

TP MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOCHIMIE (60 PERIODES)

OBJECTIFS :

Ce laboratoire a pour objectifs de pratiquer les connaissances de base en microbiologie, hygiène, immunologie et biochimie, acquise lors de l'enseignement. Il s'agit de comprendre, d'une part, les problèmes d'hygiène à résoudre, et d'autre part, les appareils et les principales techniques mises en œuvre dans le cadre des laboratoires d'analyses médicales.

Il s'agit d'apporter une information complémentaire qui doit permettre au technicien supérieur de maintenance biomédicale d'appliquer les connaissances théoriques des principaux types de manipulations qui doivent être réalisées avec les équipements dont il doit assurer la maintenance. Une attention particulière sera portée à l'étude de l'appareillage et de sa maintenance.

Ce laboratoire comporte deux parties. La première sera donnée dans notre établissement alors que la deuxième sera pratiquée lors d'un stage dans un laboratoire médical.

CONTENU :

TP 1 LES MICROBES : UTILISATION DU MICROSCOPE, LES BACTERIES (MORPHOLOGIE)

OBJECTIF :

- Identifier les risques biologiques et assurer de bonnes conditions d'hygiène ;
- Expliquer le principe de fonctionnement du microscope, identifier ses différents constituants, expliquer leur fonction et préciser leur mode d'utilisation ;
- Régler l'éclairage et réaliser correctement la mise au point ;
- Observer les bactéries, reconnaître les similitudes et identifier les différences morphologiques ;
- Mettre en œuvre la technique d'utilisation du microscope en bactériologie (avec et sans immersion) : réglage de l'éclairage, de la mise au point, mesure des objets, entretien... ;
- Procéder à l'observation de bactéries diverses (Gram) ;
- Effectuer le compte rendu.

MATERIEL :

- Microscopes (objectifs x 10 ou 20, x 40 ou 60 et x 100) ;
- Huile à immersion ;
- Nécessaire d'entretien du microscope ;
- Micromètre objectif ;
- Préparations microscopiques bactériennes variées (colorations de Gram) ;

TP2 LES MICROBES : LES CHAMPIGNONS

OBJECTIFS :

- Mettre en œuvre la technique d'utilisation du microscope en bactériologie (avec et sans immersion) : réglage de l'éclairage, de la mise au point, mesure des objets, entretien....
- Apprendre la technique de coloration au bleu de méthylène et du lutage ;
- Procéder à l'observation de champignons divers (« bleu » et état frais) ;
- Effectuer le compte rendu.

MATERIEL :

- Microscopes (objectifs x 10 ou 20, x 40 ou 60) ;
- Eau distillée ;
- Solution de bleu de méthylène,
- Lames et lamelles ;
- Coton ;
- Fer à luter et paraffine ;
- Nécessaire d'entretien du microscope ;
- Micromètre objectif ;
- Lames champignons microscopiques et levures variés hyphes et spores état frais et colorations au bleu de méthylène).

TP 3

BACTERIES ET CHAMPIGNONS DANS L'ENVIRONNEMENT HOMME

OBJECTIFS :

- Procéder à l'observation de champignons et de bactéries dans les divers milieux et documents ;
- Effectuer le compte rendu.

MATERIEL :

- Microscopes (objectifs x 10 ou 20, x 40 ou 60 ; x 100 mm.)
- Eau distillée et tubes ou petits cristallisoirs ou bêchers ;
- Solution de bleu de méthylène;
- Lames et lamelles;
- Coton ;
- Nécessaire d'entretien du microscope;
- Eau polluée, échantillon de terre de jardin, croûtes de fromages, tartre dentaire;
- Préparation microscopiques du commerce de produits pathologiques, fixées et colorées;
- Diapositives d'observations microscopiques.

TP 4

L'ASEPSIE

OBJECTIFS :

- Procéder à la stérilisation des matériels selon la technique adaptée : chaleur sèche, autoclave, filtration ;
- Faire les tests et contrôles de stérilisation ;
- Réaliser le compte rendu.

