

Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire

Camille Delarras

Ancien maître de conférences
en microbiologie à l'IUT de Brest



11, rue Lavoisier
F-75008 Paris



Allée de la Croix Bossée
F-94234 Cachan cedex

Chez le même éditeur

Legionella

Collection « Monographies de microbiologie »
S. Jarraud, J. Freney, 2006

La cytométrie en flux

X. Ronot, J. Grunwald, J.-F. Mayol, J. Boutonnat, coord., 2006

Candida pathogènes

Collection « Monographies de microbiologie »
D. Chabasse, R. Robert, A. Marot, M. Pihet, 2006

Escherichia coli O157 :H7

Collection « Monographies de microbiologie »
C. Vernozy-Rozand, M.-P. Montet, 2^e édition, 2005

Toxicologie

A. Viala, A. Botta, coord., 2^e édition, 2005

Listeria

Collection « Monographies de microbiologie »
J.-P. Larpent, 3^e édition, 2004

Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux : réglementation, prélèvements, analyses

C. Delarras, B. Trébaol, 2003

Chlamydia

Collection « Monographies de microbiologie »
D. Corsaro, A. Le Fraou, 2002

Entérobactéries – Systématiques et méthodes de diagnostic

Collection « Monographies de microbiologie »
B. Joly, A. Reynaud, 2002

Le technicien d'analyses biologiques

J. Béraud, coord. 2001



© LAVOISIER, 2007
ISBN : 978-2-7430-0945-8

Toute reproduction ou représentation intégrale ou partielle, par quelque procédé que ce soit, des pages publiées dans le présent ouvrage, faite sans l'autorisation de l'éditeur ou du Centre français d'exploitation du droit de copie (20, rue des Grands-Augustins, 75006 Paris), est illicite et constitue une contrefaçon. Seules sont autorisées, d'une part, les reproductions réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective, d'autre part, les analyses et courtes citations justifiées dans le caractère scientifique ou d'information de l'œuvre dans laquelle elles sont incorporées (loi du 1^{er} juillet 1992 – art. L. 122-4 et L. 122-5 et Code pénal art. 425).

Remerciements

À Christiane Delarras pour la lecture du manuscrit avec la participation d'Anne Delarras.

À toutes les personnes qui nous ont apporté, à des titres divers, une aide précieuse :

– M^{me} Laurence Bosmans (laboratoires Sciences et Mer, Le Relecq-Kerhuon) ;

– M. Michel Cornée (AES Laboratoire, Combourg) ;

– M^{me} Isabelle Desforges (bioMérieux, Marcy l'Étoile) ;

– M. Christophe Fisch-Farkas (laboratoires Humeau, La Chapelle-sur-Erdre) ;

– M^{me} Anne-Françoise Gabillet (société Roullier, Dinard) ;

– M. Jean-François Jochim (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette) ;

– M^{me} Anne Lessard (*Le Télégramme de Brest et de l'Ouest*, Morlaix) ;

– M^{me} Catherine Loras (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette) ;

– M^{me} Brigitte Néri (bioMérieux, Marcy l'Étoile) ;

– M^{me} Anne-Cécile Richou (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines) ;

– M^{me} Colette Lemoine (IUT, Brest) ;

– M^{me} Anne Rabier (VWR™ International, Fontenay-sous-Bois) ;

– M. René Roudaut (Coopagri Bretagne, Landerneau) ;

– M. Laurent Roullot (Cofrac, Paris) ;

– M. Alain Sevère (Brest Métropole Océane, Brest).

Un remerciement tout particulier à M. Jean-Paul Larpent (université Blaise-Pascal, Clermont-Ferrand).

Table des matières

Remerciements	III
Sigles et abréviations	XV
Avant-propos	XIX
Introduction	XXV

Première partie

Le laboratoire de microbiologie

Chapitre 1

Conception du laboratoire, fonctionnement et sécurité

1. Conception du laboratoire	3
1.1. Laboratoires de recherche, de développement et d'enseignement	3
1.2. Laboratoires d'analyses microbiologiques des aliments et des eaux	8
1.3. Laboratoires d'analyses de biologie médicale	9
1.4. « Le principe de la marche en avant »	9
2. Fonctionnement	13
2.1. Le « système qualité »	13
2.2. Laboratoires d'analyses microbiologiques (eaux, aliments...)	13
2.3. Laboratoires d'analyses de biologie médicale	14
2.4. Salles de travaux pratiques de microbiologie	15
3. Sécurité et travail	15
3.1. Dans un laboratoire d'analyses microbiologiques des aliments	15
3.2. Dans un laboratoire d'analyses de biologie médicale	16
3.3. Dans une salle de travaux pratiques de microbiologie	16
3.4. En conclusion	18
4. Sécurité et législation	18
4.1. Agents pathogènes	18
4.2. Santé et sécurité des travailleurs	21

Chapitre 2

Matériel principal du laboratoire de microbiologie

1. Appareils d'équipement principaux du laboratoire	23
1.1. Hotte à flux laminaire et poste de sécurité microbiologique (PSM)	23
1.2. Étuves	28
1.3. Autoclaves	30
1.4. Bains-marie ou bains thermostatés	32

1.5. Réfrigérateurs, glacières et congélateurs	32
1.6. Lyophilisateurs	34
2. Matériel d'équipement de la paillasse	34
2.1. PSM	34
2.2. Becs de gaz, becs électriques...	34
2.3. Plaques chauffantes	35
2.4. Matériel utilisé pour les ensemencements	36
2.5. Loupes binoculaires et microscopes optiques	37
2.6. Compteurs de colonies	38
3. Matériel pour la préparation des échantillons	39
3.1. Agitateurs, broyeurs-homogénéisateurs	39
3.2. Diluteurs d'échantillons	40
3.3. Appareils à filtration	40
3.4. Centrifugeurs	41
4. Appareils intervenant dans la préparation des milieux de culture	41
4.1. Balances	41
4.2. pH-mètres	42
4.3. Four à micro-ondes	42
4.4. Appareils à répartir les milieux de culture	42
4.5. Autoclaves pour la stérilisation des milieux de culture	42
4.6. Autopréparateurs ou préparateurs de milieux de culture	43
5. Récipients en verre et en matériaux plastiques	43
6. Automates de microbiologie	45

Chapitre 3

Préparation et stérilisation du matériel et des milieux de culture

1. Préparation du matériel courant	47
1.1. Lavage des récipients	47
1.2. Bouchage des récipients	47
1.3. Boîtes de Petri	48
1.4. Pipettes graduées et pipettes Pasteur	48
2. Préparation des milieux de culture	48
2.1. À partir de leurs constituants chimiques	48
2.2. À partir des milieux déshydratés	52
2.3. Contrôle de qualité des milieux et des réactifs	52
2.4. Classification des milieux de culture	55
3. Stérilisation du matériel et des milieux de culture	59
3.1. L'autoclavage	60
3.2. Autres procédés de stérilisation	62
4. Utilisation des milieux de culture	63
4.1. Milieux d'usage courant	63
4.2. Milieux d'isolement	68
4.3. Milieux d'identification et galeries biochimiques d'identification	76

*Chapitre 4***Méthodes de travail en microbiologie**

1. Techniques d'ensemencement des micro-organismes	83
1.1. Travail sur paillasse avec des becs Bunsen de sécurité	83
1.2. Travail sous PSM	86
1.3. Exemples d'ensemencement de micro-organismes	86
2. Techniques d'isolement des bactéries	88
2.1. Préparation et ensemencement des milieux de culture en boîtes de Petri	88
2.2. Méthode des quadrants	89
3. Dénombrement des micro-organismes	92
3.1. Technique générale des dilutions et applications	92
3.2. Techniques de dénombrement	94
4. Techniques d'observation des bactéries	101
4.1. Examen macroscopique des bactéries	101
4.2. Examen microscopique des bactéries	105
4.3. Techniques de coloration	108
5. Contrôle d'hygiène des surfaces de travail	118
5.1. Problématique	118
5.2. Boîtes contact	119
5.3. Lames gélosées	122

*Chapitre 5***Milieux de culture et tests biochimiques pour l'identification bactérienne**

