

REMERCIEMENTS

Pour cette grace qui nous est accordé tout au long de notre formation stagiaire, nous tenons à remercier notre Dieu, souverain créateur et maître de toute chose pour son soutien en nous dotant de force et d'autres capacités pour la passation de cette période.

Nos sincères remerciements à tous les membres coordonnateurs de stage de notre institution pour l'organisation de stage de vacances à la fin de chaque promotion.

Du plus profond de nos cœurs, nous témoignons de notre gratitude en remerciant tous les autorités administratives et personnels de laboratoire de l'INRB et de l'OMECO pour votre hospitalité et encadrement solide. Car c'est par votre assistance que nous avons relevé nos défis.

Ainsi nous sommes très reconnaissant à nos parents, frères et sœurs pour leur soutien financier, moral et spirituel et à tous ceux qui de près ou de loin nous ont soutenu d'une manière ou d'une autre à la réalisation du stage.

INTRODUCTION

Etant donné que la médecine a plusieurs branches sur ce, les techniques de laboratoire en font parties et elles occupent une place importante dans la science biomédicale.

Dans le souci de faire acquérir aux personnels soignant une meilleure formation, l'ISTM-Kin organise de stage de vacances pour tout étudiant à la fin de chaque promotion.

Ces stages ont pour but d'aider l'étudiant de concilier la théorie à la pratique et d'acquérir des aptitudes suivantes :

- ❖ Prelever les échantillons correctement pour diverses analyses courantes demandées par le clinicien ;
- ❖ Conditionner et garder correctement les préparations biologiques ;
- ❖ Identifier les parasites des selles, sang et urines
- ❖ Préparer, conditionner et conserver les réactifs et milieu de culture ;
- ❖ Appliquer les normes de sécurité propre du laboratoire médical ;
- ❖ Réalyser les matériels de laboratoire ;
- ❖ Travailler en équipe ;
- ❖ Accopler les tâches administratives lui confiées ;
- ❖ Interpréter les résultats des analyses effectuées ;
- ❖ Rédiger un rapport de stage ;

Notre rapport de stage se subdivise en trois grandes parties dont :

- ❖ La 1^{ère} partie : parle de la présentation et organisation du lieu de stage ;
- ❖ La 2^{ème} partie : traite sur les techniques réalisées ;
- ❖ La 3^{ème} : parle des activités quotidiennes.

I^{ÈRE} PARTIES : PRESENTATION ET ORGANISATION DU LIEU DE STAGE

I.1. PRESENTATION DE L'ETABLISSEMENT

Notre lieu de sstage était l'INRB (Institut National de Recherche Biomédicale de Kinshasa) laboratoire national de santé publique de la RDC.

I.2. SITUATION GEOGRAPHIQUE

L'institut national de recherche biomédicale est situé dans la commune de la Gombe sur l'avenue de la démocratie (ex. avenu de huilerie) en face du centre des rééducation des handicapés physique en voisin à l'Hôpital Général Provinciale de Référence de Kinshasa (ex. Hôpital Maman Yemo).

I.3. STRUCTURE ORGANISATIONNELLE

Il comprend 3 organes fonctionnels à savoir :

- ❖ La direction ;
- ❖ Le coseil ;
- ❖ Le comité scientifique.

I.4. ORGANISATION DU LABORATOIRE

I.4.1 Plan du laboratoire

L'INRB est doté d'un laboratoire d'analyse biologique accomplisant bel et bien les normes de sécurité de la florissant ainsi les conditions meilleures de travail.

Le laboratoire de l'INRB est équipé des materiels adéquats pour la réalisation des différentes analyses. Il bénéficie de personnels qualifiés pour la recherche. Le laboratoire est subdivisé en différents services.

1.4.2. Personnel de laboratoire

Le laboratoire est constitué des plusieurs personnes dont nous citons, le médecin directeur, les biologistes, les pharmaciens, des techniciens de laboratoire, des laveurs des matériels, des informaticiens.