MATERIEL :

- Verrerie de laboratoire (tubes à essais, pipettes Pasteur ; baguettes de verre,
- Milieux de culture (géloses en tubes ; bouillons, boîtes de Pétri, ...),
- Témoins de stérilisation,
- Sérum ou sang en ampoule,
- Autoclave,
- Armoire de stérilisation sèche (poupinel),
- Etuve de bactériologie,
- Appareil de filtration « Millipore »,
- Eau de Javel, alcool.

TP 5

LA CULTURE DES BACTERIES : LE POSTE DE TRAVAIL ; PREPARATION DES INSTRUMENTS DE TRAVAIL

OBJECTIFS :

- Installation du poste de travail,

- Préparation des instruments d'ensemencement,
- Stérilisation des instruments d'ensemencement et à son contrôle,
- Addition de substance stérile à un bouillon de culture (glucose, sérum,) et au contrôle de stérilité.
- Rédaction du compte rendu.

MATERIEL :

- Bec Bunsen ou bec brûleur électrique, baguettes stériles et pipettes Pasteur,
- Fer à luter et ensemenceurs métalliques (fil et anse),
- Ampoule contenant les réactifs stériles,
- Récipient à eau de Javel, boîte métallique pour objets souillés à stériliser,
- Milieux de culture (gélules en tubes, bouillons,)
- Boîtes de Pétri,
- Glucose stérile (ou autre sucre) stérile en ampoule,
- Sérum ou sang en ampoule,
- Autoclave,
- Armoire de stérilisation sèche et de séchage,
- Etuve de bactériologie.

TP 6**LA CULTURE DES BACTERIES ET L'ISOLEMENT****OBJECTIFS :**

- Observation microscopique de la culture en bouillon ;
- Ensemencement de bactéries, d'une culture en bouillon dans une culture en bouillon, d'une culture en bouillon sur une gélose ;
- Incubation des cultures ;
- Elaboration du compte rendu.

MATERIEL :

- Milieux préparés lors de la séance précédente et dont la stérilité a été contrôlée ;
- Cultures de bactéries non pathogènes en bouillon (Bacillus subtilis et Escherichia coli) ;
- Tubes d'eau physiologique ou de Ringer, stériles (pour les dilutions) ;
- Poste de travail équipé ;
- Equipements du laboratoire de microbiologie (étuve, autoclave, ...).

TP 7**EXAMENS MICROSCOPIQUES ET MICROSCOPIQUES, CULTURE BACTERIENNES****OBJECTIFS :**

- Observation microscopique de la culture en bouillon, état frais, coloration de Gram ;
- Ensemencement de bactéries : une colonie dans une culture en bouillon, une colonie sur une gélose ;
- Incubation des cultures ;
- Elaboration du compte rendu.

MATERIEL :

- Milieux préparés lors de la séance précédente et dont la stérilité a été contrôlée ;
- Cultures de bactéries non pathogènes en bouillon (Bacillus subtilis et Escherichia coli) ;
- Tubes d'eau physiologique ou de Ringer, stériles (pour les dilutions) ;
- Gélules stériles en tubes (20 ml) et 2 boîtes de Pétri ;
- Poste de travail équipé ;
- Microscope (objectif à immersion) ;
- Equipements du laboratoire de microbiologie (étuve, autoclave,...).

TP 8**ISOLEMENT BACTERIEN SUR GELOSE ET EXAMENS MACROSCOPIQUES ET MICROSCOPIQUES****OBJECTIFS :**

- Observation microscopique des bactéries cultivées : état frais, coloration de Gram ;
- Isolement de chacune des souches bactériennes par épuisement de semence sur : 3 géloses inclinées en tubes, 1 gélose coulée en boîte de Pétri ;
- Incubation des cultures ;
- Elaboration du compte rendu.