1. Milieux de culture et tests biochimiques du métabolisme respiratoire	126
1.1. Les quatre types respiratoires des bactéries	126
1.2. Recherche de la catalase – Test catalase	128
1.3. Recherche de l'oxydase – Test oxydase	129
1.4. Recherche des nitrate-réductases (NR)	130
1.5. Mesure de l'activité de la réductase microbienne – Application	132
2. Milieux de culture et tests biochimiques du catabolisme des glucides	133
2.1. Milieux de culture pour l'étude de la voie d'attaque des glucides	133
2.2. Milieux glucidiques pour bactéries fermentatives	137
2.3. Milieux de culture pour la voie d'attaque de certains glucides	147
2.4. Milieux de culture pour l'étude des dérivés de l'acide pyruvique	149
2.5. Milieu de culture pour l'utilisation du citrate de sodium	152
3. Milieux de culture et tests biochimiques du catabolisme des protéines	154
3.1. Milieux de culture pour bactéries protéolytiques	154
3.2. Milieux de culture pour bactéries dégradant les acides aminés	157
3.3. Milieux de culture pour les bactéries dégradant des acides aminés particuliers	164
3.4. Milieux de culture pour la dégradation de l'urée	166
3.5. Milieux de culture mixtes	167
4. Milieux de culture et tests biochimiques du catabolisme des lipides	170
4.1. Estérases	170
4.2. Lipases	171
4.3. Lécithinases	172

*Deuxième partie***Principaux micro-organismes recherchés en microbiologie
d'analyse ou de contrôle sanitaire***Chapitre 1***Principaux micro-organismes recherchés en routine
(aliments, eaux, produits cosmétiques, produits pharmaceutiques...)**

1. Analyses et/ou contrôles microbiologiques sanitaires	177
1.1. Paramètres ou critères microbiologiques des produits destinés à l'homme	177
1.2. Surveillance sanitaire des produits destinés à l'homme	182
1.3. Contrôles microbiologiques des produits	184
2. Conditions physicochimiques de culture des micro-organismes	187
2.1. Température	187
2.2. pH	188
2.3. Pression osmotique	189
2.4. Humidité ou Aw	190
3. Micro-organismes totaux	191
3.1. Définitions	191
3.2. Milieux de recherche et de dénombrement	193

*Chapitre 2****Bacillus et ex-Bacillus***

1. Habitats	195
2. Classifications	196
2.1. Classification de Bergey (1994)	196
2.2. Classification phylogénique	196
3. Groupes phénotypiques	196
3.1. Groupe I. <i>B. polymyxa</i> groupe	196
3.2. Groupe II. <i>B. subtilis</i> groupe	197
3.3. Groupe III. <i>B. brevis</i> groupe	197
3.4. Groupe IV. <i>B. sphaericus</i> groupe	197
3.5. Groupe V. Thermophiles	197
3.6. Groupe VI. Thermophiles acidophiles	198
3.7. Espèces non classées	198
3.8. Nouveaux genres	198
4. Caractères principaux	198
5. Milieux d'isolement	199
5.1. Composition chimique et mode d'action du milieu de culture	199
5.2. Ensemencement et incubation du milieu	200
5.3. Lecture et interprétation du milieu	200
5.4. Contrôle de qualité du milieu	201
6. Identification biochimique	201
6.1. Tests de caractérisation	201
6.2. Galerie api® 50 CH bioMérieux® SA	201
7. Surveillance et épidémiologie	206

7.1. <i>Bacillus cereus</i>	206
7.2. <i>Bacillus anthracis</i>	207

Chapitre 3 *Campylobacter*

1. Habitats	209
2. Classifications	209
2.1. Classification de Bergey (1994)	209
2.2. Classification phylogénique	209
2.3. Espèces de <i>Campylobacter</i> et pouvoir pathogène	210
3. Caractères principaux	211
4. Isolement	211
4.1. En bactériologie clinique	211
4.2. En microbiologie alimentaire	213
5. Identification biochimique	219
5.1. Composition de la galerie	220
5.2. Préparation, inoculation et incubation de la galerie	220
5.3. Lecture de la galerie	221
5.4. Interprétation	223
6. Surveillance	224
6.1. Organisation mondiale de la santé (OMS)	224
6.2. Eurosurveillance	224
6.3. Centres nationaux de référence	225
7. Épidémiologie	225

Chapitre 4 *Clostridium*

1. Classifications	227
1.1. Classification de Bergey (Bergey, 1994)	227
1.2. Classification phylogénique	227
2. Espèces principales	227
2.1. Groupes physiologiques	228
2.2. Espèces pathogènes	228
2.3. <i>Clostridia</i> sulfitoréducteurs	230
3. Caractères principaux	232
4. Isolement	232
4.1. En bactériologie médicale	232
4.2. En bactériologie des eaux	234
4.3. En bactériologie alimentaire	234
4.4. En Pharmacopée	238
5. Identification	240
5.1. Présentation de la galerie Rapid ID 32 A	240
5.2. Composition de la galerie	240
5.3. Préparation, inoculation et incubation de la galerie	241
5.4. Lecture de la galerie	241
5.5. Interprétation	243
6. Surveillance et épidémiologie	243

6.1. Botulisme	243
6.2. Tiac à <i>Clostridium perfringens</i>	245
6.3. Tétanos	245

Chapitre 5

***Enterobacteriaceae* (entérobactéries)**

1. Classifications	247
1.1. Classification de Bergey (Bergey, 1994)	247
1.2. Classification phylogénique	247
2. Entérobactéries courantes et rares	248
2.1. Entérobactéries courantes	248
2.2. Entérobactéries rares ou récemment décrites	252
3. Caractères des entérobactéries	253
3.1. Caractères principaux	253
3.2. Caractères communs	254
3.3. Coliformes	254
4. Milieux de culture pour entérobactéries	255
4.1. Milieu d'enrichissement sélectif liquide	255
4.2. Milieux d'isolement sélectifs	257
5. Milieux de culture pour <i>Salmonella</i> et <i>Shigella</i>	264
5.1. Milieux d'enrichissement sélectifs liquides	264
5.2. Milieux d'isolement sélectif solides	268
6. Milieux d'isolement pour <i>Yersinia</i>	276
6.1. Milieux de culture	276
6.2. En bactériologie médicale	278
6.3. En bactériologie alimentaire	279
7. Identification biochimique	279
7.1. Milieux chromogéniques ou fluorogéniques d'identification pour <i>Escherichia coli</i>	279
7.2. Identification des <i>Salmonella</i> par <i>polymerase chain reaction</i> ..	286
7.3. Galeries API bioMérieux® SA	287
8. Surveillance et épidémiologie	290
8.1. Surveillance	290
8.2. Épidémiologie	294

Chapitre 6

Listeria

1. Habitats	297
2. Classifications	297
2.1. Classification de Bergey (1994)	297
2.2. Classification phylogénique	297
2.3. Espèces	298
3. Caractères	298
3.1. Caractères principaux	298
3.2. Caractères spécifiques de <i>Listeria monocytogenes</i>	299
4. Recherche et dénombrement	300
4.1. Milieux de culture	300

4.2. Détection conventionnelle	305
4.3. Dénombrement conventionnel	306
4.4. Confirmation des colonies de <i>Listeria</i>	307
5. Identification	308
5.1. Identification biochimique par microméthode	308
5.2. Identification des <i>Listeria</i> par <i>polymerase chain reaction</i>	311
6. Surveillance et épidémiologie de la listériose humaine	312
6.1. Organismes de surveillance	312
6.2. épidémiologie et surveillance des aliments	313

Chapitre 7

Levures et moisissures

1. Champignons	317
1.1. Propriétés principales	317
1.2. Champignons microscopiques	318
2. Levures	320
2.1. Classification	320
2.2. Propriétés principales	320
2.3. Levures utiles, nuisibles et pathogènes	321
2.4. Normes microbiologiques – Autres applications	322
3. Milieux pour la culture des levures et moisissures	323
3.1. Milieux de culture classiques	323
3.2. Gélose Sabouraud	323
4. Isolement, dénombrement des levures, moisissures et autres champignons	324
4.1. En bactériologie clinique	324
4.2. En bactériologie alimentaire	325
4.3. En bactériologie industrielle	328
5. Identification des levures	332
5.1. Milieux d'identification pour <i>Candida</i> dont <i>Candida albicans</i>	332
5.2. Identification biochimique des levures	334

Chapitre 8

Pseudomonas et ex-*Pseudomonas*

1. Habitats	339
2. Classifications	339
2.1. Classification de Bergey (1994)	339
2.2. Classification phylogénique	339
2.3. Espèces de <i>Pseudomonas</i> et ex- <i>Pseudomonas</i>	340
3. Caractères principaux et production de pigments	342
3.1. Caractères principaux	342
3.2. Production de pigments	343
4. Isolement de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	344
4.1. Milieux pour entérobactéries	344
4.2. Milieux spécifiques	344
5. Identification de <i>Pseudomonas</i> et ex- <i>Pseudomonas</i>	349
5.1. Milieux de confirmation	349

