



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Projet de Fin d'études

Licence Sciences & Techniques
Sciences Biologiques Appliquées et Santé
(LST - SBAS)

**Les Techniques d'analyses médicales au
laboratoire d'analyse de biologie médicale EL
KARAOUYINE**

Présenté par : Salma Lakhsassi

Encadré par : Pr Kaouakib El Abida

Dr Abdelilah Fassi Fihri

Soutenu le : 08/06/17

Devant le jury composé de :

- **Pr EL Abida K.**
- **Pr Ouhmidou B.**
- **Dr Fassi Fihri A.**

Année universitaire : 2016/2017

Dédicaces

A mes chers parents :

Aucun mot ne pourrait exprimer ma gratitude pour toutes les choses que vous avez faites pour moi, que ce soit vos sacrifices, vos prières, vos conseils, et spécialement votre soutien tout au long de mes études.

J'espère que ce travail sera à la hauteur de vos attentes et une source de fierté pour vous.

A mes frères et sœurs :

Vous m'avez aidé pendant toutes les années de mes études, par vos expériences, vos encouragements et le plus important vos critiques. Aucun mot ne serait suffisant pour exprimer mon grand amour et respect pour vous.

A mes amis et proches :

Le travail collectif, les compétitions, les défis qu'on a passés ensemble et surtout les succès étaient une source de motivation pour moi. Je vous dédie ce modeste travail et je vous souhaite la prospérité et la réussite.

A Mme Btissam Sebti, technicienne au laboratoire, qui n'a jamais cessé de m'orienter pendant mon stage.

A toutes les personnes qui ont participé à la réalisation de ce travail.

Remerciement

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu qui m'a donné la force, la patience et le courage de réaliser ce travail.

Mes sincères remerciements au Docteur ABDLILAH FASSI FIHRI pour son aide précieuse qu'il m'avait réservés pendant le stage et qui m'a permis chaque jour d'apprendre d'avantage, d'élargir mes connaissances et d'acquérir ainsi une expérience qui me sera utile dans ma vie professionnelle.

En second lieu, je tiens à remercier professeur KAOUAKIB EL ABIDA, d'avoir prit en charge l'encadrement de mon stage, pour ses conseils précieux, pour sa patience, sa disponibilité, pour l'aide, et l'encouragement qu'elle m'a apporté durant toute la période du travail et surtout sa confiance en mes compétences.

J'aimerais exprimer mes remerciements à tous les techniciens du laboratoire : HOUDA, SIMOHAMMED, WIDAD, qui m'ont beaucoup appris au cours de ce stage et qui m'ont bien soutenu.

Je remercie également, le jury composé de : Pr EL Abida K. et Pr Ouhmidou B, d'avoir consacré de son temps précieux afin de mener à bien ce travail.

Enfin, je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin, à la réalisation de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette merveilleuse année.

Présentation de la structure d'accueil

Le laboratoire d'analyse de biologie médicale El karaouyne est situé sur l'avenue Khalid Ibn Walid, en face de la mosquée Mohammadi Bouramana à Fès. C'est un lieu où est prélevé et analysé divers fluides biologiques d'origine humaine et parfois animale sous la responsabilité du Dr Biologiste Abdelilah Fassi Fihri.

Le laboratoire sur deux étages, contient un secrétariat, trois salles de prélèvement, trois salles d'attente et un espace technique divisé en trois postes :

- ✓ Poste d'hématologie et sérologie ;
- ✓ Postes de Biochimie ;
- ✓ Poste de bactériologie.

Les différentes analyses effectuées dans ces postes sont assurées par une équipe du laboratoire composée de huit techniciens de laboratoire, sous la surveillance d'un docteur biologiste.

L'objectif du stage

L'objectif du stage est de se familiariser avec les méthodes utilisées actuellement dans les laboratoires d'analyse et l'intérêt clinique des paramètres dosés, ainsi que de maîtriser les équipements et les installations utilisées. En plus de permettre d'avoir un aperçu sur le monde socioprofessionnel, de s'initier à la rigueur de la vie active et de mettre en pratique les connaissances acquises durant mon cursus.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : l'ABX pentra XL 80

Figure 2 : l'appareil Sysmex KX-21

Figure 3 : l'appareil ESR 3000

Figure 4 : exemple de résultat

Figure 5 : l'appareil STA Satellite

Figure 6 : l'appareil BIO-RAD D-10

Figure 7 : l'appareil cobas e 411

Figure 8 : l'appareil mini vidas

Figure 9 : l'appareil Alegria

Figure 10 : l'appareil ISE6000

Figure 11 : exemple des résultats qui sort de l'automate ISE 6000

Figure 12 : l'appareil cobas integra 400 plus

Figure 13 : l'appareil Konelab 30

Figure 14 : l'appareil Vitek 2 compact 15

Figure 15 : les milieux de culture du prélèvement vaginal.