MATERIEL :

- Culturesensemencées lors de la séance précédente (*Bacillus subtilis* et *Escherichia coli*) ;
- Tubes d'eau physiologique ou de Ringer, stériles (pour les dilutions) ;
- Poste de travail équipé ;
- Microscope (objectif à immersion) ;
- Equipements du laboratoire de microbiologie (étuve, autoclave, ...) ;
- Tubes de solution de Ringer stérile pour dilutions bactériennes ;
- Géloses inclinées pour isolement ;
- 2 géloses et 2 boîtes de Pétri pour isolement par méthode des quadrants.

TP 9**PURIFICATION D'UN ISOLEMENT BACTERIEN ; OBSERVATIONS MACROSCOPIQUES ET MICROSCOPIQUES ET ENSEMENCEMENT D'UNE GALERIE D'IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE.****OBJECTIFS :**

- Observation macroscopique et microscopique des isollements bactériens : état frais, coloration de Gram ;
- Purification de chacune des souches bactériennes par épuisement de semence sur 3 géloses inclinées en tubes ;
- Ensemencement d'une galerie d'identification ;
- Incubation des cultures ;
- Elaboration du compte rendu.

MATERIEL :

- Culturesensemencées lors de la séance précédente (*Bacillus subtilis* et *Escherichia coli*) ;
- Tubes d'eau physiologique ou de Ringer, stériles (pour les dilutions) ;
- Poste de travail équipé ;
- Microscope (objectif à immersion) ;
- Equipements du laboratoire de microbiologie (étuve, autoclave, ...) ;
- Tubes de solution de Ringer stérile pour dilutions bactériennes ;
- Géloses inclinées pour isolement ;
- 2 galeries d'identification (1 pour entérobactéries, 1 pour *Bacillus*).

TP 10**CARACTERES BIOCHIMIQUES D'IDENTIFICATION DES BACTERIES, NUMERATION BACTERIENNE****OBJECTIF :**

- Observation macroscopique et microscopique des isollements bactériens de purification état frais, coloration de Gram,
- Lecture de la galerie d'identification et tests complémentaires,

- Réalisation d'une suspension bactérienne et au comptage des bactéries par numération en cellule de numération filtration de dilution et comptage des colonies retenues sur le filtre,
- Incubation des cultures,
- Elaboration du compte rendu.

MATERIEL :

- Cultures ensemencées lors de la séance précédente (*Bacillus subtilis* et *Escherichia coli*) ;
- Tubes d'eau physiologique ou de Ringer, stériles (pour les dilutions) ;
- Poste de travail équipé avec microscope (objectif à immersion) ;
- Equipements du laboratoire de microbiologie (étuve, autoclave, ...)
- Pipettes graduées stériles pour dilutions bactériennes (1 ml et 10 ml) ;
- Produits pour tests de lecture des galeries, bain-marie ;
- Cellule de numération bactérienne ;
- 12 géloses nutritives BCP ou EMB (25 ml) pour boîtes de Pétri et 12 boîtes de Pétri ;
- Nécessaire de filtration et filtres.

TP 11**NUMERATION BACTERIENNE****OBJECTIF :**

- Observation macroscopique et microscopique des isolements bactériens de purification : état frais, coloration de Gram ;
- Comptage sur les filtres mis en incubation ;
- Elaboration du compte rendu.

MATERIEL :

- Cultures ensemencées lors de la séance précédente filtre de la dilution réalisée (*Bacillus subtilis* et *Escherichia coli*) ;
- Poste de travail équipé ;
- Microscope (objectif à immersion) ;
- Equipements du laboratoire de microbiologie (étuve, autoclave, ...).

TP 12**IMMUNOLOGIE SPECIFIQUE SELON OUCHTERLONG****OBJECTIF :**

- Travailler dans des conditions satisfaisantes de sécurité biologique ;
- Expliquer le principe de la réaction antigène-anticorps selon la technique d'immunoprécipitation d'Ouchterlony et de mise en évidence par diffusion en milieu gélifié ;
- Mettre en œuvre la technique : réaliser la réaction et incubation ;
- Ecrire un compte rendu.