5.2. Galeries biochimiques d'identification	351
6. Surveillance et épidémiologie	355

Chapitre 9

Staphylococcus, Micrococcus et ex-Micrococcus

1. Habitats	357
2. Classifications	357
2.1. Classification de Bergey (1994)	357
2.2. Classification phylogénique des staphylocoques	357
2.3. Classification phylogénique des microcoques et ex-microcoques	358
3. Espèces	358
3.1. Espèces de staphylocoques	358
3.2. Espèces de microcoques et ex-microcoques	360
4. Caractères principaux et milieux de culture	361
5. Isolement	362
5.1. Milieu d'enrichissement	362
5.2. Milieux d'isolement sélectifs	364
6. Identification	371
6.1. Confirmation des souches de <i>Staphylococcus aureus</i>	371
6.2. Pré-identification	374
6.3. Identification biochimique	376
7. Surveillance et épidémiologie	381
7.1. Surveillance	381
7.2. épidémiologie	384

Chapitre 10

Streptococcus et Enterococcus

1. Habitats	387
1.1. Habitat des streptocoques	387
1.2. Habitat des entérocoques	387
2. Classifications des streptocoques et des entérocoques	388
2.1. Classification de Bergey (1994)	388
2.2. Classification phylogénique des streptocoques	388
2.3. Classification phylogénique des entérocoques	388
2.4. Classification sérologique de Lancefield	388
3. Espèces de streptocoques et d'entérocoques	389
3.1. Streptocoques	389
3.2. Entérocoques	391
3.3. Streptocoques du groupe D	391
3.4. Pouvoir pathogène	391
4. Caractères principaux	393
5. Isolement et/ou dénombrement des streptocoques et des entérocoques	394
5.1. Milieux de culture et d'isolement pour streptocoques	394
5.2. Milieux de culture pour entérocoques	396
6. Identification des streptocoques et des entérocoques	401
6.1. Milieux de confirmation et d'identification pour entérocoques	401
6.2. Identification par microméthode	404

7. Surveillance des streptocoques du groupe D	407
7.1. Dans les eaux	408
7.2. Dans les aliments	408

Chapitre 11

Contrôle microbiologique des produits cosmétiques

1. Législation des produits cosmétiques	409
1.1. Directive « cosmétique » 76/768/CEE (1976)	409
1.2. Autres directives européennes	411
1.3. Textes réglementaires français	411
1.4. Dossier d'information sur les produits cosmétiques	412
2. Surveillance des produits cosmétiques	412
2.1. Réglementation	412
2.2. Contrôles en laboratoire	413
2.3. Inspection	413
2.4. Évaluation de la sécurité des produits	413
3. Contrôle microbiologique et normes microbiologiques	413
3.1. Sources de contamination potentielles	414
3.2. Paramètres et normes microbiologiques	416
4. Méthodes d'analyse microbiologique des produits cosmétiques	417
4.1. Préparation des échantillons	417
4.2. Micro-organismes ou bactéries aérobies mésophiles	420
4.3. Micro-organismes spécifiques	422
5. « Challenge-test »	427
Annexe générale 1 – Lexique de microbiologie	429
Annexe générale 2 – Des agents biologiques pathogènes	433
Annexe générale 3 – Classification phylogénique des bactéries	435
Annexe générale 4 – Procédures de travail	439
Annexe générale 5 – Paramètres recommandés par une équipe HACCP en fonction du niveau de risque	445
Annexe générale 6 – Notions sur les antibiotiques	447
Annexe générale 7 – Milieux de culture utilisés en Pharmacopée ...	451
Annexe générale 8 – Quelques adresses utiles de sociétés commercialisant du matériel de microbiologie	453
Bibliographie	455
Index	463

Sigles et abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
Afnor	Association française de normalisation
Afssa	Agence française de sécurité sanitaire des aliments
Afssaps	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
Afssse	Agence française de sécurité sanitaire environnementale
ANC	Acide nalidixique, colimycine
APHA	<i>American Public Health Association</i>
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
ATC	Agents transmissibles conventionnels
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATNC	Agents transmissibles non conventionnels ou « prions »
Aw	<i>Activity of water</i>
BCIG	Acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucuronique
BEH	<i>Bulletin épidémiologique hebdomadaire</i>
BPL	Bonnes pratiques de laboratoire
BPO	Bactérie pathogène opportuniste
CCM	<i>Czech Collection of Microorganisms</i>
CEE	Communauté économique européenne, appelée maintenant Union européenne
CEN	Comité européen de normalisation
CIP	Collection de l'Institut Pasteur
CLIN	Comité de lutte contre les infections nosocomiales
CNR	Centre national de référence
CNRCH	Centre national de référence des <i>Campylobacter</i> et des <i>Heliobacter</i>
CNRSS	Centre national de référence des <i>Salmonella</i> et des <i>Shigella</i>
Cofrac	Comité français d'accréditation
CSAH	Comité scientifique de l'alimentation humaine
CSHPF	Conseil supérieur d'hygiène publique de France
CSMVSP	Comité scientifique des mesures vétérinaires en rapport avec la santé publique
Ddass	Direction départementale des affaires sanitaires et sociales
DGCCRF	Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes
DDSV	Direction départementale des services vétérinaires
DGAL	Direction générale de l'alimentation
DG SANCO	Directorat général de la commission européenne pour la santé et la protection du consommateur
DGS	Direction générale de la santé

DIN	<i>Deutsches Institut für Normung</i> (norme allemande)
Diren	Direction régionale de l'environnement
DO	Déclaration obligatoire
Dom-Tom	Départements et territoires d'outre-mer
DSM	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>
DSV	Direction des services vétérinaires
ECA	<i>Enterobacterial common antigen</i>
Ecco	<i>European Culture Collection Organization</i>
EHEC	<i>Enterohaemorrhagic E. coli</i> ou <i>Escherichia coli</i> entérohémorragique
EN	<i>European Standard</i> (norme européenne)
EPEC	<i>Enteropathogenic E. coli</i> ou <i>Escherichia coli</i> entéropathogène
ETEC	<i>Enterotoxinogenic E. coli</i> ou <i>Escherichia coli</i> entérotoxigène
EWGLI	<i>European Working Group for Legionella infections</i>
FERCO	Fédération européenne de restauration collective
FIP	Fédération des industries de la parfumerie
GBEA	Guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale
GC %	Guanine et cytosine dans l'ADN, exprimées en moles pour 100
HACCP	<i>Hazard analysis critical control point</i>
HBEA	<i>High efficiency particulate air</i>
HBS	Hotte bactériologique de sécurité
Ifremer	Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer
IMVIC	Indole, rouge de méthyle, Voges-Proskauer, inositol, citrate
InVS	Institut national de veille sanitaire
ISO	<i>International Standard Organization</i> (Organisation internationale de normalisation)
JO	<i>Journal officiel de la République française</i>
JO	<i>Journal officiel de l'Union européenne</i> , nouvelle dénomination du JOCE (depuis le 1 ^{er} février 2003)
JOCE	<i>Journal officiel de la Communauté européenne</i>
LIR	Laboratoire interrégional de la DGCCRF
MAS	Maison d'accueil spécialisée
MUD	4-méthyl-umbelliféryl-β-D-glucoside
MUG	4-méthyl-umbelliféryl-β-D-glucuronide
NF	Norme française
OMS	Organisation mondiale de la santé
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PHMB	Chlorure de polyhexaméthylène biguanide
PSM	Poste de sécurité microbiologique
PVD	Pays en voie de développement
RNSP	Réseau national de santé publique créé en 1992, remplacé par l'InVS en 1999
Saur	Société d'aménagement rural et urbain
SCN	Staphylocoques à coagulase négative
STEC	<i>Escherichia coli</i> (producteurs de) shiga-toxines
Tar	Tour aéroréfrigérante
Tia	Toxi-infection alimentaire
Tiac	Toxi-infection alimentaire collective

TTC	Chlorure de triphényltétrazolium
UFC	Unités formant colonies
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Lumière ultraviolette
VTEC	<i>Verotoxinogenic E. coli</i> ou <i>Escherichia coli</i> vérotoxino-gène
WFCC	<i>World Federation for Culture Collection</i>

Avant-propos

« Le microbe est un être vivant, infiniment petit, qui n'est visible qu'au microscope ».

C'est la définition du mot « Microbe » donnée le 29 janvier 1894 par M. Roux, dans la première leçon « Des microbes en général », de son cours de microbiologie à l'Institut Pasteur à Paris.

« Les microbes sont très répandus dans la nature ; on les rencontre non seulement dans l'organisme, mais dans le milieu qui nous environne, dans l'air, l'eau, le sol... et ils se développent quand ils trouvent certaines conditions favorables d'humidité et de température ».

Ces phrases sont extraites du « Cours de Microbie technique » professé à l'Institut Pasteur en 1894 (tome 1), constitué par les notes recueillies et rédigées par le D^r L..., médecin de première classe de la Marine.

