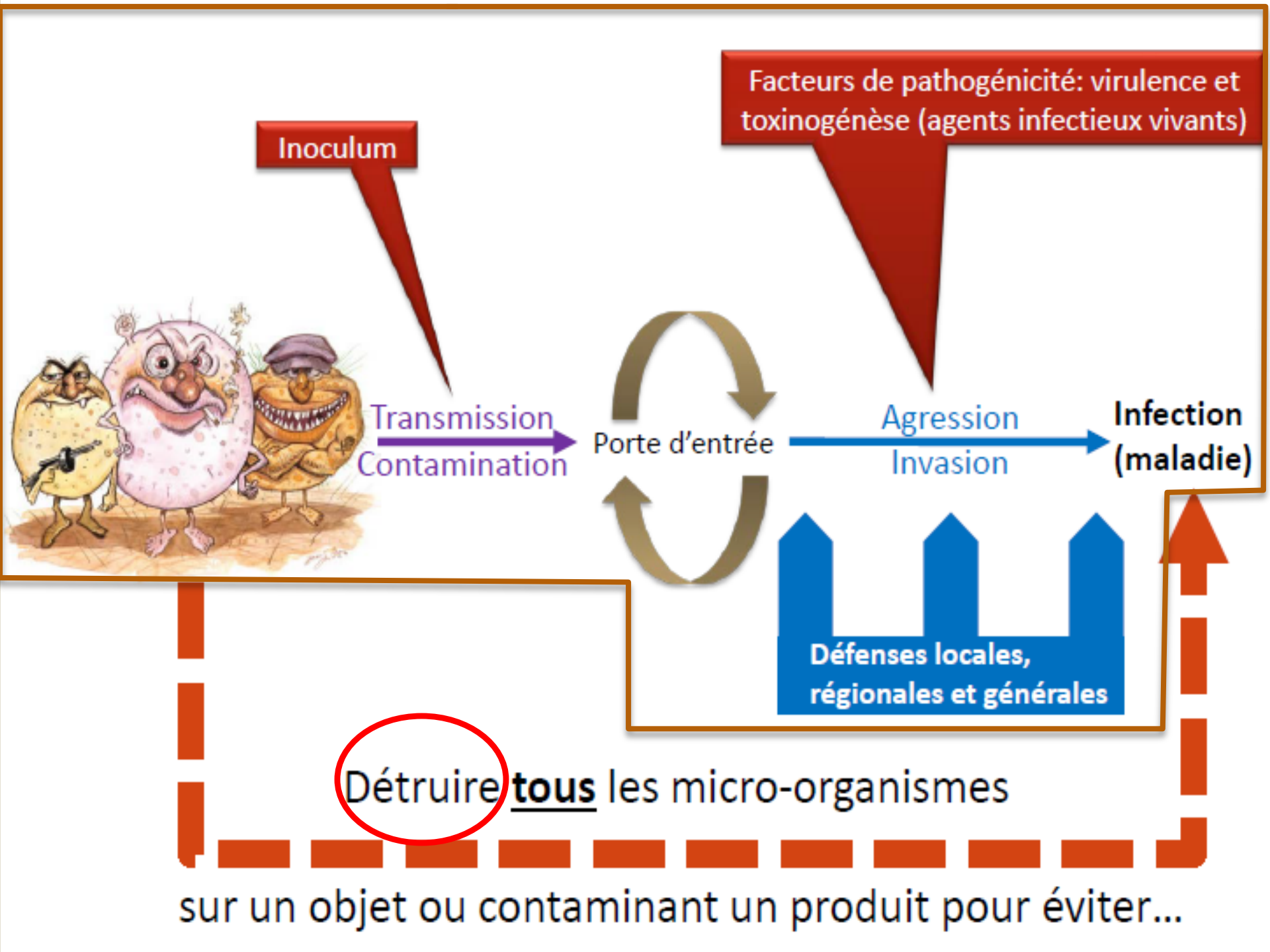


## **Chapitre 2 : Les techniques analytiques de laboratoire médical relevant de la microbiologie/ bactériologie.**

- I. les principes liés aux différentes techniques de stérilisation applicables à la microbiologie**
- II. Techniques d'examen microscopique**
- III. Utilisation des milieux de cultures**
- IV. Identification biochimique**
- V. Les antibiotiques et l'antibiogrammes**



Inoculum

Facteurs de pathogénicité: virulence et toxinogénèse (agents infectieux vivants)

Transmission  
Contamination

Porte d'entrée

Agression  
Invasion

Infection  
(maladie)

Défenses locales,  
régionales et générales

Détruire tous les micro-organismes

sur un objet ou contaminant un produit pour éviter...

~~les microorganismes~~

Stérilisation

débarrasser un objet  
et/ou une substance de  
tous les micro-  
organismes qu'il contient