1.4.3. organisation du service

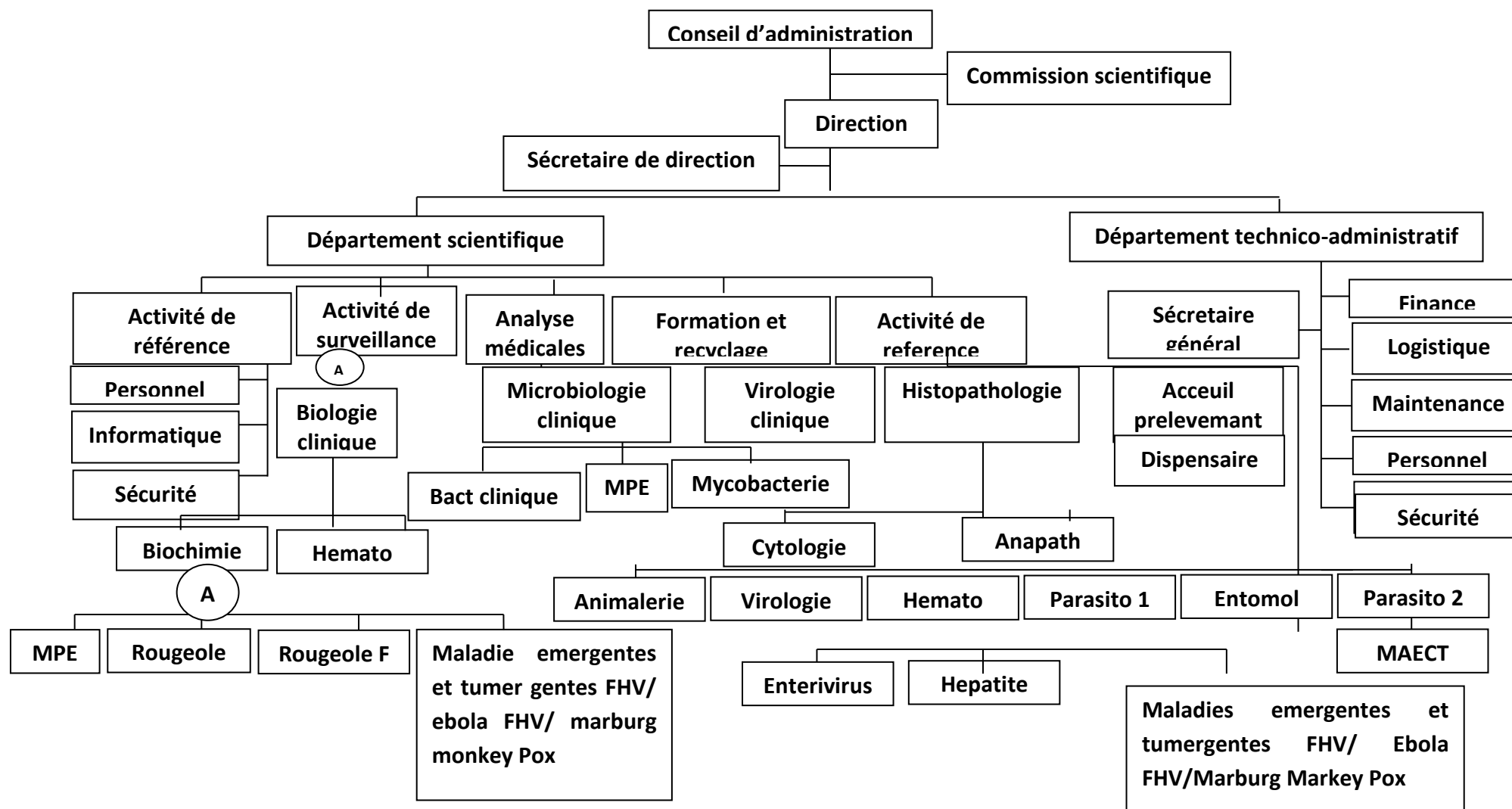
Le service est subdivisé en parties dont chaque partie est aussi subdivisé selon les tâches qui sont les suivants :