Découverte des micro-organismes

Des maladies bactériennes telles que la peste, la lèpre, le choléra sont connues depuis l'Antiquité, ainsi que le tétanos, l'érysipèle, la dysenterie découverts par le médecin grec Hippocrate au V^e siècle avant J.-C. D'autres maladies (syphilis, typhus) ont été décrites depuis le XVI^e siècle, mais les bactéries responsables de ces maladies n'ont été découvertes qu'au XIX^e siècle ou même au début du XX^e siècle pour la syphilis et le typhus.

Au XVII^e siècle, un savant hollandais, Antonie Van Leeuwenhoek (1632-1723) fut le premier à observer des particules invisibles à l'œil nu, mobiles ou immobiles (des sphères, des bâtonnets, des spirilles...), dans des eaux de rivières, des décoctions de poivre ou de foin..., grâce à un microscope rudimentaire (une loupe) qu'il avait fabriqué. Il appela toutes ces formes vivantes « animalcules » et il fera part de ses découvertes au travers de lettres qu'il adressa à la Royal Society de Londres à partir de 1673.

Ce n'est que dans la deuxième moitié du XIX^e siècle que les micro-organismes furent redécouverts et étudiés, avec tout d'abord la découverte, en 1850 par Rayer et Davaine, du bacille du charbon (*Bacillus anthracis*).

Pour que la bactériologie prenne son essor, il faut attendre les années 1870 et les travaux de deux savants : le Français Louis Pasteur (1822-1895) et l'Allemand Robert Koch (1843-1910). Avec leurs travaux respectifs sur le bacille du charbon, et bien d'autres travaux, ils seront considérés comme les deux génies de la microbiologie et les fondateurs de la bactériologie médicale.

Pour le premier, ce sera notamment la préparation du vaccin contre la maladie du charbon en 1881 et du vaccin contre la rage (due à un virus) en 1884 ; pour le second, ce sera la découverte du bacille tuberculeux humain (*Mycobacterium tuberculosis* ou bacille de Koch) en 1882 et du vibriion cholérique (*Vibrio cholerae*) en 1883, après la mise au point en 1881 des techniques d'isolement des bactéries sur milieu solide. En 1887, un assistant de Koch (Richard Petri) donnera son nom à la célèbre boîte de verre, ronde et plate, la boîte de Petri, qui, aujourd'hui, est en polystyrène.

De nombreuses bactéries pathogènes seront découvertes au cours des trois dernières décennies du XIX^e siècle :

- le bacille de la lèpre par Hansen (*Mycobacterium leprae*) en 1873 ;
- le bacille de la typhoïde par Eberth (*Salmonella Typhi*) en 1880 ;
- le bacille diphtérique par Loeffler (*Corynebacterium diphtheriae*) en 1884 ;
- le staphylocoque (*Staphylococcus*) et le streptocoque de l'érysipèle (*Streptococcus*) par Rosenbach la même année ;
- le méningocoque par Weichselbaum en 1887 ;
- le bacille tétanique (*Clostridium tetani*) par Kitasato en 1889 ;
- *Clostridium perfringens* par Welch et Nuttall en 1892 ;
- le coccobacille de la peste par Yersin et Kitasato (*Yersinia pestis*) en 1894 ;
- le bacille dysentérique par Shiga (*Shigella dysenteriae*) en 1898...

D'autres seront découvertes au début du XX^e siècle, parmi lesquelles le bacille de la coqueluche par Bordet-Gengou (*Bordetella pertussis*) en 1901, le tréponème de la syphilis par Schaudinn (*Treponema pallidum*) en 1905, le streptocoque du rhumatisme articulaire aigu (RAA) [*Streptococcus pyogenes*] par Dick en 1924...

Dans les années 1970, une nouvelle bactérie pathogène pour l'homme a été isolée et identifiée aux États-Unis : *Legionella pneumophila*, agent de la légionellose (cf. Delarras et Trébaol, 2003).

Classification des êtres vivants

Ces micro-organismes furent tout d'abord classés dans le règne végétal. Mais, dès 1866, un allemand, Haeckel (zoologiste) va proposer la création du règne des Protistes, à côté du règne végétal et du règne animal. Ce règne des protistes regroupe des organismes unicellulaires ou pluricellulaires qui sont dépourvus de différenciation cellulaire : algues, champignons, protozoaires et bactéries. Le terme de microbes, synonyme de protistes, ne sera prononcé en public pour la première fois qu'en 1878, par Sédillot, lors d'une séance de travail à l'Académie des sciences.

Ce n'est qu'en 1937 que Chatton (protozoologiste) subdivisera ce règne en protistes supérieurs à cellules eucaryotes (algues sauf algues bleu-vert, protozoaires et champignons) et en protistes inférieurs à cellules procaryotes (bactéries et algues bleu-vert).

Au xx^e siècle, la classification des êtres vivants évoluera avec deux classifications :

- la classification en cinq règnes selon Whittaker et Margulis (1978) ;
- la classification en trois « domaines » de Woese (1990) fondé sur la biologie moléculaire : *cf. infra* « Classification phylogénétique ».

La correspondance entre ces deux classifications est présentée dans le tableau I.

Tableau I ■ Les deux classifications des êtres vivants.

Règnes d'après Whittaker et Margulis (1978)	Organismes	« Domaines » d'après Woese C R (1990)...
<i>Prokaryotae</i>	Archaeobactéries ou archéobactéries	<i>Archaea</i> ou archées ¹
	Eubactéries Cyanobactéries ²	<i>Bacteria</i> ² ou bactéries (à cellule procaryote)
<i>Protoctista</i>	Protozoaires, Protophytes (euglènes, péridiniens, diatomées) Algues (vertes, rouges et brunes)	<i>Eucarya</i> ou eucaryotes (à cellule eucaryote)
<i>Fungi</i>	Champignons, lichens	
<i>Plantae</i>	Plantes	
<i>Animalia</i>	Animaux	

1. Ces bactéries constituent le domaine « *Archaea* » avec deux phylums dans la classification phylogénique (*Bergey's Manual*, 2004) : elles ne sont ni des procaryotes, ni des eucaryotes (*cf. leurs relations phylogéniques* : Larpent, 2000 ; Pol, 2001).

2. Le domaine *Bacteria* ou *Eubacteria* (eubactéries) dans la classification phylogénique (*Bergey's Manual*, 2004) comporte 23 phylums dont le phylum X *Cyanobacteria* (ex-algues bleu-vert ou Cyanophycées).

La microbiologie est la science qui étudie les protistes ou microbes. Elle comprend la bactériologie, la mycologie, l'algologie...

La bactériologie est la branche de la microbiologie qui s'intéresse spécifiquement aux bactéries. Des eubactéries font principalement l'objet de cet ouvrage, qui comporte par ailleurs quelques éléments de mycologie, science qui étudie les champignons (*cf. 2^e partie, chapitre 7 « Levures et moisissures »*).

Les protistes ou microbes se différencient fondamentalement des virus (organismes non cellulaires) dont l'existence avait été révélée par Beijerinck en 1888 lors d'études réalisées sur la mosaïque (maladie) affectant les feuilles de tabac.

En effet, les virus sont des parasites obligatoires de cellules vivantes humaines, animales, végétales ou bactériennes. Ils ne possèdent qu'un seul type d'acide nucléique (ADN ou ARN) et ils ne peuvent vivre et se reproduire que chez leur hôte vivant. Leur étude n'entre pas dans le cadre de cet ouvrage.

Taxonomie des micro-organismes

La taxonomie ou taxinomie représente l'étude de la diversité des micro-organismes et des relations susceptibles d'exister entre eux et recouvre trois domaines : la classification, la nomenclature et l'identification (Larpent, 2000).

L'histoire de la classification des bactéries est longue, complexe et a beaucoup évolué depuis les classifications de Cohn en 1872, de Lehmann et Neumann en 1896 et de Migula en 1902, fondées sur les seuls caractères morphologiques.

► Classification phénétique

Outre les critères morphologiques, les critères physiologiques, de pathogénicité, de lysotypie... des souches bactériennes seront ensuite pris en considération pour classer les bactéries : c'est jusqu'au début des années 1960, la classification phénétique (ou phénotypique).

► Taxonomie numérique

Une autre approche de la taxonomie, dite numérique, s'est développée grâce aux travaux de Sneath en 1957, alors que l'idée même de cette méthode de classification avait été proposée par le botaniste français Adanson en 1763. Elle utilise un très grand nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques..., tous d'égale importance, pour chaque souche bactérienne alors que dans la classification phénotypique, seuls certains caractères bien choisis sont utilisés.