Désinfection

Elimination partielle des  
micro-organismes

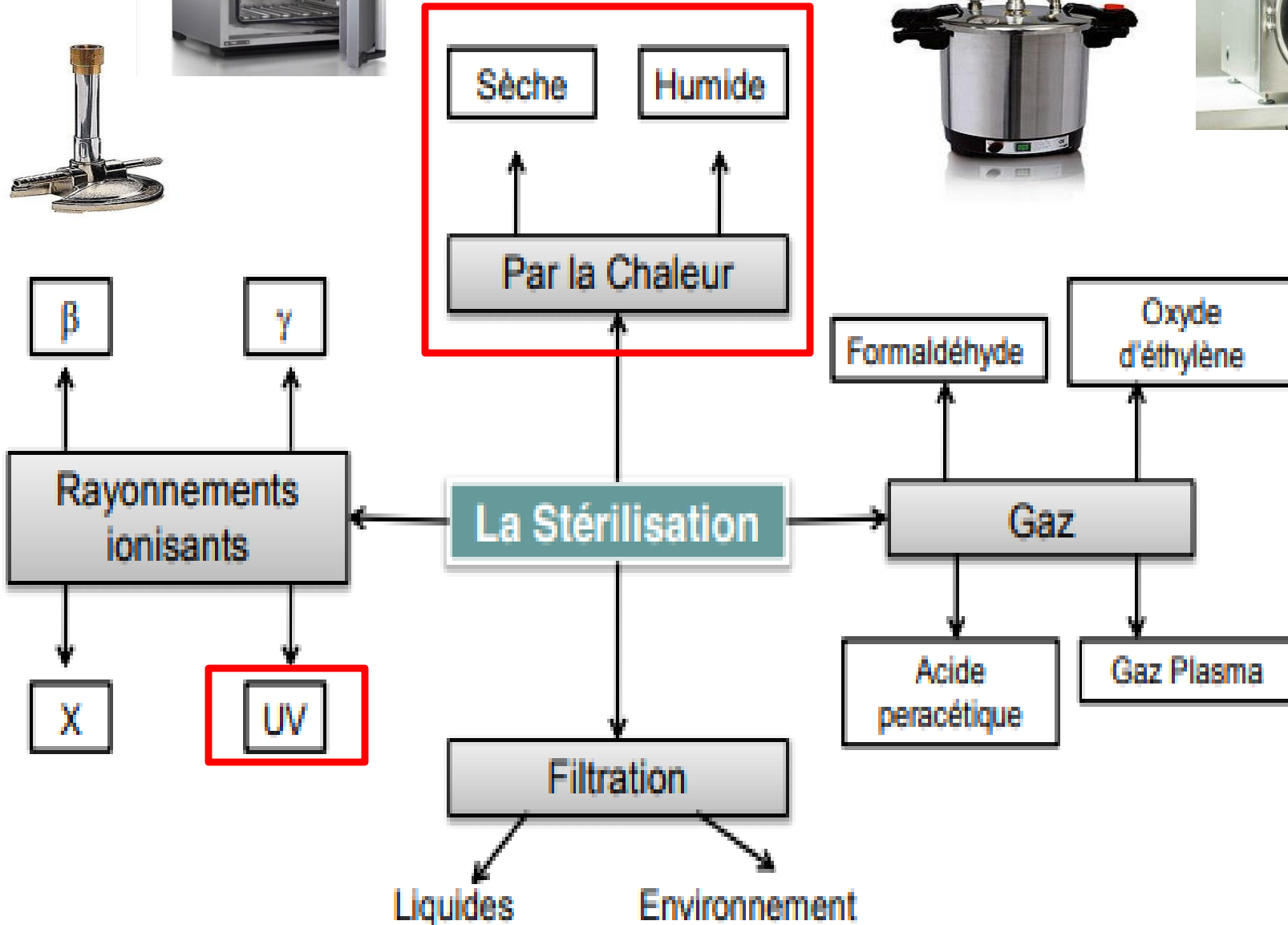


## Etapas préliminaires: pré-désinfection et nettoyage

Niveau de traitement	Spectre d'activité	Process envisageables
Désinfection de haut niveau	Spores bactériennes Mycobactéries Virus nus Champignons filamenteux et levures Formes végétatives des bactéries et virus enveloppés	Nettoyage dans un détergent-désinfectant + désinfection par trempage dans un désinfectant bactéricide, fongicide, virucide, mycobactéricide, sporicide (selon besoins)
Désinfection de niveau intermédiaire	Mycobactéries Virus nus Champignons filamenteux et levures Formes végétatives des bactéries et virus enveloppés	1) Nettoyage dans un détergent-désinfectant + désinfection par trempage dans un désinfectant bactéricide, fongicide, virucide, tuberculocide (ou mycobactéricide) 2) Lavage et désinfection thermique ou chimiothermique en machine après vérification des paramètres de temps et de température à respecter
Désinfection de bas niveau	Formes végétatives des bactéries (mycobactéries exceptées) Levures Virus enveloppés	Nettoyage et désinfection en un temps avec détergent-désinfectant bactéricide, par trempage ou, à défaut, essuyage humide

Niveau de traitement	Spectre d'activité	Process envisageables
Stérilisation	Prions Spores bactériennes Mycobactéries Virus nus Champignons filamenteux et levures Formes végétatives des bactéries et virus enveloppés	Nettoyage dans un détergent-désinfectant ou lavage en machine + stérilisation

# Stérilisation par agents physiques



# La stérilisation par la chaleur

de l'espèce microbienne

du milieu dans lequel se trouvent les germes

de la forme microbienne\*

**La sensibilité des micro-organismes à une stérilisation par la chaleur est en fonction :**

de la température

de la durée du traitement

de la contamination initiale

## La stérilisation par chaleur humide

### À la chaleur sous pression

#### Mode de stérilisation le plus répandu

- Production de vapeur d'eau par chauffage sous pression : vapeur saturante = gaz stérilisant
- Dénaturation des macromolécules bactériennes (noyau et parois) sous l'action de la chaleur
- hydrolyse partielle des chaînes peptidiques
- Pour les récipients contenant des solutions à stériliser, l'effet stérilisant est réalisé par l'eau de la solution
- Pour la stérilisation terminale : le conditionnement doit être perméable à la vapeur d'eau



## La stérilisation par chaleur humide

### Autoclave de laboratoire



Applicable à tous les dispositifs Thermorésistants (instruments chirurgicaux en acier inoxydable, titane, élastomères et certaines matières plastiques, textiles et en verre). Et les milieux de culture.

Les produits thermosensibles (ne pouvant supporter une température minimum de 125°C) ne peuvent pas être stérilisés à la vapeur d'eau tels que certains matériels électriques ou optiques et les endoscopes souples.

**plateau de stérilisation: 121°C pendant 15 à 20 min**

## À savoir

Le nettoyage préalable et l'emballage, font partie intégrante d'une opération de stérilisation.

laisser tremper au moins 2 heures (une nuit si possible) dans une solution d'eau de Javel, dans un récipient (cuvette, seau) fermé par un couvercle.