Liste des tableaux

Tableau 1: Les différents anticoagulants et tubes utilisés

Tableau 2: les résultats du test Simonin-Michon

Tableau 3 : Exemples des tests effectués par cobas e 411 et mini Vidas au laboratoire :

Tableau 4 : exemple des analyses effectuées par l'automate Alegria

Tableau 5 : exemple des analyses effectuées par l'automate cobas integra 400 plus

Tableau 6 : liste des analyses de bactériologie les plus fréquentes effectuées au sein de laboratoire

Liste des abréviations

ASLO Antistreptolysines O

HDL High Density Lipoprotein

LDL Low Density Lipoprotein

CRP Protéine C réactif

CLED Cystéine lactose électrolyte déficient

EMB Eosine Bleu de Méthylène

BK Bacille de Koch

ECBU Examen Cytobactériologique des Urines

LCR Liquide céphalo rachidien

PV Prélèvement vaginal

TCMH Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine

CCMH Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine

VGM Volume globulaire moyen

TP Taux De Prothrombine

TCA Temps De Céphaline Activée

VS Vitesse De Sédimentation

NFS Numération Formulaire Sanguin

GRS Groupage sanguin

HBG Hémoglobine Glyquée

EDTA Éthylène Diamine Tétra acétique

FSH Hormone folliculostimulante

LH Hormone lutéinisante

TSH Hormone thyroestimulante

SOMMAIRE

Dédicace

Remerciement

Présentation de la structure d'accueil

L'objectif du stage

Introduction

- I. Les différentes phases analytiques.....Page 11**
 - 1. La phase pré-analytique
 - 2. La phase analytique
 - 3. La phase post analytique
- II. Les analyses hématologiques.....Page 13**
 - 1. La numération formule sanguine
 - 2. La vitesse de sédimentation
 - 3. L'hémostase
 - 4. L'hémoglobine glyquée
 - 5. L'immuno hématologie
- III. Les analyses de sérologie/hormonologie.....Page 19**
 - 1. Le principe et le mode opératoire de l'automate cobas e 411
 - 2. Le principe de l'automate mini vidas
 - 3. Le principe de l'automate Alegria
- IV. Les analyses biochimiques.....Page 23**
 - 1. Le principe de l'automate ISE 6000
 - 2. Le principe de l'appareil cobas integra 400 plus
 - 3. Le principe de Konelab 30
- V. Les analyses microbiologiques.....Page 26**
 - 1. L'examen cyto bactériologique des urines
 - 2. L'examen cyto bactériologique des sécrétions vaginales
 - 3. L'examen cyto bactériologique du crachat

Conclusion

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Introduction

Actuellement, l'analyse médicale est un outil incontournable de prévention, diagnostique, pronostique, suivi et dépistage de différentes maladies humaines.

Avec les avancées scientifiques et les progrès technologiques en matière d'analyses médicales, les techniques manuelles sont largement devancées par l'automatisation, qui permet un meilleur rendement. Ceci, par le traitement d'une grande série d'analyses pendant un court temps, et surtout des résultats plus fiables visant à apporter des informations utiles au diagnostic, à la prévention, au traitement des maladies ou à l'évaluation de l'état de santé.

Le laboratoire El Karaouyine est composé de plusieurs unités à savoir :

- ✓ **L'hématologie** étudie la physiologie et la pathologie du sang ;
- ✓ **La sérologie** est une méthode biologique utilisant le sérum pour établir des diagnostics médicaux ;
- ✓ **La biochimie** renvoie à l'étude de la structure et de la composition de la matière vivante ainsi qu'à celle des réactions chimiques qui ont lieu dans l'organisme ;
- ✓ **La Bactériologie** étudie les bactéries et leurs propriétés.

Ces unités utilisent des matériaux spécifiques d'appareillage, parmi ces matériaux on trouve des tubes jetables avec des bouchons de différentes couleurs.

I. LES DIFFERENTES PHASES ANALYTIQUES :

Les examens de biologie médicale se déroulent en trois phases :

1. La phase pré-analytique :

Cette phase englobe toute la partie qui précède l'analyse. La grande partie de cette phase se déroule dans le laboratoire EL KARAOUYINE au niveau de la salle de prélèvement et d'accueil. Elle concerne : le prélèvement, l'étiquetage et le transport d'échantillon. La dernière étape de cette phase, c'est-à-dire la préparation d'échantillon pour l'analyse, se fait au niveau des salles techniques.

1.1 Accueil et prélèvement

- ✓ La secrétaire accueille le patient, lui crée un dossier complet contenant toutes ses informations personnelles (Le nom et le prénom du patient, âge, sexe). Après quoi, elle inscrit les examens en fonction de l'ordonnance du médecin. Enfin, elle complète le dossier par une étiquette contenant la référence, le code, le jour et l'année.
- ✓ L'infirmière prend les dossiers des patients et les appelle à tour de rôle pour effectuer les prélèvements. Elle valide les informations de chaque personne et choisit le type de tube qui convient.

Le choix des tubes de prélèvements s'effectue selon l'examen demandé. Il existe deux types : soit avec ou sans anticoagulant.

- ✓ Tube avec anticoagulant : pour garder le sang à l'état fluide lors d'un prélèvement on utilise un « anticoagulant », son rôle est de bloquer une ou toutes les réactions qui transforment le fibrinogène en fibrine. Donc, il existe différents types d'anticoagulants dans différents tubes pour différentes analyses (Héparine de lithium, Citrate de sodium, EDTA, fluorure de sodium). (Voir Tableau 1).
- ✓ Tube sans anticoagulant : pour obtenir le sérum on utilise des tubes secs (sans anticoagulant) pour coagulation naturelle (pendant trente minutes). (Voir Tableau 1).

Remarque : le volume à prélever de sang est de 2ml à 5ml.

Tableau 1: Les différents anticoagulants et tubes utilisés

	Les tubes	Les anticoagulants	Les analyses effectuées
Avec anticoagulant	Le bleu	Citrate de sodium	Coagulation (TP /TCA), GRS
	Le violet	EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique	Hématologie: (NFS, HBG)
	Le noir	Citrate de sodium	VS
	Le gris	Fluorure de sodium	Dosage de glycémie
	Le vert	L'héparine de lithium	Analyse sur sérum : (biochimie)
Sans anticoagulant	Le rouge	Sec	Analyse sur sérum: (sérologie)

Les infirmières assurent l'acheminement des tubes aux salles des analyses pour la phase analytique.