Tous ces caractères sont traduits mathématiquement pour calculer des valeurs de similitude entre les souches et pour former des groupes de similitude. Ces méthodes ont progressé grâce aux travaux de Sokal et Sneath en 1963 et 1973 et elles ont été appliquées aux bactéries par de nombreux microbiologistes dans les années 1970 (Delarras, 1981).

► Classification phylogénétique (ou classification phylogénique)

Au début de ce XXI^e siècle, une nouvelle classification bactérienne se développe : la classification phylogénétique ou phylogénique (Larrent, 2000 ; *Bergey's Manual*, 2001-2003). Elle est fondée sur les phylums (*cf.* annexe générale 1 « Lexique de microbiologie ») qui sont construits par comparaison du matériel génétique et des produits des gènes, et en particulier par séquençage de l'ARN ribosomique 16 S ou de l'ARNr 5S.

Historiquement, Kluver et Van Niel avaient proposé l'utilisation d'une taxonomie phylogénétique dès 1936. Mais il a fallu attendre le début du développement de la biologie moléculaire, dans les années 1950 à 1980, pour que celle-ci prenne de l'essor : détermination de la composition de l'ADN des bactéries par la recherche de leur GC % (Marmur, 1961), hybridation d'acides nucléiques ARN-ADN grâce aux travaux préliminaires de Marmur *et al.* en 1961, étude des ARNr (ARN ribosomaux) dans les années 1980...

La nouvelle classification présentée dans la deuxième édition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2001-2003) est une classification phylogénétique (*cf. infra*, paragraphe ci-dessous et annexe générale 3).

► Classification de Bergey

La classification adoptée par la majorité des microbiologistes a été celle de Bergey, dont la première édition, intitulée *Bergey's Manual of Determinative*

Bacteriology, date de 1923. Elle a, elle-même, beaucoup évolué au cours de ses éditions successives, qui sont présentées dans le tableau 2.

Tableau 2 ■ Le Manuel de Bergey et ses éditions.

<i>Bergey's Manual of Determinative Bacteriology</i>	Année d'édition	Caractéristiques
1 ^{re} édition	1923	De Bergey D H ¹ <i>et al.</i> , initiée et publiée par <i>the Society of American Bacteriologists</i> ² Le D ^r Bergey est propriétaire nominal du manuel
2 ^e édition	1925	
3 ^e édition	1930	
4 ^e édition	1934	Transfert de propriété de son manuel aux administrateurs initiaux (dont lui-même jusqu'en 1937) et à leurs successeurs : Breed R S <i>et al.</i> de 1937 à 1956...
5 ^e édition	1939	
6 ^e édition	1948	
7 ^e édition	1957	
8 ^e édition	1974	
Version abrégée de la 8 ^e édition	1977	<i>The Shorter Bergey's Manual[●] of Determinative Bacteriology</i>
<i>Bergey's Manual[®] of Systematic Bacteriology Ninth Edition</i> de Holt JG <i>et al.</i> ³	1984 (volume 1) 1987 (volume 2) 1989 (volumes 3 et 4)	Classification des bactéries en 35 sections
<i>Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition</i> de Holt JG <i>et al.</i>	1994 (un seul volume)	Holt JH <i>et al.</i> Classification des bactéries en 35 groupes (ne correspondant pas aux sections ci-dessus)
<i>Bergey's Manual of Systematic Bacteriology</i> Seconde édition de Garrity G	En cinq volumes 2001 (volumes 1 et 2) 2002 (volumes 3 et 4) 2003 (volume 5)	Classification phylogénétique des micro-organismes

1. Bergey David Hendricks (1860-1937).

2. Aujourd'hui appelée *The American Society for Microbiology*.

3. Les deux appellations de l'ouvrage figurent sur la page de couverture du volume 1 de 1984. Mais cette édition constitue aussi la première édition du *Bergey's Manual[®] of Systematic Bacteriology*.

Contrairement à toutes les éditions passées, la deuxième édition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2001-2003) présente donc une classification phylogénétique des micro-organismes. Elle comprend cinq volumes :

- volume 1 (2001) *The Archaeae and the deeply branching and phototrophic Bacteria* ;
- volume 2 (2001) *The Proteobacteria* ;
- volume 3 (2002) *The low G + C Gram-positive Bacteria* ;
- volume 4 (2002) *The high G + C Gram-positive Bacteria* ;
- volume 5 (2003) *The Planctomycetes, Spirochaetes, Fibrobacteres, Bacteroidetes and Fusobacteria*.

Introduction

• **L'objectif de la première partie de cet ouvrage** est d'apporter les connaissances indispensables en microbiologie aux étudiants en formation technique supérieure ou de compléter la formation de techniciens en microbiologie d'analyses de routine. De nombreuses indications données dans cet ouvrage, résultant de notre expérience des travaux pratiques de microbiologie, sont destinées aux étudiants.

La première partie de l'ouvrage traitant du « Laboratoire de microbiologie » s'adresse donc à tous.

En effet, elle présente tout d'abord le laboratoire de microbiologie d'aujourd'hui ou la salle de travaux pratiques de microbiologie pour les étudiants sous ses trois aspects fondamentaux (*cf.* chapitre 1 « Conception du laboratoire, fonctionnement et sécurité »).

Les trois aspects de ce chapitre s'appuient sur les réglementations européenne et française et sur les systèmes incontournables au XXI^e siècle : « principe de la marche en avant », référentiels de qualité...

Le matériel principal d'un laboratoire d'analyses microbiologiques de routine, d'enseignement, voire de recherches est présenté dans le chapitre 2 « Matériel principal du laboratoire de microbiologie », avec la définition du rôle de chaque appareil d'équipement ou de fonctionnement.

La préparation du matériel courant et des milieux de culture est traitée dans le chapitre 3 « Préparation et stérilisation du matériel et des milieux de culture ». Sont présentés les constituants chimiques de ces milieux, leurs agents sélectifs, les différentes catégories de milieux et leur utilisation..., l'ensemble étant illustré de nombreux exemples.

Les méthodes générales de travail de la microbiologie (techniques d'ensemencement, d'isolement, de recherche et de dénombrement des micro-organismes, examens macroscopiques et microscopiques des bactéries) ainsi que les contrôles d'hygiène des surfaces de travail imposés par le système qualité sont développés dans le chapitre 4 « Méthodes de travail en microbiologie ».

Les milieux de culture et leurs tests biochimiques, les plus fréquemment rencontrés en bactériologie de routine, utilisés dans l'identification des bactéries, sont présentés, avec des commentaires, dans le chapitre 5 « Milieux de culture et tests biochimiques pour l'identification bactérienne ».

• **L'objectif de la deuxième partie** « Principaux micro-organismes recherchés en microbiologie d'analyse ou de contrôle sanitaire » est d'apporter des

connaissances théoriques et pratiques sur les micro-organismes recherchés dans les aliments, les eaux, les produits cosmétiques, les produits pharmaceutiques...

La deuxième partie intéresse également les laboratoires d'analyses de biologie médicale. Cependant, des bactéries pathogènes non associées à une contamination par l'eau ou par les aliments (gonocoque, méningocoque, tréponème...) sont simplement citées à titre d'exemples dans cet ouvrage ; pour les techniques d'isolement spécifiques de ces germes à partir des prélèvements biologiques (selles, urines, sang, liquide céphalo-rachidien...) et pour les études épidémiologiques, le lecteur devra se référer aux nombreuses publications existantes pour la bactériologie médicale.

Pour chacun des micro-organismes (principalement des bactéries), sont proposés : classifications, habitats, caractères principaux et éventuellement spécifiques, milieux d'isolement et identification. De surcroît, la surveillance et l'épidémiologie de ces micro-organismes sont présentées pour les aliments ; celles relatives aux eaux sont simplement évoquées car elles ont été traitées dans notre ouvrage précédent (Delarras et Trébaol, 2003).

Pour les produits pharmaceutiques, seuls quelques éléments d'informations sont apportés, sans entrer dans les détails de la Pharmacopée française et européenne. Pour les produits cosmétiques (deuxième partie, chapitre II), le contrôle microbiologique est exposé grâce aux informations et aux conseils donnés par un laboratoire de cosmétologie.

- Les milieux de culture d'usage courant, d'isolement, d'identification... pour la microbiologie médicale, alimentaire, des eaux, des produits cosmétiques et pharmaceutiques... présentés dans cet ouvrage résultent de notre choix. Leur composition chimique est reproduite avec l'aimable autorisation des fabricants ou distributeurs de ces produits : AES laboratoires, bioMérieux® SA, Bio-Rad, laboratoires Humeau et VWR™ International (produits Merck).

Les informations techniques relatives à la lecture et à l'interprétation de ces milieux sont établies à partir des fiches techniques des milieux de culture de ces fabricants, mais aussi de la bibliographie. La disponibilité commerciale indiquée pour les milieux de culture (milieu déshydraté, flacons, tubes, boîtes de Petri...) est purement indicative car elle peut être modifiée à tout moment par le fabricant.