Laver soigneusement, au savon et à la brosse du matériel et le rincer soigneusement puis le faire sécher

visser le bouchon des flacons ou des tubes puis desserrez le bouchon d'un quart de tour pour qu'ils n'exploient pas...).

emballer le matériel selon ses caractéristiques (boite métallique à stériliser, sachets, papier fort...). Les tubes en verre de 15 ml (contenant 5 ml d'eau ou de sérum physiologique) ne nécessite pas d'emballage

Le conditionnement doit être perméable à la vapeur d'eau.

## La stérilisation par chaleur humide

### Les bain-marie ou bain-thermostatés (ébullition)

Un chauffage de 30 minutes à 100°C par ébullition ou un maintien dans la vapeur d'eau → détruire toutes les formes végétatives.

- ★ Les produits liquides délicats : milieux albumineux, lait, gélatine, solutions concentrées de glucides, ...

### La tyndallisation

Série de chauffages bref et discontinu à des températures de 70°C à intervalles réguliers '24heures'

→ Germination des formes résistantes « spores » en forme végétative → destructions

- ★ Les substances thermolabiles non filtrables (émulsion de jaune d'oeuf, vaccins), préparation de milieux à base de sérum ou de jaune d'oeuf.

**Exemple du lait** : chauffage à 63°C pendant 30 min → Chauffage à 73°C pendant 15 min

### Pasteurisation

Conservation des produits naturels pendant un temps limité → les formes végétatives.

Le liquide est porté rapidement à 90°C pendant 30s, par exemple, puis on le refroidit brusquement à 10°C.

- ★ Conservation des produits alimentaires.

# La stérilisation par chaleur sèche

## Stérilisation par four Pasteur, four, poupinel



L'agent stérilisant : O<sub>2</sub> de l'air porté à une température élevée → oxydation des protéines bactériennes et dessèche le cytoplasme.

★ Stérilisation des contenants en verre, porcelaine ou métallique

Durée : 60 minutes de chauffage à 175°C.

S'il s'agit de matériel lourd ou volumineux, ou contenant des poudres, huiles, vaselines, etc., chauffer à 175°C pendant deux heures.

## Stérilisation par flambage à la flamme d'un bec Bunsen



Utilisé que pour → les articles métalliques tels que pinces ou bistouris anses de platine, aiguilles pour vaccination ou lancettes utilisées pour prélever des échantillons de sang capillaire.

## Autres méthodes de stérilisation

### Stérilisation par filtration

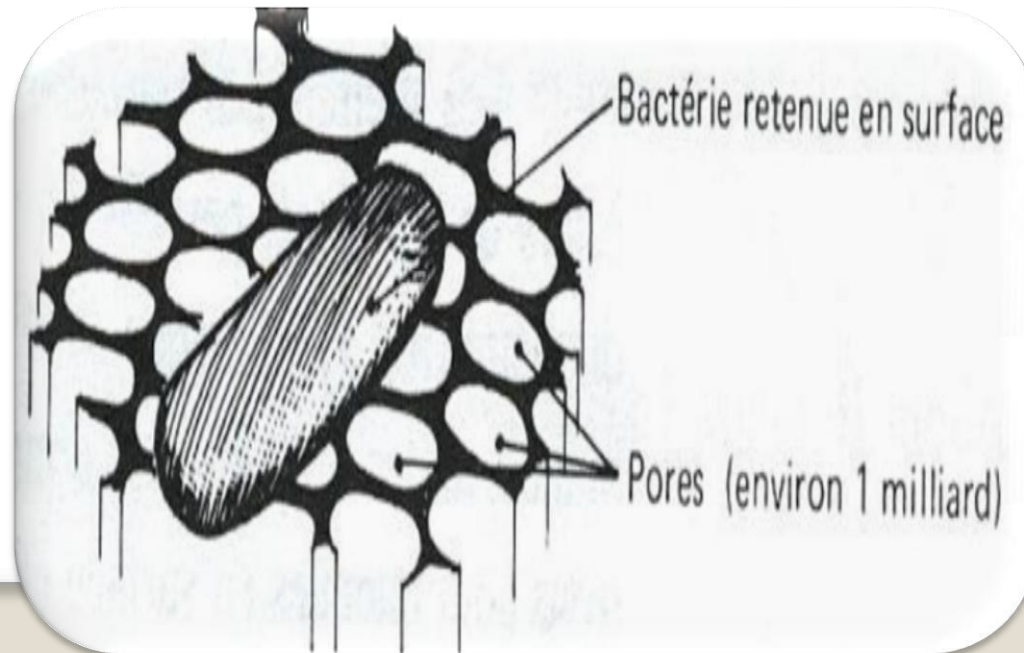
La filtration consiste à faire passer le liquide à stériliser à travers une **paroi poreuse** ou une **membrane** qui retient les **bactéries**. Il existe plusieurs types de filtration:

**Les bougies de type Chamberland:** tubes à fond arrondi dont les parois sont poreuses, en porcelaine. la dimension de ces pores varie de quelques  $\mu\text{m}$  au 1/10ème de  $\mu\text{m}$ .

**Disques:** disques en verre fritté de porosité de 150 à 1  $\mu\text{m}$ .

**Membranes:** membranes plastiques minces comportant des millions de pores par  $\text{cm}^2$  dont la taille, très uniforme, varie de 8 à 0.01  $\mu\text{m}$ .

★ Les liquides altérables par la chaleur: sérums, solutions hydrolysables, solutions glucidiques, vitamines



## Autres méthodes de stérilisation

### Stérilisation par radiations

C'est la lumière U.V qui est la plus souvent utilisée par son effet de mutagénèse ( lampes germicides ou stérilampes).

★ Les surfaces et de l'air ambiant, dans des locaux ou des hottes et équipement préemballés servant aux manipulations en atmosphère stérile.

Utilisée en virologie, cultures cellulaires, préparation et conditionnement des produits pharmaceutiques,ensemencements bactériens, préparation de milieux.