1.2 La préparation d'échantillon pour l'analyse

Ce sont les techniciens qui se chargent de la préparation des échantillons par :

- ✓ Le contrôle des automates et la mise en marche des appareils et vérification des réactifs ;
- ✓ La répartition des tubes dans les différentes paillasse selon les analyses demandées ;
- ✓ La Centrifugation des tubes pour travailler sur sérum ou plasma en respectant le temps (2min) et la vitesse (4000 rotations/min) pour préserver au mieux l'échantillon dans les conditions souhaitées.

2. La phase analytique

Cette phase représente le processus technique permettant l'obtention d'un résultat d'analyse biologique. C'est le moment où les techniciens analysent les paramètres biologiques d'un échantillon biologique selon les unités cités auparavant.

3. La phase post-analytique

Cette phase concerne tous les événements qui peuvent se produire après l'analyse, elle est réalisée par le biologiste et les secrétaires, puisque:

- ✓ Le biologiste contrôle et interprète les résultats ;
- ✓ La délivrance des résultats aux patients est assurée par les secrétaires.

II. LES ANALYSES HEMATOLOGIQUES

Les examens hématologiques de base habituellement demandés au laboratoire hématologique sont :

1. La numération formule sanguine :

La numération formule sanguine ou hémogramme est un examen essentiel qui apporte des renseignements sur les cellules sanguines et sur les processus de défense immunitaire. Cet examen comprend le comptage de toutes les cellules ou éléments figurés du sang (les hématies, les leucocytes et les plaquettes) et certains paramètres liés à ces éléments sont mesurés tel que le taux d'hémoglobine, le volume globulaire moyen « VGM », l'hématocrite, la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine « CCMH » et la teneur globulaire moyenne en hémoglobine « TGMH ».

Les différents éléments étudiés en NFS :

NUMERATION			Normales Adultes
LEUCOCYTES.....		6700 /mm ³	(4000 à 10000)
HEMATIES.....	(*)	3,34 M/mm ³	(4,0 à 5,3)
HEMOGLOBINE.....	(*)	11,60 g/dL	(12 à 16)
HEMATOCRITE.....	(*)	33,70 %	(37 à 46)
VGM.....	(*)	98,00 μ ³	(80 à 95)
TCMH.....		32,00 Pg	(27 à 32)
CCMH.....		34,00 g/dL	(32 à 36)
PLAQUETTES.....	(*)	142 10 ³ /mm ³	(150 à 500)

FORMULE LEUCOCYTAIRE			
	en %	par mm ³	
POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES.....	62	4154	(1600 à 7500)
POLYNUCLEAIRES EOSINOPHILES.....	2	134	(40 à 400)
POLYNUCLEAIRES BASOPHILES.....	0	0	(0 à 100)
LYMPHOCYTES.....	27	1809	(800 à 4500)
MONOCYTES.....	9	603	(80 à 800)

1.1 Principe et mode opératoire de l'automate ABX pentra XL 80 (figure 1):

Les différents paramètres de la NFS sont calculés par l'automate de la NFS (ABX pentra XL 80).

Le principe c'est la Cytochimie : impédance (mesure du volume réel de la cellule) et optique (analyse de la structure interne de la cellule par mesure de l'absorption lumineuse).



Figure 1 : l'ABX pentra XL 80

Le mode opératoire se déroule comme suit :

- ✓ Mettre les tubes de sang dans le portoir noir ;
- ✓ Homogénéiser les tubes de sang ;
- ✓ Mettre sur le tapis roulant ;
- ✓ Appuyer sur la touche qui contient une image de trois tubes présente sur l'écran d'ordinateur ;
- ✓ A la fin du cycle d'analyse les résultats sont affichés sur l'écran d'ordinateur ;
- ✓ L'appareil est prêt pour effectuer une autre analyse.

On peut avoir des valeurs anormales au dessous ou au-dessus des valeurs de références:

- On parle d'anémie devant un taux d'hémoglobine abaissé.
- On parle de polyglobulie devant une augmentation de taux des hématies.
- On parle d'hyperleucocytose devant un taux des leucocytes augmenté.
- On parle de leucopénie devant une diminution de taux des leucocytes.
- On parle de thrombocytes devant un taux augmenté des plaquettes.
- On parle de thrombopénie devant un taux des plaquettes diminuées.

1.2 Principe et mode opératoire de l'automate Sysmex KX 21 :

C'est un appareil (figure 2) qui sert pour contrôler les résultats anormaux de la NFS qui sort de l'ABX pentra XL 80.



Figure 2 : l'appareil Sysmex KX-21

Le principe est la fluorescence en cytométrie de flux qui est une technique permettant de faire défiler des particules, molécules ou cellules à grande vitesse dans le faisceau d'un laser, en les comptant et en les caractérisant. C'est la lumière réémise par fluorescence qui permet de classer la population suivant plusieurs critères et de les trier.

Le mode opératoire se déroule comme suit :

- ✓ Homogénéiser le tube de sang ;
- ✓ Cliquer sur simple no puis entrer la référence puis cliquer sur entrer ;
- ✓ Enlever le bouchon du tube et le mettre sous l'électrode et cliquer à côté ;
- ✓ Les résultats sortent dans une feuille ;
- ✓ L'appareil est prêt pour effectuer une autre analyse.