- ❖ Le service de prélèvement ;
- ❖ Le service de biologie clinique ;
- ❖ Le service de bacteriologie ;
- ❖ Le service virologie ;
- ❖ Le service de parasitologie ;
- ❖ Le service d'hématologie ;
- ❖ Le service d'anatomo-pathologie ;
- ❖ Le service d'animalerie ;
- ❖ Le service d'immuno-sérologie ;
- ❖ Le service d'entomologie médicale.

1.4.4. Organisation des tâches du prelevement au rendu des resultats

- ❖ Heure du début de travail : le prelevement se fait le matin à partir de 7h30 ;
- ❖ Heure de la fin : se termine à 12h30, le rendu des resultats dépend des analyses demandées et du service.

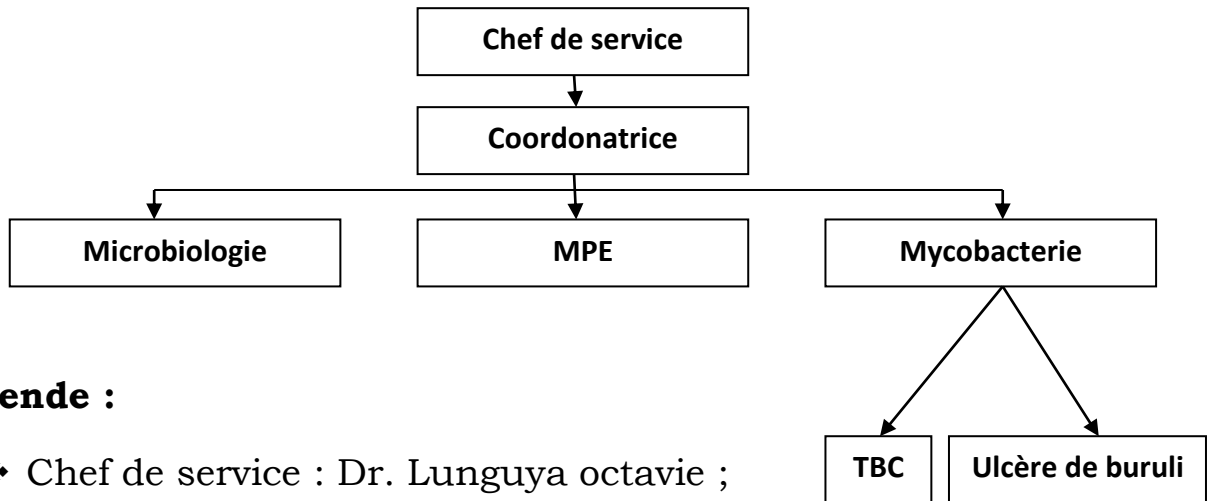
ORGANIGRAMME DE L'INRB ET ORGANISATION ADMINISTRATIVE



II^{ÈME} PARTIE : TECHNIQUES RÉALISÉES

II.1. SERVICE DE BACTERIOLOGIE

II.1.1. Organigramme du service



Legende :

- ❖ Chef de service : Dr. Lunguya octavie ;
- ❖ Coordinatrice : Claudine Mbuse ;
- ❖ Microbiologie clinique.
- Chef d'unité : Dr. Mussoku Zéphyrin
 - ❖ MPE (Maladie à Potentiel Epidemique)
- Chef d'unité : biologiste Berthe Miwanda
 - ❖ Mycobacterie
 - a. Ulcère du Buruli
- Chef d'unité : Dr. Kibali
 - b. Mycobacterie proprement dite
- Chef d'unité : Dr. Kaswa

Quelques mbiologiste,

- ❖ Biologiste Edie Bonebe : hémoculture ;
- ❖ Technicien François Tshibambe : microbiologie clinique ;
- ❖ Technicienne bibiche Mundabi : ulcère et clinique ;
- ❖ Pharmacien Inamba : Blaise blanche ;
- ❖ 2 secrétaire papa paul, papa Mozard ;
- ❖ 2 garçons de laboratoire, 1 garçon de salle.