Les rayons X ou  $\gamma$ , considérés comme des moyens de stérilisation à froid, le plus souvent pour la conservation de certains produits alimentaires en bloquant la division cellulaire.



## **Question 1 du Chapitre 2:**

**Quels sont les agents chimiques de stérilisation: rôle et utilisation?**

# La démarche d'une analyse cyto bactériologique

**Prélèvement**



★ **Analyse cytologique**

★ **Analyse bactériologique**

★ **Examen direct sans et par coloration**

★ **Mise en culture**

★ **Isolement sur gélose**

★ **Enrichissement en bouillon**

★ **Culture pure**

★ **Identification**

★ **antibiogramme**

★ **conservation**

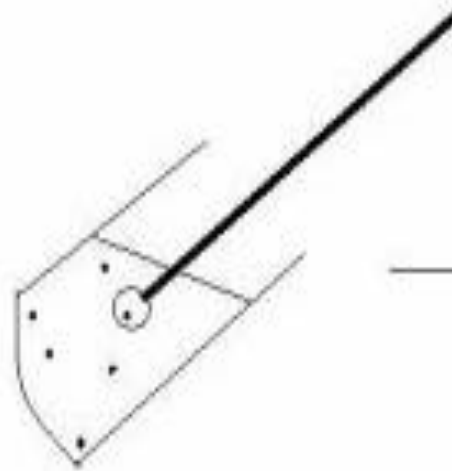
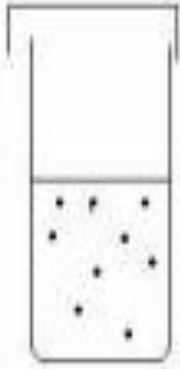


## **Chapitre 2 : Les techniques analytiques de laboratoire médical relevant de la microbiologie/ bactériologie.**

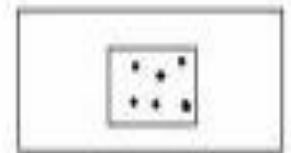
- I. les principes liés aux différentes techniques de stérilisation applicables à la microbiologie**
- II. Techniques d'examen microscopique**
- III. Utilisation des milieux de cultures**
- IV. Identification biochimique**
- V. Les antibiotiques et l'antibiogrammes**



# Etat frais



déposer la goutte  
au centre de la lame



observation à \*40  
attention condensateur  
en bas peu de lumière  
diaphragme fermé

déposer une lamelle  
en la faisant glisser  
sur la lame  
attention aux bulles d'air

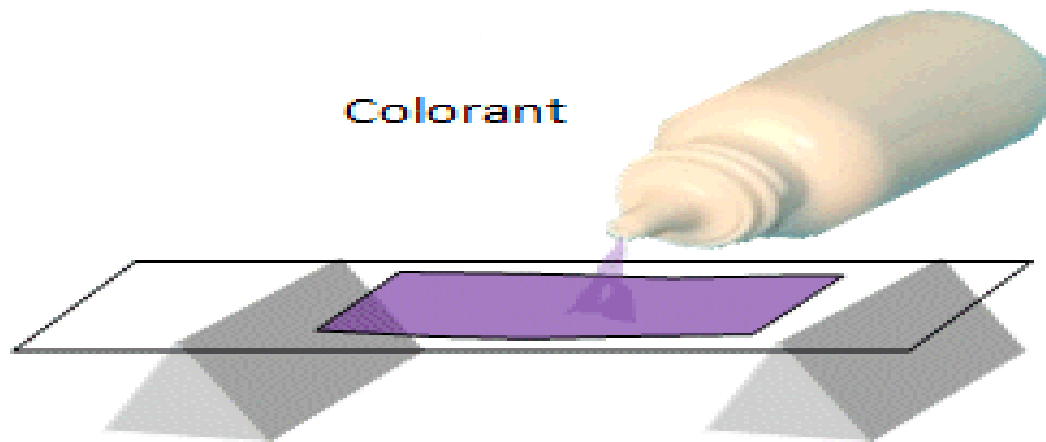
bouillon de  
micro-organisme

homogénéisation  
du bouillon

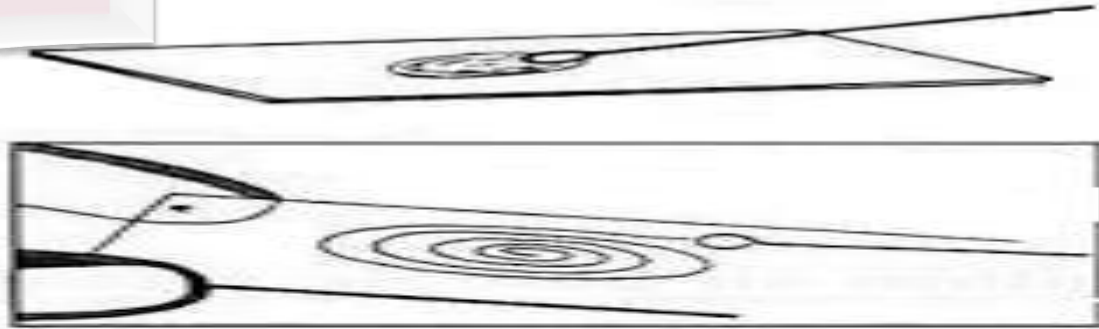
Prélever une goutte  
avec une oese

- ✓ *Observer des bactéries vivantes*
- ✓ *Déterminer la quantité approximative des bactéries*
- ✓ *Déterminer leur morphologie*
- ✓ *Déterminer leur mode de regroupement*
- ✓ *Déterminer leur mobilité*

