Conditions de l'étude	318
C. Interprétation des résultats	322
III. Les techniques modernes d'identification	323
A. Les méthodes standardisées	327
B. Les méthodes automatisées	329
C. Les méthodes de diagnostics rapides	
Chapitre 5 Utilisation des animaux de laboratoire	339
I. Prehension	339
II. Contention	340
A. Contention manuelle	340
B. Contention instrumentale	342

III. Marquage	342
IV. Anesthésie	344
V. Prélèvements de sang	346
A. Généralités	346
B. Techniques	347
VI. Inoculations	351
A. Préparation des produits à inoculer	351
B. Technique générale d'injection	352
C. Inoculations intraveineuses	352
D. Inoculation intramusculaire	354
E. Inoculation intrapéritonéale	354
F. Inoculation sous-cutanée	355
G. Inoculation cutanée (plantaire)	355
H. Inoculation intradermique	355
I. Inoculation oculaire	355
J. Instillation nasale	356
VII. Sacrifice des animaux	356
A. Procédé général	356
B. Procédés particuliers	356
VIII. Autopsies	357
A. Technique	357
B. Anatomie comparée des principaux animaux de laboratoire	360
C. Destruction des cadavres	363
IX. Détermination d'effet léthal	363
A. Dose minima mortelle	363
B. Détermination de la dose létale 50 %	364
X. Définitions actuelles des animaux de laboratoire	366
A. Classification en fonction de la flore hébergée	367
B. Classification d'ordre génétique	368
XI. Maladies spontanées des animaux de laboratoire	368
Les infections bactériennes	368
Chapitre 6 Notions sur les techniques de numération des bactéries	373
I. Intérêt d'une analyse bactériologique quantitative	373
A. En bactériologie médicale	373
B. En bactériologie appliquée	373
C. En recherche appliquée ou fondamentale	374
II. Principales techniques de numération bactérienne	374
A. Méthodes ne permettant pas de différencier les bactéries vivantes	375
B. Numération des bactéries vivantes	378
Chapitre 7 Notions de techniques histologiques	387
I. Prélèvement	387
II. Fixation	387
III. Inclusion	389
A. Déshydratation	390
B. Imprégnation par un solvant de la paraffine	390

C. Imprégnation par la paraffine	390
D. Inclusion	391
IV. Exécution des coupes	392
A. Préparation du bloc	392
B. Technique de réalisation des coupes	394
V. Collage des coupes	395
A. Réactifs	395
B. Technique de collage	395
VI. Coloration des coupes	396
A. Déparaffinage	396
B. Réhydratation	396
C. Colorations	397
D. Montage	402
Chapitre 8 Conservation des bactéries	403
I. Intérêt	403
A. Dans le cadre du laboratoire clinique	403
B. Dans le cadre des laboratoires de recherche et de bactériologie appliquée	403
II. Conditions générales de conservation	405
III. Principales techniques de conservation	405
A. Conservation sur milieux de culture	406
B. Conservation par des moyens physiques	409
IV. Repiquage des souches conservées en vue de leur utilisation	419
V. Critères de choix d'un mode de conservation	420

QUATRIÈME PARTIE

SÉCURITÉ

Chapitre 1 Risques - Prévention - Premiers soins	427
I. Le risque infectieux	427
A. La variabilité des risques encourus	427
B. Les principales causes de contamination	428
C. Les principaux modes de contamination	428
D. La prévention	429
E. Les moyens de protection	433
II. Les accidents de laboratoire	436
A. Accidents intéressant les mains	436
B. Projections oculaires	437
C. Inhalation ou ingestion de produits toxiques	438
D. Risques d'incendie, d'explosion, d'électrocution	438
III. Mesures de sécurité concernant les produits toxiques ou corrosifs	439
A. Les règles d'étiquetage	439
B. Rappel des règles de sécurité	443

IV. Mesures de sécurité contre les incendies	443
A. Les causes les plus fréquentes d'un incendie	443
B. Textes de réglementation	444
C. Les produits inflammables	444
D. La lutte contre l'incendie	446
V. Mesures de prévention des accidents d'origine électrique	450
A. Installations électriques	450
B. Prévention en cours d'utilisation	451
VI. Les risques d'explosion	452
VII. Premiers soins	452
Chapitre 2 Les causes d'erreurs possibles en bactériologie	457
A. Erreurs relatives à la prescription	457
B. Erreurs relatives au prélèvement	457
C. Erreurs relatives aux recherches bactériologiques	459
D. Erreurs relatives à la transcription	460
E. Conclusion	461

ANNEXE

FORMULAIRES

Mesures	465
Chimie	468
pH	472
Indicateurs redox	474
Colorants	476
Sécurité	477
Liquide de nettoyage	481
Mélanges réfrigérants	482
Papiers à filtrer	482
Caractéristiques des matières plastiques pour laboratoire	483