Les utilisateurs de ces milieux de culture doivent impérativement prendre connaissance des précautions d'utilisation, des conditions de stockage, du mode opératoire, du contrôle de qualité, des performances, de l'élimination des déchets... mentionnés dans les fiches techniques des fabricants, toutes ces informations ne pouvant être reprises dans cet ouvrage.

Les normes NF et/ou EN et/ou ISO (Afnor) relatives aux méthodes de travail en microbiologie et aux milieux de culture (mentionnés dans les fiches techniques des fabricants) sont simplement citées à titre d'information, car non reproductibles.

- Les bactéries recherchées en microbiologie des aliments, des eaux, clinique ou autres sont classées dans cet ouvrage dans la classification de Bergey (*Bergey's Manual*, 1994) et dans la nouvelle classification phylogénique (Larrent, 2000 ; *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, 2nd édition, 2004). L'objectif est

de fournir une base de classification de ces bactéries, sachant que celle-ci est en évolution permanente avec des remaniements taxonomiques et la description de nouvelles espèces ou sous-espèces.

Pour les salmonelles, la taxonomie actuelle de ces germes (2005) est présentée dans la deuxième partie, chapitre 5 « *Enterobacteriaceae* (entérobactéries) », paragraphe 2.1.2.1.). Les sérovars de la sous-espèce *Salmonella enterica* subsp. *enterica* cités dans cet ouvrage sont écrits sous la forme recommandée ; par exemple *Salmonella* Typhi a comme dénomination complète *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhi.

- Les méthodes de travail de la biologie moléculaire (*polymerase chain reaction* ou PCR, *reverse transcriptase-PCR* ou RT-PCR...) sont illustrées par deux exemples de PCR chez les *Salmonella* et *Listeria*.

Première partie

Le laboratoire de microbiologie



1

Conception du laboratoire, fonctionnement et sécurité

1. Conception du laboratoire

1.1. Laboratoires de recherche, de développement et d'enseignement

La conception du laboratoire de microbiologie, ses aménagements internes et les pratiques opératoires sont présentés dans l'arrêté interministériel du 13 août 1996 (*JO* du 7 septembre 1996) fixant les mesures techniques de prévention, notamment de confinement, à mettre en œuvre dans les industries et les laboratoires de recherche et d'enseignement où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes.

En fait, cet arrêté transpose la directive 90/679/CEE du Conseil du 26 novembre 1990 et ses modifications ultérieures.

1.1.1. Annexe I de cet arrêté

- L'annexe I de cet arrêté présente les mesures et les définitions des niveaux de confinement minimum à mettre en œuvre dans les laboratoires de recherche, de développement et d'enseignement où sont utilisés des agents biologiques pathogènes des groupes 2, 3 ou 4 (*cf. infra*, paragraphe 4.1.2.).

Ces mesures et niveaux de confinement sont présentés dans les tableaux 3, 4A et 4B ainsi que dans le tableau 5, avec les légendes communes suivantes :

- Oui : exigence ;

- Non : pas d'exigence ;

- Optionnel : doit être décidé au cas par cas, sur la base de l'évaluation des risques, à la suite de laquelle ces mesures devront – ou non – être appliquées.

- Les niveaux de confinement ou « zones de travail à risques » sont définis comme suit :

- niveau de confinement 1 : risque faible ou négligeable ;

- niveau de confinement 2 : risque modéré ;

- niveau de confinement 3 : risque élevé ;
- niveau de confinement 4 : risque très élevé.

• Pour l'ensemble du monde, il existe huit laboratoires P4 (protection, niveau de confinement maximal 4) pouvant travailler sur les agents biologiques pathogènes du groupe 4 (ou classe 4) :

- un en Afrique du Sud à Sandringham ;
- un au Canada à Winnipeg (Manitoba) ;
- trois aux États-Unis : Fort Detrick (Maryland), Galveston (Texas) et Atlanta (Georgia) ;
- un en Fédération de Russie à Koltsovo (région de Novosibirsk) ;
- deux dans l'Union européenne : Lyon en France (laboratoire P4 Jean Mérieux) et Solna en Suède.

Des projets de laboratoires P4 existent dans trois pays européens : Italie, Pays-Bas et Suisse.

Dans ces huit laboratoires P4 « scaphandre », le personnel travaille et se déplace, dans les locaux, revêtu d'une combinaison intégrale analogue à celle utilisée par le personnel dans l'industrie nucléaire. La protection maximale exigée pour manipuler les micro-organismes pathogènes du groupe 4 (virus des fièvres hémorragiques principalement) est aussi désignée par le sigle NSB4 (niveau de sécurité biologique 4).

Tableau 3 ■ Conception du laboratoire.

Mesures de confinement	Niveaux de confinement		
	2	3	4
a) Conception du laboratoire			
1. Signalisation du laboratoire (pictogramme « danger biologique »)	Oui	Oui	Oui
2. Laboratoire séparé des autres locaux au moins par une porte	Oui	Oui	Oui
3. Accès au laboratoire <i>via</i> un sas	Non	Optionnel ¹	Oui
4. Accès réglementé et verrouillable. Accès possible par les seuls travailleurs autorisés	Oui	Oui	Oui, par un sas
5. Possibilité de fermer hermétiquement le lieu de travail pour permettre la désinfection (fumigation)	Optionnel	Oui	Oui
6. Filtration de l'air extrait du lieu de travail (filtre HEPA) avec évacuation de l'air vers l'extérieur	Non	Oui	Oui, double filtre HEPA
7. Filtration de l'air entrant dans le lieu de travail	Non	Optionnel	Oui
8. Présence d'une fenêtre d'observation ou d'un système équivalent permettant de voir les occupants	Optionnel	Oui	Oui
9. Moyen de communication avec l'extérieur	Non	Optionnel	Oui

Tableau 3 (suite) ■ Conception du laboratoire.

Mesures de confinement	Niveaux de confinement		
	2	3	4
10. Maintien d'une pression négative dans le laboratoire par rapport aux zones voisines	Non	Oui ²	Oui, type III ou autre moyen équivalent
11. Système d'alarme pour détecter tout changement inacceptable de la pression d'air	Non	Oui, si mise en dépression	Oui
12. Approvisionnement en énergie électrique de secours	Non	Optionnel	Oui
13. Système de ventilation de secours	Non	Non	Oui

1. Oui si pression négative.

2. Ou moyens alternatifs de confinement évalués donnant des conditions de sécurité biologique équivalente.

Tableau 4A ■ Aménagements internes.

Mesures de confinement	Niveaux de confinement		
	2	3	4
b) Aménagements internes			
1. Poste de sécurité microbiologique	Oui ¹	Oui ¹	Oui, type III ou autre moyen équivalent
2. Vêtements de protection	Oui	Vêtements de protection adaptés et surbottes	Change complet avant et après la sortie du laboratoire
3. Aménagements pour le rangement des vêtements de protection dans le laboratoire ou dans l'unité	Oui	Oui	Oui
4. Douche pour la décontamination des travailleurs	Non	Optionnel	Oui
5. Lavage des mains : lavabos dont les robinets peuvent être manœuvrés sans utiliser les mains	Oui ²	Oui	Oui

1. Ou autres moyens appropriés, protégeant, en tout état de cause, le travailleur contre la diffusion d'aérosols produits en quantité significative.

2. Pour les nouvelles installations.

Tableau 4B ■ Aménagements internes (suite).

Mesures de confinement	Niveaux de confinement		
	2	3	4
6. Résistance des surfaces à l'eau, nettoyage aisé sans endroits inaccessibles au nettoyage	Oui (sols)	Oui (sols, murs et plafonds)	Oui (murs, plafonds et sols, résistants aux agents chimiques de nettoyage)
7. Surfaces des paillasse imperméables à l'eau, résistantes aux acides, alcalis, solvants et désinfectants	Oui	Oui	Oui
8. Lutte efficace contre les vecteurs, par exemple rongeurs et insectes	Oui	Oui	Oui
9. Présence d'un autoclave	Oui, facilement accessible et, si possible, dans le bâtiment	Oui, dans le laboratoire, la double entrée, ou à proximité immédiate ¹	Oui, dans le laboratoire, la double entrée
10. Présence dans le laboratoire d'un équipement de base spécifique (matériel marqué)	Non	Oui	Oui

1. Avec des procédures appropriées évaluées, permettant le transfert vers un autoclave extérieur au laboratoire, conférant la même protection et contrôlées dans leur déroulement.

Tableau 5 ■ Pratiques opératoires.