Cet appareil peut détecter :

- ✓ Une anisocytose (les hématies de même taille que les plaquettes) ;
- ✓ Une leucémie lymphoïde chronique (augmentation de lymphocyte, absence de neutrophile) ;
- ✓ Une leucémie myéloïde chronique (absence de différenciation de leucocyte, les hématies de grandes tailles) ;

- ✓ Une anémie par carence martiale (les hématies de petites tailles) ;
- ✓ Une maladie hépatique (les plaquettes de grandes tailles).

2. La vitesse de sédimentation

La vitesse de sédimentation (VS) peut être définie comme étant la vitesse avec laquelle chutent les hématies en suspension dans un plasma à l'intérieur d'un tube maintenu verticalement. La vitesse de sédimentation est déterminée après 45min, c'est le principal marqueur le moins coûteux de la réaction inflammatoire.

2.1. Principe et mode opératoire de l'automate ESR 3000 :

La vitesse de sédimentation est calculée par l'automate ESR 3000 (figure 3).



Figure 3 : l'appareil ESR 3000

Le principe est la photométrie par infrarouge. Il mesure les grandeurs lumineuses en fonction de la courbe de sensibilité de l'œil. Il dispose d'un capteur CCD qui est un composant électronique photosensible servant à convertir un rayonnement électromagnétique (infrarouge) en courant électrique mesurable de la lumière reçue.

Le mode opératoire se déroule comme suit :

- ✓ Homogénéiser le tube de sang ;
- ✓ Mettez le dans l'appareil ;
- ✓ Le résultat sort après 45min.

Le résultat est exprimé en millimètre (mm), ce qui correspond à la distance parcourue par les globules rouges après une heure et après deux heures (figure 4).

Result: 39 mm/1h
Result: 76 mm/2h

3. L'hémostase

Les tests explorant la coagulation appliqués dans ce laboratoire se font à l'aide de l'automate (STA Satellite) sont :

3.1. Temps de QUICK ou taux de prothrombine (TP)

Le temps de quick mesure le temps de recalcification d'un plasma citraté en présence d'un excès de thromboplastine tissulaire, cela permet d'explorer les facteurs de coagulation de la voie extrinsèque. Ce test consiste donc à comparer en présence de thromboplastine, le temps de coagulation d'un plasma pauvre en plaquettes par rapport à un plasma témoin normal traité dans les mêmes conditions.

3.2. Temps de céphaline activée (TCA OU TCK)

Le temps de céphaline activée mesure le temps de recalcification d'un plasma citraté pauvre en plaquettes en présence de céphaline. C'est une méthode globale d'exploration de la voie intrinsèque de la coagulation.

3.3. Principe et mode opératoire de l'automate STA Satellite:

L'hémostase est donnée par l'automate STA Satellite (figure 5).



Figure 5 : l'appareil STA Satellite

Le principe est un automate de laboratoire destiné à l'exploration de l'hémostase. Il permet de réaliser des tests de chronométrie (mesure d'un temps de coagulation).

Le mode opératoire se déroule comme suit :

- ✓ Cliquer sur F1 et entrer le tube à la place donnée ;
- ✓ Cliquer sur F10 puis « ESC ».

4. L'hémoglobine glyquée :

L'hémoglobine est une protéine qui se trouve à l'intérieur des globules rouges. Elle a pour fonction de transporter l'oxygène vers les cellules; elle est responsable de la couleur rouge du sang. Quand les taux d'hémoglobine baissent dans le sang l'anémie s'installe.

Le dosage de pourcentage d'hémoglobine glyquée se fait à l'aide d'automate BIO RAD D10 (figure 6).



Figure 6 : l'appareil BIO-RAD D-10

Le principe est la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) qui est une technique de séparation analytique et/ou préparatrice de molécules présentes dans un mélange. Cela permet d'adapter les méthodes chromatographiques usuelles sur un montage haut pression. Les échantillons de sang total subissent un processus de dilution automatique et sont ensuite introduits dans le parcours d'écoulement analytique. Un gradient de tampon programmé de force ionique croissante délivre l'échantillon à la cartouche analytique où les hémoglobines sont séparées en fonction de leurs interactions ioniques avec le matériau de la cartouche et passent ensuite à travers la cellule d'écoulement du photomètre où les variations de l'absorbance sont mesurées.

5. L'immuno-hématologie

Parmi les tests immuno-hématologiques que le laboratoire hématologique fait :

5.1. Le groupage sanguin

Le Groupage (GRS) se base sur la technique de Simonin-Michon (Ag connu et Ac inconnu), qui consiste à mettre en évidence les anticorps du système ABO contenus dans le plasma du patient à l'aide de globules rouges de groupe ABO connu.

Le mode opératoire se déroule comme suit :

- ✓ Déposer sur une plaque une goutte de chacun des 4 sérums :anti A (bleu), anti B (jaune), anti AB (blanc), anti D (blanc) en les espaçant et en faisant attention de bien les repérer ;
- ✓ Déposer dans chacune de ces gouttes une goutte de sang à déterminer ;
- ✓ mélanger les gouttes, à l'aide de la tête de la seringue qu'on jette après chaque utilisation ;
- ✓ déplacer délicatement la plaque ;
- ✓ La réaction apparait une minute après l'agitation.

L'interprétation des résultats du système ABO est résumée dans le tableau 2.

	Anti A	Anti B	Anti AB	Anti D
Groupe A ⁺	Agglutination		agglutination	Agglutination
Groupe A ⁻	Agglutination		agglutination	
Groupe B ⁺		Agglutination	agglutination	Agglutination
Groupe B ⁻		Agglutination	agglutination	
Groupe AB ⁺	Agglutination	Agglutination	agglutination	Agglutination
Groupe AB ⁻	Agglutination	Agglutination	agglutination	
Groupe O ⁺				Agglutination
Groupe O ⁻				

Tableau 2: les résultats du test Simonin-Michon

III. Analyses de Sérologie/Hormonologie :

Ces analyses sont réalisées par deux automates multiparamétriques « cobas e 411 » et « mini vidas » qui peuvent assurer tous les tests sérologiques et hormonaux.