# Les coloration de routine et les colorations spéciales nécessaires à l'identification bactérienne



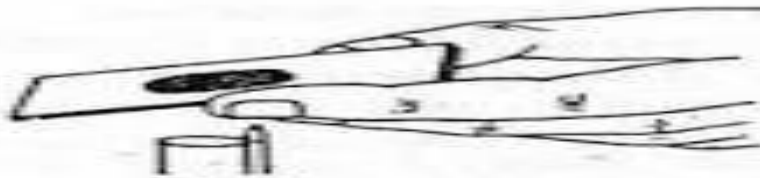
# Le frottis



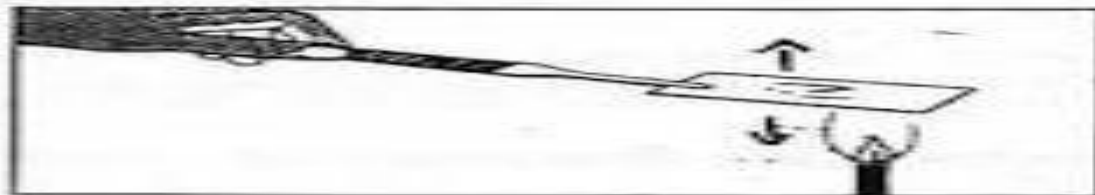
**Etalement à l'anse de platine**



**Etalement à la pipette Pasteur**



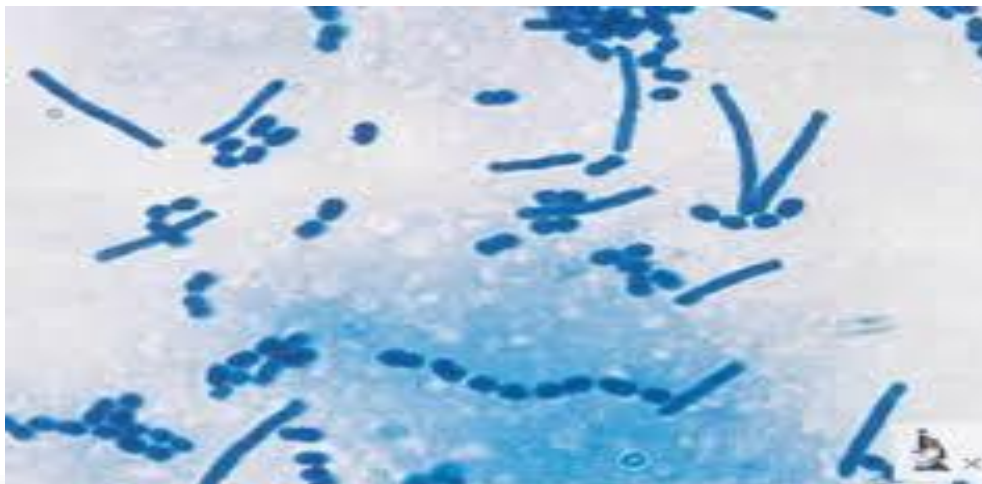
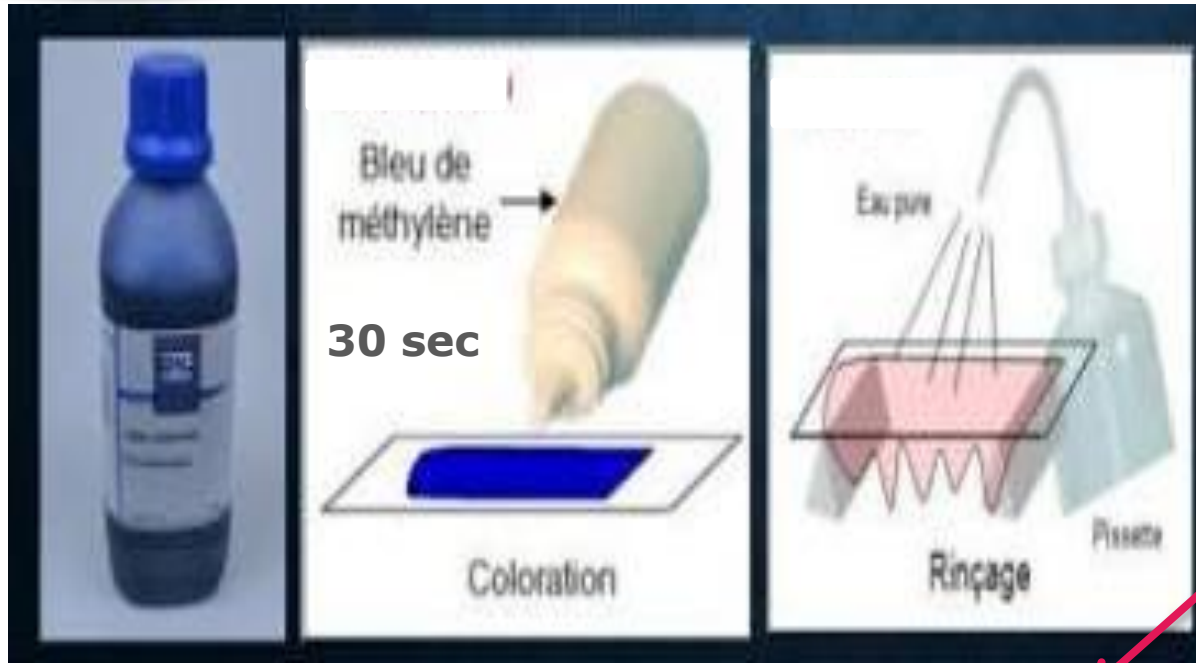
**Séchage du frottis**