Mesures de confinement	Niveaux de confinement		
	2	3	4
c) pratiques opératoires			
1. Stockage des agents biologiques en lieu sûr	oui	Oui	Oui, accès protégé
2. Manipulation des matières infectées et de tout animal contaminé dans un système approprié de confinement ¹	Optionnel	Oui	Oui
3. Utilisation de contenants spécifiques pour aiguilles contaminées, objets piquants ou tranchants souillés	Oui	Oui	Oui
4. Minimisation de la formation d'aérosols	Oui	Oui	Oui
5. Contrôle de la dissémination des aérosols formés	Minimiser	Empêcher	Empêcher
6. Gants	Optionnel	Oui	Oui
7. Inactivation du matériel contaminé et des déchets	Oui	Oui	Oui
8. Sortie du laboratoire après décontamination des équipements susceptibles d'être contaminés (centrifugeuses, PSM...)	Oui	Oui	Oui
9. Inactivation des effluents des éviers et des douches	Non	Oui	Oui

1. Lorsque des animaux de laboratoire sont délibérément contaminés par un ou plusieurs agents pathogènes, ils doivent être manipulés ou hébergés dans des locaux répondant aux conditions et niveaux de confinement requis du fait de la classification du ou des agents pathogènes utilisés.

1.1.2. Annexe II de cet arrêté

L'annexe II de cet arrêté présente les mesures et les définitions des niveaux de confinement minimum à mettre en œuvre dans les établissements industriels ou agricoles où sont utilisés des agents biologiques pathogènes des groupes 2, 3 ou 4. Ils ne sont pas rapportés ici (*cf.* arrêté).

1.1.3. Directive 2000/54/CE du 18 septembre 2000

Des indications concernant les mesures et les niveaux de confinement figurent également dans l'annexe V de la directive 2000/54/CE du 18 septembre 2000 (JOCE L 262 du 17 octobre 2000) qui remplace et codifie la directive 90/679/CEE du Conseil du 26 novembre 1990 précitée.

Elles sont destinées notamment aux laboratoires entreprenant des travaux qui impliquent la manipulation des agents biologiques des groupes 2, 3 ou 4 à des fins de recherche, de développement, d'enseignement ou de diagnostic, afin de réduire au minimum le risque d'infection ; elles sont présentées dans les tableaux 6A et 6B.

Les mesures contenues dans ce tableau doivent être appliquées selon la nature des activités, l'évaluation des risques pour le travailleur et la nature de l'agent biologique concerné.

Tableau 6A ■ Mesures et niveaux de confinement.

A – Mesures de confinement	B – Niveaux de confinement		
	2	3	4
1. Le lieu de travail doit être séparé de toute autre activité dans le même bâtiment	Non	Recommandé	Oui
2. Filtrage de l'air du lieu de travail à l'admission et à l'évacuation au moyen de filtres absolus (HEPA)	Non	Oui, à l'évacuation	Oui, à l'admission et à l'évacuation
3. Restriction de l'accès aux seuls travailleurs désignés	Recommandé	Oui	Oui, par un sas
4. Possibilité de fermer hermétiquement le lieu de travail pour permettre la désinfection	Non	Recommandé	Oui
5. Spécification des procédés de désinfection	Oui	Oui	Oui
6. La pression dans le lieu de travail doit rester inférieure à la pression atmosphérique	Non	Recommandé	Oui
7. Lutte efficace contre les rongeurs et les insectes	Recommandé	Oui	Oui

Tableau 6B ■ Mesures et niveaux de confinement (suite).

A – Mesures de confinement	B – Niveaux de confinement		
	2	3	4
8. Imperméabilité des surfaces à l'eau : nettoyage aisé	Oui, pour la paille	Oui, pour la paille et le sol	Oui, pour la paille, les murs et le plafond
9. Résistance des surfaces aux acides, aux alcalis, aux solvants et aux désinfectants	Recommandé	Oui	Oui
10. Stockage des agents biologiques en lieu sûr	Oui	Oui	Oui, stockage à l'accès protégé
11. Existence d'une fenêtre d'observation ou d'un système permettant de voir les occupants	Recommandé	Recommandé	Oui
12. Équipement complet de chaque laboratoire	Non	Recommandé	Oui
13. Manipulation des matières infectées, de tout animal, dans une enceinte isolante ou un autre moyen approprié de confinement	Le cas échéant	Oui, en cas d'infection par l'air	Oui
14. Présence d'un incinérateur pour l'élimination des carcasses d'animaux			

1.2. Laboratoires d'analyses microbiologiques des aliments et des eaux

Les laboratoires d'analyses microbiologiques alimentaires sont régis par la **norme NF ISO 7218** (1996), intitulée « Microbiologie des aliments. Règles pour les examens microbiologiques » (47 pages).

Cette norme présente les locaux, les matériels et équipements, le personnel, la préparation du matériel, la préparation et la stérilisation des milieux de culture et des réactifs, les échantillons pour laboratoire et les techniques d'examen et d'expression des résultats.

Elle a fait l'objet d'un amendement I constituant la **norme ISO 7218/A1 (2001)** et modifiant la partie « Expression des résultats » de la norme précitée. Elle présente le comptage des colonies, les modes de calcul à mettre en œuvre « dans le cadre des normes de méthodes d'analyses microbiologiques de référence et de routine », applicables aux examens microbiologiques des aliments destinés à l'alimentation humaine ou animale.

Cette norme sert de référence au programme n° 59 intitulé « Analyses microbiologiques des produits agroalimentaires » du Comité français d'accréditation (Cofrac) au niveau des exigences techniques spécifiques (*cf. infra*, paragraphe 2.2.). Des exigences complémentaires concernant les locaux sont formulées par Cofrac.

Les laboratoires d'analyses biologiques et microbiologiques des eaux sont soumis au programme n° 100-2 du Cofrac intitulé « Analyses biologiques et microbiologiques des eaux » (*cf. infra*, paragraphe 2.). Des règles générales et spécifiques sont énoncées dont certaines pour les locaux (*cf. infra*, paragraphe 1.4.).

1.3. Laboratoires d'analyses de biologie médicale

Ces laboratoires sont soumis notamment à l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale (JO du 11 décembre 1999). Des éléments de ce texte seront extraits dans le cadre du présent ouvrage.

Dans l'annexe A du présent décret, les locaux sont présentés comme suit :

« Le décret n° 76-1004 du 4 novembre 1976 précise les règles générales de configuration des locaux de laboratoires d'analyses de biologie. Tout laboratoire doit au moins comprendre : un local de réception, un bureau de secrétariat et d'archives, une salle de prélèvements permettant l'isolement des patients, trois salles affectées aux activités techniques du laboratoire, une laverie. La superficie minimale de l'ensemble des locaux, circulations comprises, ne peut être inférieure à 100 m², dont 40 m² au moins sont occupés par les deux salles affectées aux activités techniques. D'autres précisions sont apportées en la matière dans ce guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale ».

L'installation du laboratoire est également évoqué dans « l'annexe générale, paragraphe II. – Règles de fonctionnement, 2. Installation » de cet arrêté :

« Les dimensions, la construction et la localisation du laboratoire doivent être conformes à la réglementation en vigueur.

L'aménagement du laboratoire doit permettre d'isoler les activités susceptibles d'entraîner une contamination de l'opérateur et/ou de l'analyse et éviter une pollution tant à l'intérieur qu'à l'extérieur.

Il doit exister des zones de stockage à différentes températures pour les matières premières, les réactifs et les produits fongibles. Elles doivent être différentes des zones de conservation des échantillons biologiques. Les zones de stockage des matières premières et/ou des réactifs toxiques ou potentiellement dangereux ou contaminants doivent être séparées. »

1.4. « Le principe de la marche en avant »

1.4.1. Réglementation

Le paragraphe 1 de la norme NF ISO 7218 traite des locaux dans lesquels est implanté le laboratoire d'essais en microbiologie des aliments. Il est précisé que « les locaux doivent être implantés de façon à éviter les risques de contamination croisée » et que « l'application du principe de la "marche en avant" peut aider à l'obtention d'un tel résultat ».

Pour les locaux d'essais, la notion de salles indépendantes (réception et stockage des échantillons, préparation des échantillons et de réalisation des analyses...) est imposée par le programme n° 59 du Cofrac. De surcroît, « la disposition des locaux doit être de nature à éviter toute contamination croisée et faire l'objet d'une gestion spatio-temporelle prouvée des flux ».

Pour les locaux des laboratoires d'analyses biologiques et microbiologiques des eaux, le Cofrac définit dans le programme n° 100-2 des règles dont celle-ci : « Les activités contaminantes (laverie, broyage de matériaux solides, autopsies...) doivent

être séparées des activités propres pour limiter les risques de contamination. Les analyses microbiologiques des eaux ne doivent, en aucun cas, être réalisées dans le même local que les analyses biomédicales et de santé animale ».