1. Le principe et le mode opératoire de l'automate cobas e 411 (figure 7):

Le principe est un analyseur automatisé d'accès direct multi-cellule destiné aux analyses immunologique. Il est conçu à la fois pour les dosages in vitro quantitatifs et qualitatifs d'un grand nombre d'analyses par utilisation de la technologie d'électro chimiluminescence qui nécessite la présence d'un substrat qui émet la lumière après exposition au déclencheur présent sur l'anticorps secondaire. La lumière émise sert à impressionner un film photographique ou des caméras qui restituent une image numérique du transfert de western. L'image est analysée par densitométrie qui évalue le taux relatif de marquage de la protéine et quantifie les résultats en termes de densité optique.



Figure 7 : l'appareil cobas e 411

Le mode opératoire se déroule comme suit :

- ✓ Entrer la position du tube ;
- ✓ Entrer la référence ;
- ✓ Sélectionner les analyses demandées ;
- ✓ Cliquer sur sauvegarder puis sur Start.

Tableau 3 : Exemples des tests effectués par cobas e 411 et mini Vidas au laboratoire :

Vitamine D2+D3 (VITD2+D3)	Testostérone (Testo)	Rubéole (Rubb)
Cortisol (corti)	Beta HCG (BHCG)	Virus d'Immunodéficience humaine (HIV)
Thyréostimuline (TSH)	Prolactine (Prol)	Hépatite B (AgHBS)
La tri-iodothyronine (T3)	Antigène spécifique de la prostate(PSA)	Hépatite C (AcVHC)
La thyroxine (T4)	Cancer antigène 125 (CA-125)	Toxoplasmose (Toxo)
Parathormone (PTH)	Cancer antigène 19-9 (CA-19-9)	Helicobacter pylori (HPTR)
L'hormone lutéinisante plasmatique (LH)	Cancer antigène 15-3 (CA 15-3)	Les Immunoglobulines E (IGE)
Hormone folliculostimulante (FSH)	Antigène carcino-embryonnaire (ACE)	La troponine (tropi)
Estradiol (E2)	L'alpha-foeto-protéine(AFP)	Ferritine (ferr1)

2. Le principe de l'automate mini vidas (figure 8):

C'est un automate d'immunoanalyse compact qui applique les techniques ELISA et l'automatisation dans un système de dosage fluorescent lié aux enzymes ELFA (enzyme linked fluorescent assay). Cet appareil peut effectuer les mêmes analyses réalisés par « cobas e 411 », c'est la technique qui diffère.



Figure 8 : l'appareil mini vidas

3. Principe de l'automate Alegria (figure 9) :

L'automate Alegria est un automate complet permettant la détection des autoanticorps avec un degré de flexibilité, donc le diagnostic des maladies auto-immunes en utilisant la technique d'ELISA (enzyme linked immuno-sorbent assay) : méthode qualitative qui repose sur l'utilisation d'une enzyme pour déceler les complexes immuns. Le principe de cette méthode est de fixer spécifiquement la substance à doser sur un support, de sorte que cette dernière puisse être identifiée par un Ac spécifique couplé à une enzyme. L'activité des enzymes fixés sera alors mesurable. cet appareil permet d'effectuer les analyses suivantes :



Figure 9 : l'appareil Alegria

Tableau 4 : exemple des analyses effectuées par l'automate Alegria

Les anticorps anti-transglutaminase IgG (ACATRANSG)	Les anticorps anti-thyroglobulines(ACATG)
Les anticorps anti endomysium IgG(ACAENDOMG)	Les anticorps anti-ADN bicaténaire (ACAADN)
Les anticorps anti-thyroperoxydase (ACATPO)	Les anticorps anti neutrophiles cytoplasmiques(ACAN)

IV. Les Analyses Biochimiques

1. Le principe de l'automate ISE 6000 (figure 10):

Le Dosage des électrolytes (Na^+ , K^+ , Cl^-) est réalisé à partir du plasma ou sérum grâce à un automate « ISE 6000 » par des électrodes spécifiques.



Figure 10 : l'appareil ISE6000

Le principe est un Analyseur d'électrolytes entièrement automatisés permettant d'effectuer des mesures précises et fiables des ions dans le sang (réalise des ionogrammes).en utilisant la technologie ISE elle peut mesurer: Sodium, Potassium, Chlorure, Calcium, phosphore par la méthode potentiométrique et les Bicarbonates (TCO_2) par la méthode manométrique. Les paramètres mesurés par cet appareil sont illustrés dans la figure 11.

K	4.27	mmol/L	3.5-5.5
Na	132.8	mmol/L	135-145

Figure 11 : exemple des résultats qui sortent de l'automate ISE 6000

2. Le principe de l'appareil cobas integra 400 plus (figure 12) :

L'intégration de quatre principes de mesure :

- ✓ Photométrie d'absorption ;
- ✓ Turbidimétrie ;
- ✓ Polarimétrie de fluorescence ;
- ✓ Potentiométrie directe et indirecte pour des enzymes, des substrats, des protéines spécifiques, des drogues, des médicaments et des électrolytes.