MATERIEL :

- Kit antisérum humain, albumine canine, globulines totales, gammaglobulines humaines, sérum humain, NaCl, Na₂HPO₄, azide de sodium, agar-agar, boîte de Pétri stériles, filtres, emporte-pièce ;
- Micropipettes de 25 µl ;
- Bec bunsen ;
- Agitateur magnétique ;
- Verrerie classique ; eau distillée.

TP 13

IMMUNOLOGIE SPECIFIQUE SELON OUCHTERLONG

OBJECTIF :

- Expliquer le principe et la technique de réalisation de la réaction et de sa révélation ;
- Mettre en œuvre la technique immunoenzymatique en phase solide du test de grossesse ;
- Observer le rôle des lymphocytes dans le processus immunitaire
- Etudier le déroulement de la réponse immunitaire et de considérer les phénomènes de rejet, irradiation et greffes de moelle osseuse dans le traitement des leucémies.
- Elaborer le compte rendu.

MATERIEL :

- Kit de tests de grossesse analogique à cartes réactives, conjugué enzymatique lyophilisé, substrat, flacons échantillon + et -,
- Vidéo«l'immunologie» (Pr REVILLARD),
- Vidéo«l'immunologie» (EDELMANN),
- Magnétoscope.

TP 14

IMMUNITYE SPECIFIQUE : IMMUNO-HEMATOLOGIE (HEMAGGLUTINATION)

OBJECTIF :

- Travailler dans de bonnes conditions de sécurité ;
- Expliquer le principe et la technique de recherche ;
- Mettre en ouvre une technique d'hémagglutination ;
- Observer et analyser le résultat ;
- Etablir le compte rendu.

TP 15

BIOCHIMIE : PURIFICATION DE L'EAU : EAU DISTILLEE, EAU PERMUTEE (DESIONISEE), CONTROLE DE L'EAU PURIRIEE

OBJECTIF :

- Comparer le fonctionnement de ces deux appareils ;
- Comparer la qualité de l'eau non traitée et celle des produits obtenus ;
- Comparer les problèmes posés par la maintenance de ces deux appareils,
- Elaborer le compte rendu.

MATERIEL :

- Distillateur,
- Déminéralisateur,
- Conductimètre,
- Ensemble d'analyse de l'eau,
- verrerie adaptée.

TP 16

BIOCHIMIE : DIALYSE

OBJECTIF :

- Procéder à l'étude de la dialyse de diverses molécules et d'analyser l'influence de la taille des molécules et de facteurs physiques (température, pH),

- Elaborer le compte rendu.

MATERIEL :

- Tube à dialyse,
- Cristallisoirs de 300 ml,
- Eau distillée,
- Pipettes,
- NaCl, CaCl₂, Sulfate d'alumine, Rouge neutre, Nitrate d'argent, Oxalate d'ammonium, chlorure de baryum,
- Agitateurs magnétiques,
- Bandelettes tests,
- pH mètre,
- Thermomètre.

TP 17
CENTRIFUGATION

OBJECTIF :

- Procéder à l'étude des caractéristiques et fonctionnement de l'appareil ;
- Procéder à la centrifugation de diverses suspensions ;
- Etudier les problèmes que pose la maintenance ;
- Etablir le compte rendu.

MATERIEL :

- centrifugeuse de laboratoire à vitesse réglable, indicateur de vitesse ;
- tubes à centrifuger fond rond et fond conique ;
- balance ;
- broyeur ;
- verrerie courante de laboratoire ;
- végétaux ;
- eau distillée.

TP 18
SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION,
DETERMINATION D'UN COEFFICIENT D'ABSORBANCE
ET D'UNE CONCENTRATION

OBJECTIFS :

- Etudier le principe de fonctionnement de l'appareil ;
- Etudier la variation d'absorbance en fonction de la longueur d'onde ;
- Vérifier la loi de Beer-Lambert ;
- Déterminer le coefficient d'absorption moléculaire d'une substance ;
- Rédiger un compte rendu.