II.1.2. DATE DU DEBUT ET DE LA FIN

Nous avons commencé notre stage dans ce service du 01/10 au 26/10/2012. Le travail commençait de 8h30 et se terminait à 14h00 mais souvent ce dernier dépendait du nombre d'analyse journalière.

II.1.3. TECHNIQUES

L'analyse d'un échantillon en bactériologie comprend 4 étapes :

- ❖ Examen macroscopique ;
- ❖ Examen microscopique (à frais et après coloration) ;
- ❖ Mise en culture ;
- ❖ Antibiogramme.

I.3.1. uroculture

- Principe

C'est un examen simple fréquemment demandé, il peut être riche de divers renseignements à condition de respecter certaines précautions et d'effectuer un prélèvement correct.

- Prélèvement

Le recueil des urines doit être effectué :

- ❖ Avant tout traitement d'antibiotique ;
- ❖ Sur une urine ayant séjourné plus de 4h dans la vessie ;
- ❖ Après une toilette locale soigneuse, comprenant une désinfection du méat urinaire et de son pourtour ;
- ❖ Après décalotage chez l'homme avec ou sans sondage chez la femme dans ce cas, limiter la contamination vulvo-vaginale en plaçant un tampon intravaginal et en maintenant les grandes lèvres ;
- ❖ Éliminer le 1^{ère} jet, recueillir que celui et se débarrasser du dernier.

- Transport

Le prélèvement est au labo ou apporté le plus rapidement possible. Il peut éventuellement être conservé quelques heures après prélèvement à 4°C ou en ajoutant du borate soudé.

A. Examen macroscopique

Cet examen permet quelque fois une orientation diagnostique. Il comprend l'observation des caractères organoleptiques tels que l'odeur, couleur, aspect (trouble ou clair)

B. Examen microscopique

1. Examen microscopique à frais

- Principe

L'examen du culot urinaire entre lame et lamelle à décantation ou à centrifugation à 5 minutes à 1500 tours, permet :

- ❖ La recherche et l'évaluation semi-quantitative des cristaux, cylindres, cellules épithéliales ou renales. Dans certains cas, la présence d'éléments particuliers orientera vers une pathologie quelque fois ignorée : cystine, cholestérol,...
- ❖ La mise en évidence de leucocytes et hématies, levures, puis celles des bactéries après coloration de Gram.

- Matériel

- ❖ Lame porte objet ;
- ❖ Lamelle couvre objet ;
- ❖ Microscope ;
- ❖ Centrifugeuse.

- Mode opératoire

- ❖ Après la réception des échantillons d'urines (codification, enregistrement) ;
- ❖ Centrifuger, jeter le surnageant et ne rester qu'avec le culot ;
- ❖ Prélever une goutte, déposer sur lame puis couvrir avec la lamelle ;

- ❖ Examiner au microscope au grossissement 10x puis 40x
- ❖ Noter les resultats.

2. Examen microscopique après coloration de gram

Après coloration sur lame porte-objet, cet examen permet la mise en evidence des bacteries gram possitifs et les bacteries gram négatifs à l'infection urinaire.

C. mise en culture

C'est une méthode de recherche des agents pathogènes responsables des infections urinaires. D'après différentes étapes on fait des ensemencements :

***1^{ère} jour* : a. sur milieux d'isolements**

L'isolement des bacteries se fait sur :