**Fixation du frottis**

# Coloration au bleu de méthylène

## Coloration simple



**Méthode peu informative**

# Coloration de Gram

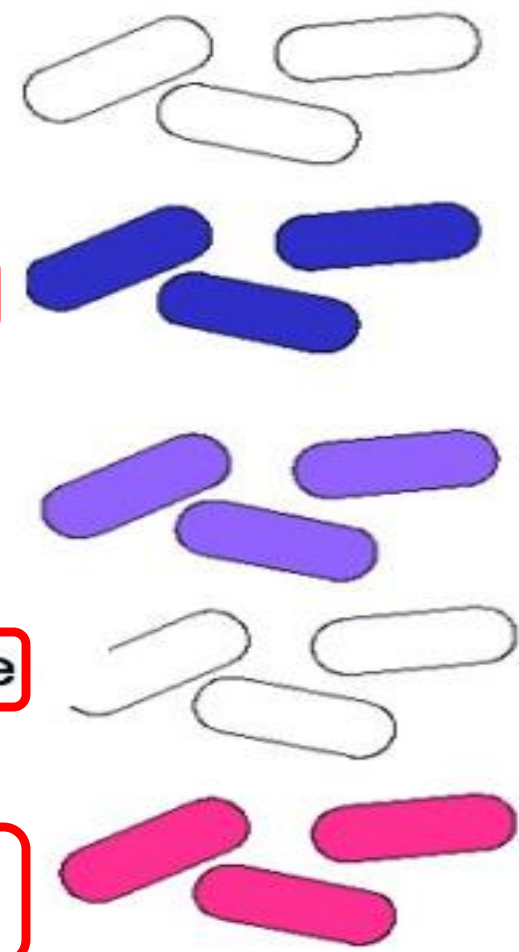
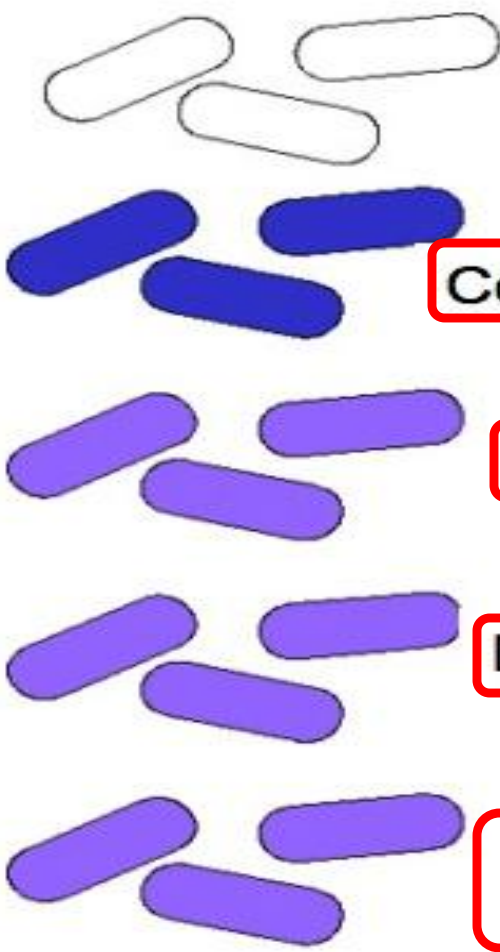
## Colorations différentielles



Hans Christian Gram  
1853-1938

### Gram Positive

### Gram Negative



Fixation par chaleur

Coloration violet de gentiane

1 min Puis rinçage

Stabilisation par lugol

1 min Puis rinçage

Décoloration alcool/acétone

15 à 30 sec Puis rinçage

Contre coloration avec fuchsine ou safranine

15 à 30 sec Puis rinçage



Permet de diviser le monde des bactéries en deux groupes distincts. Mais certaines bactéries peuvent présenter un Gram variable. exp *Listeria*

