

## TP UE Gestes de base (DFGSP2)

### Atelier « manipulations en conditions aseptiques » Salle Hollande

#### Buts :

- connaître et mettre en pratique les consignes principales qui permettent de réaliser des **cultures bactériennes** en **conditions aseptiques**
- se familiariser avec les **gestes de base utilisés en bactériologie**

#### I Introduction :

- Les **bactéries** sont des micro-organismes retrouvées de **façon naturelle** dans l'environnement (air, eau, sol, plantes, surfaces inertes), chez les animaux et l'homme (différents microbiotes). Lorsque des cultures bactériennes doivent être réalisées, le manipulateur doit être vigilant vis-à-vis des bactéries de l'environnement (air, surfaces) et de ses microbiotes cutané et buccal de façon à ce que ces bactéries ne contaminent pas les cultures.
- Seul un très faible pourcentage des bactéries est pathogène pour l'homme. Les **agents biologiques** (dont les bactéries) sont classés en **4 groupes** en fonction de l'importance du risque d'infection chez l'homme (décret 94-352) :
  - le **groupe 1** comprend les agents biologiques non susceptibles de provoquer une maladie chez l'homme ;
  - le **groupe 2** comprend les agents biologiques pouvant provoquer une maladie chez l'homme et constituer un danger pour les travailleurs ; leur propagation dans la collectivité est peu probable ; il existe généralement une prophylaxie ou un traitement efficaces ;
  - le **groupe 3** comprend les agents biologiques pouvant provoquer une maladie grave chez l'homme et constituer un danger sérieux pour les travailleurs ; leur propagation dans la collectivité est possible, mais il existe généralement une prophylaxie ou un traitement efficace ;
  - le **groupe 4** comprend les agents biologiques qui provoquent des maladies graves chez l'homme et constituent un danger sérieux pour les travailleurs ; le risque de propagation dans la collectivité est élevé ; il n'existe généralement ni prophylaxie ni traitement efficace.

Dans ce TP, seules des **bactéries de groupe 1** sont manipulées. Pour ce groupe de bactéries, les manipulations peuvent être réalisées **à la paillasse**. Cependant une **zone d'aseptie** doit être présente afin d'éviter les contaminations par l'environnement ou le manipulateur. Elle est créée par la flamme générée par un **bec bunsen**. L'air est stérile dans un rayon de 20 cm autour de la flamme dite stérilisante.

Dans ce TP, nous aborderons également les consignes et les règles à suivre pour manipuler des bactéries de groupe 2. Un **Poste de Sécurité Microbiologique (PSM)** est ainsi nécessaire pour protéger le manipulateur des bactéries qui sont manipulées. Le port de gants est également préconisé.

### En résumé

**Manipuler en conditions aseptiques: c'est respecter l'ensemble des consignes et des règles qui permettent d'éviter la contamination des produits manipulés (culture par exemple) par le manipulateur. A ces consignes, s'ajoutent les règles de sécurité qui protègent le manipulateur et l'environnement.**

#### **REGLES D'HYGIENE ET SECURITE EN BACTERIOLOGIE :**

**Le manipulateur manipule OBLIGATOIREMENT assis, blouse fermée, manches de la blouse baissées, cheveux attachés.**

**Le poste de travail (paillasse, matériel) doit être désinfecté OBLIGATOIREMENT à la fin de la manipulation.**

**Les déchets potentiellement en contact avec les bactéries manipulées doivent être CORRECTEMENT éliminés: bac jaune (DASRI = Déchets d'Activités de Soins à Risque Infectieux)**

**Le manipulateur doit OBLIGATOIREMENT se laver les mains à la fin de ses manipulations**

## **II Généralités concernant la bactériologie**

- Deux types de **milieux de culture** sont utilisés en bactériologie: le **bouillon** (dans un tube) et le **milieu gélosé** (dans une boîte de Petri).

Un **bouillon** est un milieu de culture **liquide**. Une croissance bactérienne se manifeste par un **trouble**.

Un **milieu gélosé (la plupart du temps en boîte de Petri)** est un milieu solide. Une croissance bactérienne se manifeste par des **colonies bactériennes** visibles à l'œil nu (≠ cellules bactériennes visibles au microscope uniquement).

Ces milieux de culture sont préalablement stérilisés à l'autoclave (121°C pendant 15 min)

- Une croissance bactérienne nécessite de placer le milieu de culture (préalablement inoculé) à une **température optimale de croissance** de la bactérie. Pour les bactéries isolées chez l'homme, leur température optimale de croissance est de 37°C. On doit donc **incuber** les milieux de culture à **37°C** dans une **étuve** (si gélose ou bouillon) ou un **bain-marie** (si bouillon). La durée d'incubation est importante: la plupart des bactéries cultivent en 18h à 48h.

- Deux types de manipulation sont réalisés dans ce TP : ensemencement et isolement

Un **ensemencement** permet d'inoculer (de déposer) une bactérie dans un milieu de culture stérile de façon à obtenir après incubation une **nouvelle culture** (on parle d'**enrichissement** si la nouvelle culture est en milieu liquide).

Un **isolement** consiste à déposer une culture bactérienne sur une gélose de façon à obtenir après incubation des colonies isolées et vérifier la pureté de la culture (absence de mélange entre plusieurs types de bactéries). Cela permet d'isoler les différents types bactériens d'un échantillon.

### **III Manipulations à réaliser (à la paillasse) :**

**Conditions aseptiques** (en théorie autour du bec Bunsen ; en pratique en 2022 : pas de flamme pour des questions de sécurité)

#### **1) Manipulation d'apprentissage :**

**A la disposition du manipulateur :**

- 1 culture en bouillon (trouble)
- 1 ensemenceur à usage unique
- 1 bouillon stérile
- 1 milieu gélosé stérile en boîte de Petri

**A partir de la culture en bouillon :**

- Réaliser l'ensemencement d'un bouillon stérile
- Réaliser un isolement

#### **2) Manipulation d'évaluation :**

**A la disposition du manipulateur :**

- 1 culture monobactérienne sur milieu gélosé (boîte de Petri)
- 1 ensemenceur à usage unique
- 1 bouillon stérile

**A partir d'une colonie prélevée sur milieu gélosé :**

- Réaliser un ensemencement d'un bouillon stérile

**Critères d'évaluation :** respect des règles d'aseptie et de sécurité, élimination correcte des déchets, bonne compréhension de la manipulation demandée....