- ❖ CLED ou BCP : un milieu de denombrement par anse de platine calibrée ou lame gelosée immergée ;
- ❖ Mac conkey : entero bacteries ;
- ❖ Gelose au sang : gram+ et gram- ;
- ❖ MSA : gram+ ;
- ❖ EMB : gram- ;
- Matériel
 - ❖ Bec bunsen (lampe à alcool) ;
 - ❖ Anse de platine ;
 - ❖ Milieux de cultures ;
 - ❖ Crayon ou marqueur ;
- Techniques
 - ❖ Après la codificatioon de l'identité du malade ;
 - ❖ On allumé la lampe à alcool ou le bec bunsen ;
 - ❖ A l'aide de l'anse de platine on preleve l'échantillon puis on ensemence sur le milieu de culture choisit pour l'isolement ;
 - ❖ Travailler asceptoiquement, toujours près de la chaleur et puis l'anse doit etre préalablement flambé avant et après ensemencement ;
 - ❖ Incber à l'etuve à 37°c pendant 24 heures.

NB : mes milieux tels que GS, VCN et muller hinton + sang n'ont pas besoin d'oxygène mais ont besoin du CO₂ pour des bactéries exigeants (hémophilis, neisseria, streptococoque colorée) les milieux doivent d'abord passer par la jare ou cloche avant l'incubation pour se débarrasser de l'oxygène.

2^{ème} jour :

- lecture sur CLED : compter le nombre des colonies et se référer du tableau d'interprétation
- lecture sur mac conkey

S'il y a poussée de colonies rose (lactose+) et colonies incolores (lactose-) : faire la galerie d'indentification.

- Lecture sur MSA : présence de colonies jaunes et blanche

S'il ya présence des colonies jaunes (staph. Aureus, le plus virulent).

- ❖ Faire la staphylocoagulase sur lame ou en tube ;
- ❖ Ensemencer sur milieu Dnase.

B. Sur milieu d'identification

Pour identifier les enterobacteries, nous utilisons la galerie de léminor.

❖ Sur kligler

Celui-ci nous fournit 4 informations sur la bactérie (caractère biochimique de la bactérie) :

- 1^{ère} la fermentation de glucose (virage pour le jaune+, si pas de virage-) au niveau du culot.
- 2^{ème} la fermentation de lactose observée au niveau de la pente
- 3^{ème} la production de H₂S : marqué par le noircissement au niveau de la pente
- 4^{ème} la production de gaz : au niveau du culot.

Techniques :

A l'aide d'une anse de platine sterile, on prélève une souche de colonie, on fait une piqûre centrale puis on ensemence en strie sur la pente.

❖ Sur citrate de simons

Nous fournit une seule information, le virage du milieu de vert en bleu.

Techniques :

On ensemence sur la pente, après avoir prélevé une souche de colonie.

❖ Sur MIU

1. Mobilité : turbidité à partir de la piqure centrale
2. Indol : produit final des AA en ajoutant le réactif de kovacs (1 à 2 gouttes), il y aura formation d'un anneau à la surface.

❖ S'il est rouge : indol+

❖ S'il est brun ou abscent : indol-

3. Uréase : virage du milieu

D. faire l'antibiogramme

3^{ème} jour :

❖ Lecture sur milieu d'identification par le caractère biochimique énuméré ci-dessus

❖ Lecture du milieu Dnase

❖ Interprétation de l'antibiogramme et rendre les résultats

II.3.2. Coproculture

C'est la recherche des germes responsables des enterites, des infections du tube digestif dans les selles. Ces germes sont causés par :

❖ Salmonella typhi de paratyphi ;

❖ Shigella ;

- ❖ E. coli un entero pathogène ;
- ❖ Staphylocoque aureus etc.
- Prélèvement
 - ❖ Avant tout traitement d'antibiotique ;
 - ❖ Selles recueillis dans un flacon à grande ouverture propre et stérile
 - ❖ L'échantillon doit être étiqueté et accompagné d'une demande d'analyse correctement remplie
- Examen macroscopique

Apprécier la consistance, la couleur et rechercher les éléments atypiques (mucus, sang, parasites) :
- Examen microscopique à frais

Consiste à examiner entre lame et lamelle les selles où on met en évidence les bactéries, parasites (protozoaires, helminthes), levures, les leucocytes et hématies

- Mise en culture

Matériel :

- ❖ Milieux de culture ;
- ❖ Anse de platine ;
- ❖ Bec bunsen ;
- ❖ Tube à essai.