Figure 12 : l'appareil cobas integra 400 plus

Les paramètres mesurés par cet appareil sont illustrés dans le tableau ci-dessous :

Calcium(CAL)	Lipase(LIPA)	Protéine réactive(CRP)	Acide urique (AU)
Chlorure(CHL)	Phosphatase alcaline(PAL)	Protéine(PROT)	Bilirubine totale(BILIT)
Magnésium plasmatique(MgPL)	Transaminase glutamo-oxaloacétique(GOT)	Cholestérol totale(CHOT)	Bilirubine conjuguée directe(BILIC)
Phosphore(PHO)	Transaminase glutamo-pyruvique(GPT)	High density lipoprotéine(HDL)	Clairance de la créatinine(CC)
Créatine kinase(CK)	Albumine(ALB)	Light density lipoprotéine(LDL)	Urée(URE)
Gamma-glutamyl transpeptidase(GGT)	Micro-albumine(MIALB)	Triglycéride(TRI)	Glycémie(GLY)
hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO-100)	Réserve alcaline(RA)	Fer sérique(FS)	Antistreptolysine O(ASLO)

Tableau 5 : exemple des analyses effectuées par l'automate cobas integra 400 plus

3. Le principe de l'automate Konelab 30 (figure 13) :

Mesure photométrique, colorimétrique, turbidimétrique et potentiométrique (pour : Na⁺, K⁺, Cl⁻, Li⁺, Ca²⁺ et Ph). Sert pour le contrôle des analyses effectuées par cobas integra 400 plus.



Figure 13 : l'appareil Konelab 30

V. LES ANALYSES MICROBIOLOGIQUES :

Parmi les différents tests microbiologiques réalisés dans laboratoire EL KARAOUYINE :

1. L'examen cyto bactériologique des urines (ECBU) :

L'urine est un liquide jaune clair, transparent sécrété par les reins et éliminé par les voies urinaires. L'urine est normalement stérile mais souillée physiologiquement lors de son émission par les germes présents dans la flore cutané - muqueuse et génito - urinaire.

➤ Principe

L'examen cyto bactériologique des urines (E.C.B.U) permet de déterminer s'il y a infection urinaire, et si oui d'identifier la bactérie responsable et d'évaluer l'importance de l'inflammation.

Une cytologie qui consiste à étudier au microscope les différents types de cellules retrouvées dans l'urine : hématies, leucocytes, cristaux et cellules épithéliales, levures.

Une bactériologie qui consiste à rechercher, identifier et compter les germes présents dans l'urine après sa mise en culture dans les milieux et leur incubation à 37°C pendant 24h dans l'étuve. Si un germe est trouvé, un antibiogramme peut alors être réalisé pour guider le médecin dans sa prescription d'antibiotique.

➤ Prélèvement

Il doit être fait avec beaucoup de soin car il conditionne la qualité de l'analyse et de son résultat. Habituellement. Les urines sont recueillies de préférence le matin ou après avoir séjourné au moins 3 heures dans la vessie. Après une toilette intime, le premier jet de la miction est éliminé, puis le patient recueille ses urines dans un flacon stérile.

➤ Diagnostic bactériologique

L'examen macroscopique :

- ✓ On note l'aspect des urines : clair, trouble, hématurique... ;
- ✓ On note la couleur : jaune, blanc, orange ... ;

- ✓ On note la présence de culot.

L'examen microscopique :

- ✓ On note la présence des cellules épithéliales, leucocytes, hématies, levures, cristaux.

NB : La mise en évidence de levure se fait par coloration au bleu de méthylène

a. Coloration de Gram

Le principe de la coloration de Gram est la méthode de coloration la plus utilisée en bactériologie médicale. Elle permet de colorer les bactéries et de les distinguer à l'examen direct par leur aptitude à fixer le violet de gentiane (Gram +) ou la fuschine (Gram -). L'intérêt de cette coloration est de donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu tant sur le type que sur la forme.

La méthode de coloration se décrit comme suit :

- ✓ Sur une lame propre, étaler l'écouvillon et laisser sécher à l'air ;
- ✓ Recouvrir la lame par l'alcool 95, laisser agir trois minutes ;
- ✓ Recouvrir la lame par la solution violette, laisser agir cinq minutes puis laver avec l'eau de robinet ;
- ✓ Rincer et recouvrir la lame avec le lugol pour enlever le colorant, laisser agir de 30 à 60 minutes puis laver à l'eau de robinet ;
- ✓ Recouvrir la lame avec Differ, puis laver à l'eau de robinet ;
- ✓ Recouvrir la lame avec la fuschine et laisser agir 1 minute ;
- ✓ Rincer et sécher la lame puis observer au microscope à l'objectif $\times 100$ en ajoutant quelques gouttes d'huile à immersion ;
- ✓ Noter la présence, la morphologie et le gram des bactéries.

Remarques importantes :

- ✓ Le violet de gentiane se fixe sur les composants cytoplasmiques de toutes les bactéries. Le lugol permet de fixer cette coloration interne.
- ✓ L'alcool sert à décolorer le cytoplasme des bactéries qui seront dites (Gram +) la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool car trop épaisse. Elles resteront alors violettes.
- ✓ La fuschine a pour but de redonner aux bactéries (Gram-) précédemment décolorées, une teinte rose permettant de les visualiser au microscope. Les bactéries à (Gram+) restées violettes seront évidemment insensibles à cette coloration.
- ✓ La coloration de gramme permet de classer les bactéries en deux groupes :
 - Gram+ : Ont une paroi épaisse qui se colore en violet.
 - Gram- : Ont une paroi plus fine qui se colore en rose.