Bacille Gram -

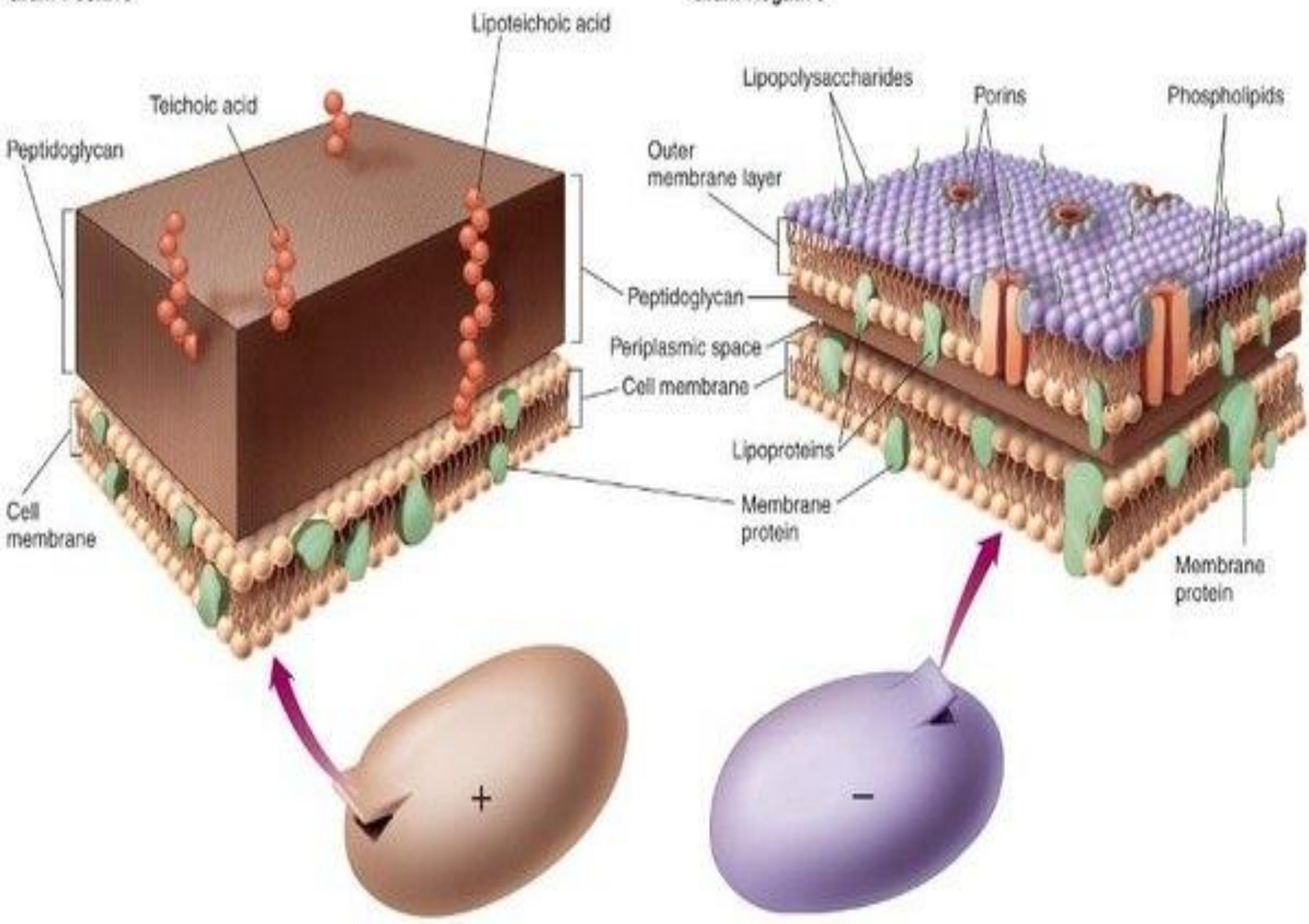
Bacille Gram +



Réaliser en routine lors des premiers examens des produit pathologiques en bactériologie médicale → apprécier la pureté des souches bactériennes avant leur identification

### Gram-Positive

### Gram-Negative





# Coloration de Ziehl Neelsen

## La coloration des bacilles acido-alcoolo-résistants



Mycobactéries

Frottis



Colorer à la Fuchsine et chauffer par intermittence (10 à 15min)



Lavage

Décolorer à l'acide sulfurique  $\frac{1}{4}$  (1 min) & à l'alcool à 95° (10min)



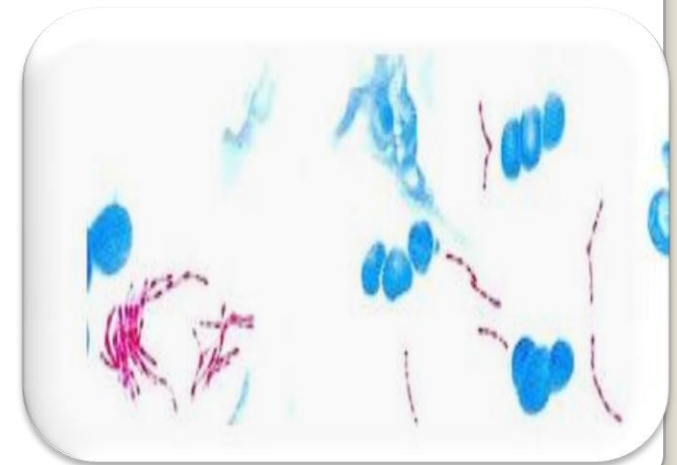
Lavage

Contre colorer au bleu de méthylène (2min)



Lavage

Examiner a immersion x100



## Coloration des capsules

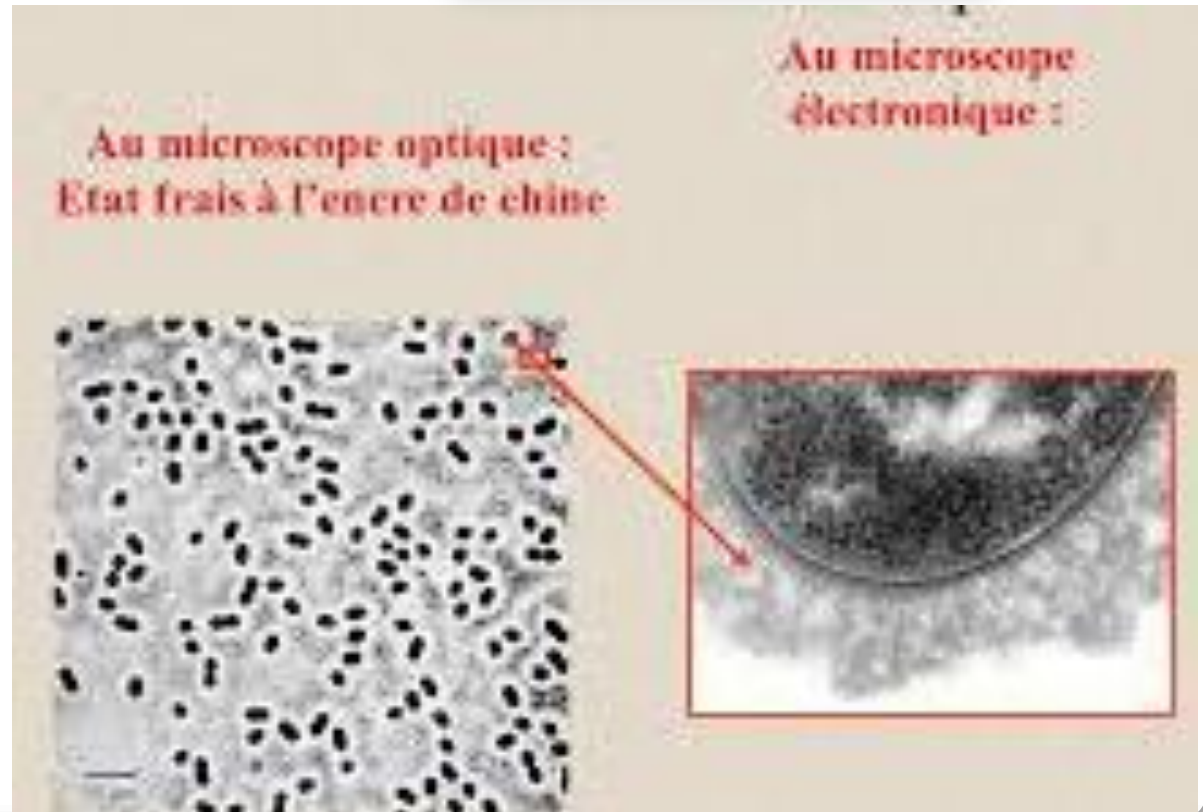
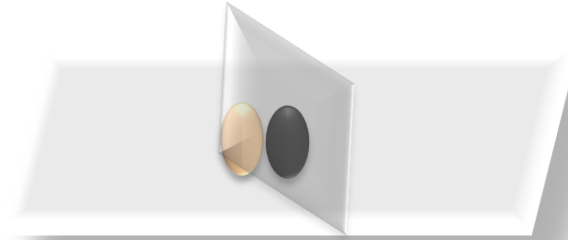
Ces colorations sont généralement négative car les capsules s'imprègnent très difficilement de colorants