1^{er} jour :

- ❖ Prélèvement une portion de selles de plus au moins 1g, placer dans un tube à essai contenant 1 à 2ml du bouillon selenite à incuber pendant 24h ;
- ❖ Prelever encore une portion de selles puis émulsionner dans l'eau physiologique qui servira à l'ensemencement ;
- ❖ Ensemencer sur hektoen, SS agar, mac conkey, XLD qui sont des milieux sélectifs.

2^{ème} jour

Isolement des colonies

- ❖ Lactose négatif ;
- ❖ H₂S : positif ou négatif.

Emulsionner au moins 3 colonies dans le milieu urée – indole et étuver 2h à 37°C, uréase-, ensemencé sur la galerie d'identification.

3^{ème} jour

Identifier les germes et faire l'antibiogramme

4^{ème} jour

Lecture sur antibiogramme :

❖ Technique d'antibiogramme

- Principe : cette méthode est destinée à tester la sensibilité des bactéries vis-à-vis des antibiotiques et des sulfamidés.
- Matériels :
 - ❖ Bec bunsen ;
 - ❖ Souche de bactérie connue ;
 - ❖ Disque d'antibiotique ;
 - ❖ Milieu de la culture pour antibiogramme (muller hinton) ;
 - ❖ Ecouvillon d'ouate stérile
- Techniques :

On prépare l'inculum en tenant compte de l'étalon de mac farland :

On utilise la souche ciblée (3-5 colonies), on met dans l'eau peptonée (1ml) émulsionnée pendant quelque minute, attendre pendant 30 minutes après passer par ensemencement par inondation ou par écouvillonnage, attendre quelques minutes (±15') puis déposer le disque dans le milieu, incubé à 37°C pendant 24 heures.

NB : Bien disposer les disques tout en évitant le risque de chevauchement des zones d'inhibition.

❖ Coloration de gram

- Principe

- ❖ Le violet de gentiane une fois en contact avec les germes, tous les germes se colorent en violet
- ❖ Le mordançage (lugol : iode) libère son iode qui se fixe au cristal violet et forme un complexe cristal violet-iodé qui sera solubilisé sous l'effet à l'alcool acétone compte tenu de la substance membranaire et les bactéries vont subir la décoloration (gram-)
- ❖ La recoloration pour la fuschine basique par la couleur rouge ou rose.

A la fin nous aurons les bactéries

- ❖ A gram+ (coloré en bleu ou violet)
- ❖ A gram- (coloré en rouge ou rose).

- Matériel

- ❖ Anse de platine ;
- ❖ Bec bunsen ou lampe à alcool ;
- ❖ Portoir ;
- ❖ Lame propre ;
- ❖ Pince ;
- ❖ Marqueur ou crayon.

- Réactif

- ❖ Réactif ;
- ❖ Violet de gentiane ;
- ❖ Lugol ;
- ❖ Alcool acétone ;
- ❖ Fuschine phéniquée diluée.

- Procédures

- ❖ Réaliser un étalement fin (frottis) de l'échantillon sur une lame de verre. Laisser sécher complètement à l'air libre ou utiliser une platine chauffante. Fixer la préparation en la passant 3 ou 4 fois au dessous de la

flame d'un bec bunsen ou recouvrir jusqu'à débordement le frottis de méthanol et laisser évaporer.

- ❖ Placer la lame sur une portoir à coloration et recouvrir de violet de gentiane pendant 1 minute.
- ❖ Rincer soigneusement à l'eau et recouvrir de mordant iode pendant 1 minute.
- ❖ Recouvrir jusqu'à débordement avec le décolorant jusqu'à ce que le solvant s'écoule en un filet clair de la lame (10 à 30 seconde).
- ❖ Rincer à l'eau et recouvrir de fuchsine pheniquée diluée pendant 1 minute.
- ❖ Rincer à l'eau et laisser secher
- ❖ Examiner au microscope à l'immersion.