La culture se fait par immersion totale du milieu CLED et sabouraud, le reste est vidé, par ensemencement dans le gélose de Chapman au mannitol, Gélose EMB, Gélose au sang, avec une incubation à 37°C pendant 24 heures.

Les résultats sont exprimés comme suit :

- ✓ Pour le milieu CLED :
 - Culture négatif : quand les colonies sont inférieures à 10^3 ;
 - Culture positif : quand les colonies sont supérieures à 10^5 .
- ✓ Pour le milieu sabouraud : La présence de pousse témoigne la présence des levures ;
- ✓ Pour le milieu chapman : La présence de pousse témoigne la présence des staphylocoques ;
- ✓ Pour le milieu EMB : La présence de Escherichia coli (couleur verdâtre), klebsella (comme l'œil de poisson), entérobacter (petits pois blanchâtres), Pseudomonas (odeur forte) ;
- ✓ Pour le milieu gélose au sang : La présence de pousse témoigne la présence des streptocoques D.

b. Antibiogramme

Cette étape est effectuée à l'aide d'un automate Vitek 2 compact 15 (figure 14).

Qui est un système entièrement automatisé qui garantit l'excellence dans l'antibiogramme de routine en utilisant la technologie de colorimétrie avancée : le système lit les cartes de test VITEK de dernière génération toutes les quinze minutes grâce à trois longueurs d'onde différentes. Ces cartes contiennent 64 puits pour assurer une précision absolue.



Figure 14 : l'appareil Vitek 2 compact 15

Le mode opératoire se déroule comme suit :

- ✓ Préparation de deux tubes un pour l'identification, l'autre pour l'antibiogramme ;
- ✓ Mettez 3ml de la solution d'inhalation dans chaque tube ;
- ✓ Ajouter une colonie (prélever à côté du bec benzène) dans le tube d'identification puis mesurer la densité de cette colonie dans le Densic Nex il faut qu'il soit entre 0,50 et 0,70 puis prélever à l'aide d'une micro pipette de gram négatif 20ul et mettez la dans le tube d'antibiogramme ;
- ✓ Ajouter la cassette d'antibiogramme ;
- ✓ Introduire le tube d'antibiogramme dans vitek ;
- ✓ Scanner le code à barres de la cassette au niveau de l'espace « ID cassette » ;
- ✓ Charger la cassette dans la chambre d'incubation (dans un délai maximum de trente minutes) ;
- ✓ Fermer la porte et appuyer sur le bouton « lancer remplissage » ;
- ✓ Retirer la cassette, la placer dans le lecteur-incubateur (dans un délai maximum de 10 minutes) puis renfermer la porte ;
- ✓ A la fin de l'analyse, les résultats de l'automate sont réalisés au bout de 24 heures et fournissent la sensibilité de la bactérie aux différents antibiotiques.

2. Examen cyto bactériologique des sécrétions vaginales (PV)

Les sécrétions vaginales physiologiques proviennent principalement de la desquamation de cellules vaginales superficielles et de la glaire cervicale sécrétée par l'épithélium endocervical.

a. Principe

L'examen cyto bactériologique des sécrétions vaginales permet le dépistage et le diagnostic étiologique d'une infection génitale basse d'origine bactérienne ou parasitaire. Il permet éventuellement l'étude de la sensibilité des germes isolés aux antibiotiques.

b. Prélèvement

Le prélèvement vaginal doit être fait avec beaucoup de soin car il conditionne la qualité de l'analyse. Habituellement doit être fait avant toute antibiothérapie, la patiente devra éviter toute toilette intime, ainsi que tout rapport sexuel le jour précédant l'examen. Le prélèvement est réalisé à l'aide d'un écouvillon qui est inséré dans le vagin pour la confection du frottis.

c. Diagnostic bactériologique

L'examen macroscopique

- ✓ On note l'aspect des sécrétions vaginales : blanchâtre, jaunâtre, hématique ;
- ✓ On note le pH des sécrétions vaginales.

L'examen microscopique à l'état frais :

- ✓ Faire une suspension des sécrétions vaginales dans deux gouttes d'eau physiologique sur une lame et recouvrir par une lamelle ;
- ✓ Examiner au microscope à l'objectif fois quarante ;
- ✓ Noter la présence de trichomonas, des levures et le nombre de leucocytes, d'hématies et de cellules épithéliales par champ microscopique.

d. Coloration de Gram

- ✓ On étale les sécrétions recueillies en roulant soigneusement l'écouvillon sur une lame propre et en appuyant légèrement de façon à obtenir un frottis fin et homogène ;
- ✓ On sèche la lame à l'air et on effectue la coloration de Gram ;
- ✓ On examine la lame colorée au microscope à l'objectif $\times 100$;
- ✓ On note la présence, l'abondance et le type de bactéries présentes dans la flore vaginale.

e. La culture

La culture des sécrétions vaginales se fait dans les milieux suivants : CLED, Sabouraud, EMB, chapman, mac conkey, Gélose au sang.

- ✓ CLED : Est un milieu de croissance de toutes les bactéries ;
- ✓ Sabouraud : Ce milieu est spécifique pour la croissance des levures ;
- ✓ EMB : est un milieu de croissance d'e.coli, entérobacter, Pseudomonas et klebsella ;
- ✓ Chapman : est un milieu de croissance de staphylocoques ;
- ✓ Mac conkey : est un milieu de croissance des bactéries gram négatif ;
- ✓ Gélose au sang : Seules les streptocoques peuvent pousser dans ce milieu ;
- ✓ Onensemence le prélèvement vaginal par striation dans les milieux précédents et on les incube dans l'étuve à 37°C pendant 24h.