Etat frais à l'encre de chine

Observer à l'objectif x40



Les capsules se présentent sous forme d'un halo clair qui enveloppe la cellule bactérienne



# Coloration des spores

Technique de BENITO TRUJILLO

**Au vert de malachite à chaud**

Sporangium

(structure dans laquelle les spores se forment)

Spores

(structures résistantes utilisées pour la survie dans des conditions défavorables)



On notera

### + **Forme de la spore**

spore sphérique



spore cylindrique



spore ovoïde



### + **Position de la spore**

spore centrale



spore subterminale



spore terminale



### + **Déformation éventuelle de la bactérie par la spore**

spore non déformante



spore déformante



# Coloration des flagelles

### Par la méthode de Rhodes

- Laisser s'écouler une goutte de la suspension bactérienne sur une lame à 45°;
- Laisser sécher la lame à l'air libre ou à l'étuve à 37°C;
- Faire agir le mordant de Rhodes (Tanin, alun de potassium, huile d'aniline, chlorure ferrique) 5 min;
- Laver soigneusement à l'eau distillée;
- Recouvrir la lame avec le nitrate d'argent ammoniacal, chauffer presque à ébullition et laisser agir 3 à 5 min,
- Laver à l'eau distillée
- Sécher et observer à x100;
- Les corps bactériens apparaissent presque noirs, les flagelles sont teintés en brun plus ou moins foncé.

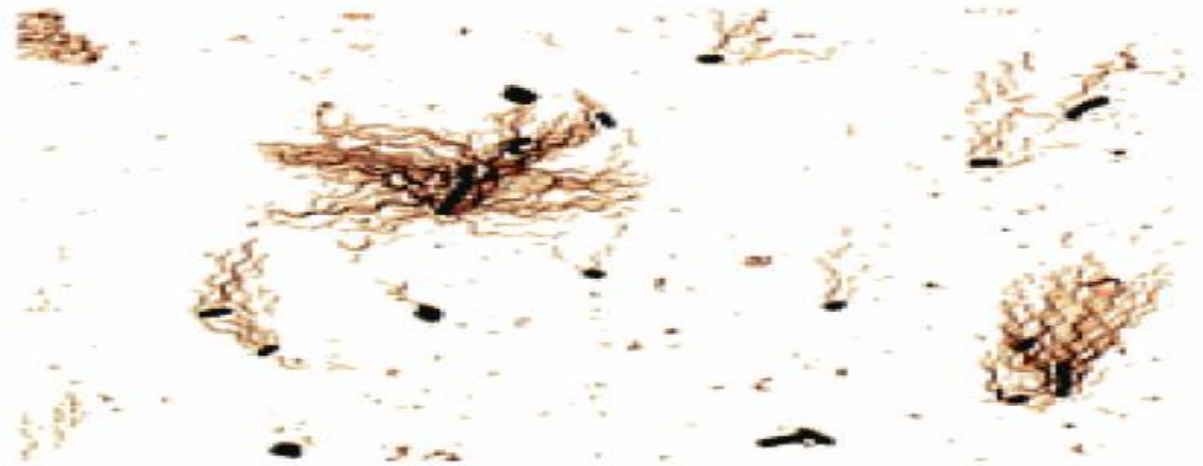
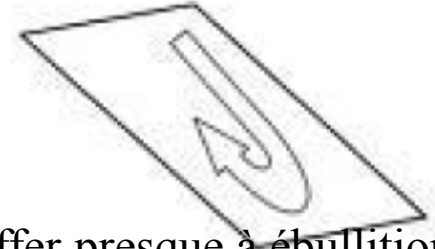
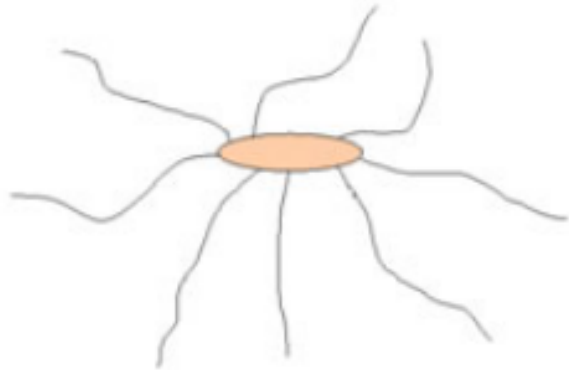


Fig. 2.11. – Coloration de Rhodes appliquée à une culture de *Proteus mirabilis*. Observa..... Immersion (x 1 000).

## Rappel

**Ciliature péritriche :**  
flagelles répartis sur toute la surface de la bactérie



Ex : entérobactérie mobile

**Ciliatures polaires :**  
flagelles localisés à un ou deux pôles de la bactérie



**Ciliature polaire monotriche**

Ex : *Pseudomonas aeruginosa*,  
*Aeromonas* spp,  
*Vibrio* spp



**Ciliature polaire multitriche**

Ex : *Pseudomonas fluorescens*



**Ciliature amphitriche et multitriche**

Ex : *Plesiomonas*,  
*Helicobacter*

## A savoir

Dans un examen microscopique d'un prélèvement bactériologique il faut également se rendre compte à « la cytologie » la présence des :

- Leucocytes (globules blanc mono ou polynucléaire)
- Hématies
- Cristaux (cas des urines)
- Cellule épithéliale
- La flore commensale (lactobacilles cas des prélèvement génitales)