II. SERVICE DE BIOCHIMIE

La biochimie ou chimie médicale est l'application de la chimie dans le dosage des constituants chimiques de l'organisme en vue du diagnostic des maladies, de la surveillance d'un traitement ou de la prévention des maladies.

❖ Echantillon :

Ici nous utilisons plus le sang, LCR, urines. Pour le sang, le service de prelevement nous envoie le sang complet au quel nous centrifugons pour le recuperer le serum ou plasma. Après diverses analyses l'échantillon est conservé dans le congelateur.

- Codification des échantillons

Les échantillons sont codifiés selon le numero de laboratoire.

- Matériels (Appareillage)

- ❖ Centrifugeuse (labo fuge 200) ;
- ❖ Congelateur (Thomson) ;
- ❖ Réfrigérateur (electro tech) ;
- ❖ Spectrophotomètre (genesys) ;
- ❖ Incubateur (cyan plus) ;
- ❖ Mini vidas (vitek systems) ;
- ❖ Hydrasys 2 scan (Sebia) ;
- ❖ Générateur de courant continu (SHANDON) ;
- ❖ Chambre de migration.

1. DOSAGE DU GLUCOSE

Le glucose est le liquide principal dans le sang périphérique et l'oxydation du glucose est la source principale de l'énergie dans le corps

- ❖ Principe : le glucose est oxydé, suite à l'action de la glucose oxydase (GOD) en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène.

Le peroxyde d'hydrogène formé (H_2O_2) est détecté par la réaction avec la phenol – amino phenazone en présence de peroxydase (POD :)

Glucose + O_2 + H_2O $\xrightarrow{GOD}$ H_2O_2 + Ac. gluconique

H_2O_2 + PHENOL + 4 AP $\xrightarrow{POD}$ Quinone + 4 H_2O

Réactif

Kit (human)

Méthode

- ❖ La longueur d'onde 505 nm (490-550) T° 37°C, cuvette trajet optique 1cm ;
- ❖ A juster le zero de l'instrument avec l'eau distillé ;
- ❖ Pipetez dans une cuvette.

	Blanc	Standard	Echantillon
Standard	-	10ml	-
Echantillon	-	-	10ml
Sd de travail	1m	1ml	1ml

Melanger, incuber 15minutes à 37°C. Mesurer l'absorbance de l'échantillon et standard versus le blanc.

- Calcul :

$$\text{Glc (mg/dl)} = \frac{\text{Abs éch}}{\text{Abs stand}} \times 100 (\text{Stand .conc})$$

$$\text{Facteur de conversion mg/dl} \times 0,0555 = \text{mmol/l}$$
- Valeur de refence

LCR 60-80% valeur de sang

Serum ou plasma 60- 110mg/dl $\approx$ 3,33-6,105

- Interet clinique
 - ❖ Diagnostique du diabète ;
 - ❖ Surveillance du traitement diabetique ;
 - ❖ Confirmé une hypoglycemie organique.

2. DOSAGE DE L'UREE

- Principe

L'urée est hydrolysée en ammoniac et CO_2 . L'ammoniac réagit avec salicylate et l'hypochlorite pour former l'indophénol vert. La couleur de celle-ci est proportionnelle à la concentration de l'urée.



Materiel et réactif

- ❖ Embouts ;
- ❖ Micropipette ;
- ❖ Tube à essai ;
- ❖ Kit (human).

Méthodes

- ❖ La longueur d'onde 580nm, t° 37°C (15 -25°C); cuvette trajet optique 1cm
- ❖ Ajuster le zero de l'instrument avec l'eau distillée ou de l'air pipetez dans une cuvette

	Blanc	Standard	Echantillon
R_1+R_3	1ml	1ml	1ml
Standard	-	10ml	-
Echantillon	-	-	10ml
R_1	1ml	1ml	1ml

Melanger et incuber à 37°C pour 5 minutes ou 10 minutes à 15-25 °C puis ajouter le réactif 2.