NB : On met le milieu gélose au sang dans un sac de plastique fermé (pauvre en O₂) car les bactéries poussant dans ce milieu nécessitent une concentration de CO₂.



Figure 15 : les milieux de culture du prélèvement vaginal.

f. L'identification et antibiogramme

- Après 24h d'incubation, on fait une observation sur les milieux de culture.

e.coli : de couleur verdâtre ou de reflet jaune

Klebsella : comme l'œil de poisson (un cercle noir à l'intérieur d'un cercle blanc)

Entérobacter aérogeunes : des petits pois blanchâtres

Pseudomonas aérogènes : à une odeur forte

- ✓ Pour les colonies apparues dans le milieu EMB, on utilise l'automate VITEK pour réaliser l'antibiogramme ;
- ✓ Pour les colonies apparues dans le milieu gélose au sang, on réalise un antibiogramme manuel dans le milieu gélose au sang ;
- ✓ Pour les colonies apparues dans le milieu chapman (et EMB), on réalise un antibiogramme manuel dans le milieu Mueller Hinton (MH).

g. Antibiogramme manuel :

L'antibiogramme est réalisé sur une gélose de sang (Bactéries anaérobies) ou sur gélose Mueller-Hinton (gélose standard).

Le mode opératoire se déroule comme suit :

- ✓ Prélever des colonies pures d'un milieu de culture ;
- ✓ Mettez-les dans un tube qui contient 1 ml de l'eau distillé ;
- ✓ Écouler la suspension sur la gélose choisie (gélose au sang ou gélose MH) ;
- ✓ Répartir la suspension sur toute la surface ;
- ✓ Laisser sécher quinze minutes dans une température ambiante ;
- ✓ Déposer les disques antibiotiques à l'aide d'une pince stérile ;
- ✓ Les boîtes de Pétri seront placées à l'envers dans l'étuve à 37°C pendant 24h.

3. Examen cytobactériologique du crachat (Bacille de KOCH) :

Cet examen a pour but de rechercher une infection pulmonaire en effectuant un prélèvement de crachat. Particulièrement la recherche des BAAR

a. Prélèvement :

Le matin, au réveil, après rinçage de la bouche par de l'eau minéral le patient effectue un prélèvement d'un échantillon de sécrétions bronchiques profondes, lors d'un effort important de toux.

b. Coloration de Ziehl-Nelson :

La coloration de Ziehl-Nelson est une coloration assez spécifique pour les mycobactéries. Elle repose sur une caractéristique fondamentale des mycobactéries : leur alcool-acido résistance, liée à la présence importante de lipides au niveau de leur paroi.

c. Mode opératoire :

- ✓ Etaler un échantillon du crachat sur deux lames et laisser sécher à l'air ;
- ✓ Déposer les lames fixées sur une barre en position horizontale ;
- ✓ Recouvrir la lame par alcool pour la fixation, puis laisser sécher à l'air ;
- ✓ Recouvrir chaque lame de fuchsine de Ziehl pré filtrée, laisser agir le colorant pendant 10 min ;
- ✓ Chauffer chaque lame individuellement par le dessous (pince portant un morceau de coton imbibé d'alcool et enflammé), jusqu'à émission de vapeurs, puis rincer délicatement à l'eau courante ;
- ✓ Recouvrir la lame avec une solution NaOH, laisser agir 2 minutes, puis rincer délicatement à l'eau courante ;

- ✓ Recouvrir la lame avec une solution d'alcool, laisser agir 5 minutes, puis rincer délicatement à l'eau courante ;
- ✓ Recouvrir la lame de bleu de méthylène. Laisser agir le colorant 15 minutes, puis rincer délicatement à l'eau courante ;
- ✓ Laisser sécher à l'air libre ;
- ✓ Observer la lame au microscope (à l'huile d'immersion, objectif x 100).

d. Résultats d'un BK positif :

Les BAAR typiques apparaissent en rose.

Tableau 6 : liste des analyses de bactériologie les plus fréquentes effectuées au sein de laboratoire

COPRO : La coproculture	Prélèvement de pus
KOP : examen parasitologique des selles	Prélèvement de gorge
Le Prélèvement urétral	Spermoculture
Le prélèvement mycologique des ongles	Spermogramme
Test Post-Coïtal	Le spermocytogramme
LCR : examen du liquide céphalo-rachidien	Le Rotavirus

Conclusion :

La biologie médicale est la branche de la médecine qui vise à effectuer et interpréter des analyses sur des liquides ou prélèvements humains, dans le but de caractériser ou de suivre une maladie. Les différentes analyses médicales, hématologie, microbiologie, biochimie et sérologie permettent des analyses spécifiques et complémentaires.

Je me suis familiarisée au cours de ces six semaines de stage à un environnement technique et un ensemble de méthodes d'analyses médicales, qui sont avérées être très enrichissantes pour mon expérience professionnelle tant sur le plan technique que sur l'aspect humain. J'ai pu réaliser quelques tâches dans le laboratoire telles que la centrifugation des tubes, la préparation des milieux de cultures.

De plus, le fait de travailler sur tous les postes du laboratoire m'a permis d'avoir une vision détaillée et une meilleure compréhension de cette discipline en terme d'organisation, de gestion et de la pratique.

En conclusion, je retire une expérience positive de ce stage et je souhaite vivement de continuer dans cette direction et pouvoir approfondir mes connaissances.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

Guide des examens biologiques, 2^{ème} édition. Par N.KUBAB, I.HAKAWATI, S. ALAIATI KUBAB.
Editions Lamarre 1992.

Manuel de référence de chaque appareil

Sante-medecine.journaldesfemmes.com

www.doctissimo.fr