Pour les laboratoires d'analyses de biologie médicale, quelques éléments importants sur l'installation du laboratoire figurent dans l'arrêté du 26 novembre 1999 (cf. *supra*, paragraphe 1.3.).

1.4.2. Principe

Il ressort de cette réglementation « le principe de la marche en avant ».

Le laboratoire est composé de plusieurs salles de travail qui ont chacune une activité déterminée et unique ; elles sont réparties de telle manière qu'elles correspondent à une chaîne d'analyse comprenant en général :

- une salle de réception et de stockage des échantillons ;
- une salle de préparation du matériel, des milieux de culture et de leur stérilisation ;
- une salle de préparation des échantillons à analyser (broyage, dilutions...) ;
- une salle d'ensemencement des échantillons contenant des micro-organismes qui peuvent être pathogènes ;
- une salle de décontamination du matériel utilisé ;
- une salle de lavage et de stockage des déchets.

En appliquant ce principe, la circulation du matériel « sale » et des déchets ne doit jamais croiser la circulation du matériel « propre ».

Deux exemples sont maintenant proposés avec des commentaires pour illustrer et compléter la présentation du « principe de la marche en avant ».

1.4.2.1. Premier exemple

Le plan d'un laboratoire de microbiologie d'une société industrielle privée, installé suivant « le principe de la marche en avant », accrédité Cofrac est présenté sur la figure 1 (avec l'aimable autorisation de cette société).

► Commentaire du plan

Ce laboratoire de microbiologie comporte sept salles distinctes :

- le « sas personnel » d'entrée et de sortie du personnel travaillant dans le laboratoire ;
- le « sas échantillons » : les échantillons destinés à l'analyse sont stockés dans ce petit local ;
- la salle de « préparation » : les milieux de culture et les réactifs servant aux essais sont préparés et stockés ;
- la salle « *Bacteria* » : les essais (analyses) utilisant des souches bactériennes sont obligatoirement réalisés dans cette salle ;
- la salle « *Fungi* » : les essais (analyses) faisant intervenir des souches de champignons (levures et moisissures) sont impérativement réalisés dans cette salle ;

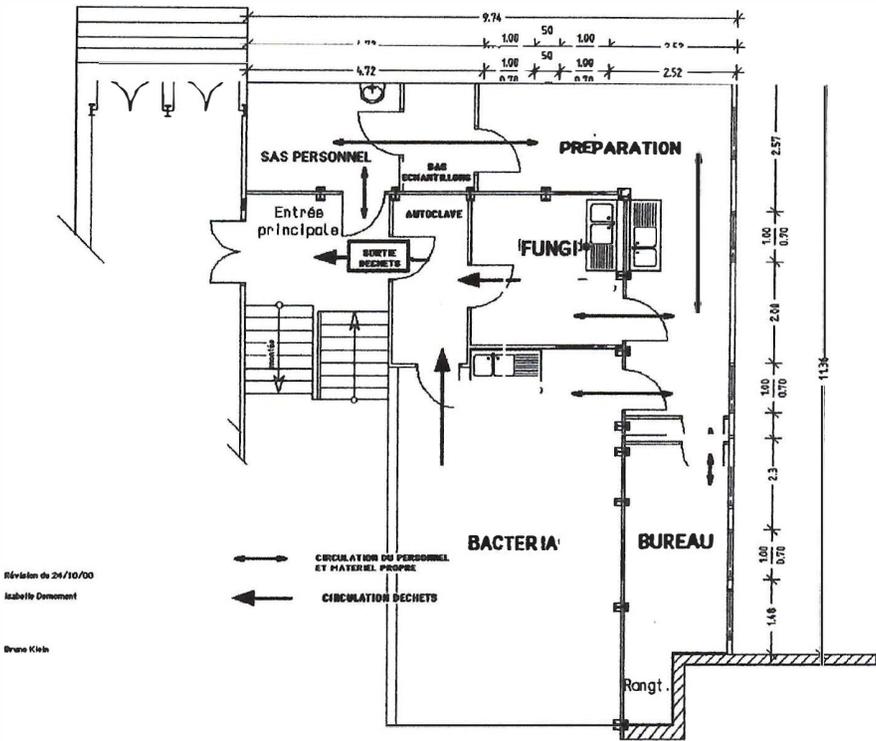


Figure 1 ■ Plan d'un laboratoire de microbiologie installé selon le « principe de la marche en avant ».

– la salle « déchets » : les déchets provenant directement des deux salles d'essais sont autoclavés, stockés puis ils sont récupérés et traités par une société spécialisée certifiée ISO 14001.

– le « bureau » : les documents relatifs à l'assurance qualité sont conservés dans cette pièce.

De surcroît, une étude initiale de l'aérobiocontamination de ce laboratoire et du taux de contamination des surfaces (paillasse, balances, étuves bactériologiques, microscope...) a permis de déterminer huit « points critiques » dans les locaux de ce laboratoire. Des contrôles de la qualité microbiologique de ces points critiques sont réalisés une fois par mois.

Grâce à ce contrôle, un plan du laboratoire avec ses points critiques est affiché dans le laboratoire ; un système de codage avec des pastilles de couleur collées sur les zones critiques permet d'informer le personnel de l'entretien du laboratoire du niveau d'hygiène du laboratoire : conforme, niveau d'alerte, niveau de refus. Ce contrôle de qualité interne figure notamment dans le programme n° 100-2 du Cofrac (cf. *infra*, paragraphe 2).

Des techniques de contrôle de la qualité microbiologique des surfaces sont présentées dans la première partie, chapitre 4, « Méthodes de travail en microbiologie », paragraphe 5.

1.4.2.2. Deuxième exemple

La visite d'un laboratoire d'hygiène départemental, réalisant des analyses microbiologiques et chimiques d'eaux et d'aliments, a été effectuée.

Ce laboratoire est agréé par le ministère de l'Écologie et du Développement durable, pour l'année en cours, pour réaliser certains types d'analyses des eaux ou des sédiments et il est accrédité Cofrac pour certains programmes de microbiologie (n° 59 et n° 100-2) et de chimie (n° 100.1 et n° 156).

Cette visite permet d'apporter aux étudiants en microbiologie quelques informations sur le fonctionnement général des laboratoires d'analyses microbiologiques conçus selon le « principe de la marche en avant ». Pour le matériel du laboratoire de microbiologie proprement dit, se reporter à la première partie, chapitre 2 « Matériel principal du laboratoire de microbiologie ».

- Seul le hall de réception du laboratoire est ouvert au public. L'accès aux bureaux et au laboratoire proprement dit est réservé au personnel et se fait à l'aide d'un digicode.

Le visiteur doit signer un bordereau à son arrivée (date, heure d'arrivée et de départ, nom et prénom, motif de la visite). Il est ensuite pris en charge par le responsable pour entrer dans les locaux. Il devra revêtir une blouse blanche « visiteur », imperméable, en polyéthylène et il doit être obligatoirement accompagné pour visiter le laboratoire lui-même.

- Les laboratoires de chimie et de microbiologie sont complètement indépendants. Le laboratoire de microbiologie est divisé en deux secteurs séparés, l'un pour l'analyse des eaux et l'autre pour l'analyse des aliments, mais avec des locaux communs : le « sas personnel », le « sas échantillons », la salle de préparation des milieux de culture et la chambre froide attenante, la salle des étuves.

- Dans le « sas personnel », le personnel du laboratoire dispose d'une armoire de rangement (un compartiment par personne) où il dépose son vêtement de ville et prend sa blouse ; il se lave les mains dans un lavabo dont le robinet est à commande non manuelle (cellule infrarouge, par exemple).

- Le « sas échantillons » est constitué d'une petite pièce à double porte. La porte donnant accès au sas et la porte donnant accès au laboratoire sont en vis-à-vis, et ne peuvent être ouvertes simultanément ; lorsque la première porte est ouverte pour le dépôt des échantillons, la deuxième porte est bloquée et inversement.

- La salle de préparation des milieux de culture est couplée à une chambre froide pour la conservation des milieux de culture préparés ou achetés prêt à l'emploi pour la microbiologie alimentaire et des eaux.

- La salle des étuves bactériologiques est commune aux deux types d'analyses, mais les étuves « eaux » et « aliments » sont distinctes.

La présence d'étuves réfrigérées permet de disposer :

- d'une étuve pouvant fonctionner à 22° C pour la recherche des micro-organismes totaux, des moisissures... ;

- d'une étuve permettant de conserver des cultures bactériennes au-delà d'un délai d'incubation impératif (24 heures à 37° C, par exemple), en les réfrigérant