MATERIEL :

- Spectrophotomètre a sortie RS 232 ;
- Cuves pour mesures spectrophotométriques ;
- Support à cuves ;
- Logiciel adapté ;
- Solutions de colorants (bleu de méthylène) ;
- Tubes et portoirs ;
- Eau distillée et pipettes.

TP 19**SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION,
ETUDE D'UNE CINETIQUE ENZYMATIQUE, METHODE "2 POINTS"****OBJECTIFS :**

- Identifier les caractéristiques techniques de l'appareil,
- Mettre en œuvre une technique de dosage d'une activité enzymatique par méthode en 2 points,
- Identifier les problèmes de maintenance,
- Rédiger le compte rendu.

MATERIEL :

- Spectrophotomètre a sortie RS 232 ;
- Cuves pour mesures spectrophotométriques ;
- Support à cuves ;
- Logiciel adapté;
- Fiche technique : principe et protocole ;
- Verrerie et réactifs;
- Eau distillée et pipettes.

TP 20**SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION,
DETERMINATION D'UNE ACTIVITE ENZYMATIQUE PAR METHODE CINETIQUE****OBJECTIFS :**

- Exposer le principe de fonctionnement de l'appareil,
- Identifier et d'expliquer ses caractéristiques,
- Mettre en œuvre une technique de dosage d'activité enzymatique par méthode cinétique,
- Identifier les problèmes de maintenance,
- Rédiger le compte rendu.

MATERIEL :

- Spectrophotomètre à sortie RS 232,
- Cuves pour mesures spectrophotométriques,
- Support à cuves,
- Logiciel adapté,
- Fiche technique principe et protocole,
- Verrerie et réactifs,
- Tubes et portoirs,
- Eau distillée et pipettes.

TP 21**FLUOROMETRIE****OBJECTIFS :**

- Procéder à l'étude du fonctionnement de l'appareil et à l'identification de ses caractéristiques techniques ;
- Mettre en œuvre une technique de dosage ;
- Considérer les problèmes posés par les solvants, la contamination, l'analyse en solution diluée ;
- Rédiger le compte rendu.

MATERIEL :

- Fluorimètre a sortie RS 232 ;
- Cuves pour mesures en fluorimétrie ;

- Support à cuves ;
- Logiciel adapté ;
- Fiche technique : principe et protocole ;
- Verrerie et réactifs ;
- Tubes et portoirs ;
- Eau distillée et pipettes.

TP 22

RESINES ECHANGEUSES D'IONS ET CHROMATOGRAPHIE

OBJECTIFS :

- Présenter le principe de fonctionnement de l'appareillage ;
- Identifier et expliciter les caractéristiques techniques des résines et de l'appareillage ;
- Mettre en œuvre une chromatographie sur colonne : anionique et canonique ;
- Identifier les problèmes de maintenance ;
- Rédiger le compte rendu.

MATERIEL :

- Colonnes de chromatographie en phase liquide ;
- Résine Amberlite canonique forte ;
- Résine Amberlite anionique ;
- Fiche technique : principe et protocole ;
- Solutés ;
- Solvants ;
- Eau distillée, verrerie, pipettes.

TP 23

CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE CCM

OBJECTIFS :

- Procéder à l'analyse chromatographique de solutions de glucides et de protéides ;
- Observer et analyser les résultats ;
- Identifier les problèmes de maintenance ;
- Rédiger le compte rendu.

MATERIEL :

- Cuves à chromatographie,
- Papier pour chromatographie sur papier,
- Couches minces prêtes à l'emploi (silice et cellulose),
- Solvants et révélateurs,
- Solutions de glucides, d'acides aminés,
- Micropipette à volume variable et cônes,
- Pincettes,
- Révélateurs pour glucides et pour acides aminés,
- Séchoir.