- ❖ Calculation

Urée (ml/dl) = Abs echantillon. Stand X 50 (con ech)

- ❖ Facteur de conversion : $\text{mg/dl} \times 0,1665 = \text{mmol/l}$
- ❖ Valeur de référence

Serum ou plasma : 15-45 mg/dl (2,49- 7,49 mmol/l)

Urine 20-35g /24h

❖ Interet clinique

Diagnostic des insuffisances rénales

3. DOSAGE DE L'ACIDE URIQUE

L'acide urique est déterminé par une réaction avec l'uréase. En présence de peroxydase, l'indicateur violet rouge quinoneimine se développe de l' H_2O_2 formé de l'acide 3,5-dichloro-2-hydroxybenzène sulfonique (DC HBS) et 4-aminophénazone (PAP).

AC urique + O_2 + $2H_2O_2$ $\xrightarrow{\text{Uricase}}$ Allantoïne + CO_2 + H_2O_2

$2H_2O_2$ + DCHBS + PAP $\xrightarrow{\text{peroxydase}}$ quinoneimine Hcl + $4H_2O$

Réactif

$\left. \begin{matrix} RGT \\ STD \end{matrix} \right\}$ kit (human)

❖ Procédure

- ❖ Longueur d'onde 520nm
- ❖ Pipette dans les cuvettes

	Blanc réactif	Ech ou STD
Ech / STD	-	20 μ l
RGT	1000 μ l	1000 μ l

Mélanger et incubé 10 minutes à 20- 25°C ou 5 minutes à 37°C dans les 15 minutes lire l'abs de l'éch et STD contre le blanc réactif (DA).

- Calcul : calculer la concentration de l'acide urique comme suit

Serum / plasma:

$$C = 8 \times \frac{\Delta A_{\text{Ech}}}{\Delta A_{\text{STD}}} [\text{mg/dl}] \text{ or}$$

$$C = 476 \times \frac{\Delta A_{Ech}}{\Delta A_{STD}} \text{ (u mol/l)}$$

Urene :

$$C = 88 \times \frac{\Delta A_{Ech} \text{ (mg/dl) or}}{\Delta A_{STD}}$$

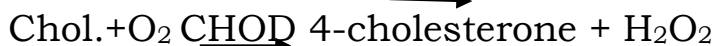
$$C = 5235 \times \frac{\Delta A_{Ech}}{\Delta A_{STD}} \text{ [u mol/l]}$$

4. CHOLESTEROLE

- Principe

Le cholestérol et ses esters sont libérés de lipoprotéines par des détergents. L'esterase de cholestérol hydrolyse les esters et H_2O_2 est formé dans l'oxydation enzymatique suivante du cholestérol par la cholestérol - oxydase selon l'équation suivante.

Dans la dernière réaction un composant coloré rouge dont l'intensité est proportionnelle à la concentration du cholestérol



La production de quinonimine est proportionnelle à la concentration du chol. dans l'échantillon

Réactifs

Kit (Cypress)

Préparation

Dissolvez le contenu d'un flacon R₂ (ENZ) dans le contenu d'un flacon R₁ (tampon). Cette solution de travail est stable 4 mois entre 2-8°C ou 40 jours à la t° ambiante et à l'abri de lumière.

- Procédure

- ❖ Longueur d'onde 505nm (5000-550) ; T° 37°C / 15-25°C ; cuvette trajet optique 1cm
- ❖ Ajuster les zéros de l'instrument avec de l'eau distillée

❖ Pipettez dans une cuvette

	Blanc	Standard	echantillon
Standard note 1	-	10 μ l	-
Echantillon	-	-	10 μ l
Sol de travail	1ml	1ml	1ml

Mélanger et incuber 5minutes ou 10minutes à 15 - 25°C. Mesurez les absorbances de l'abs et du standard contre le tube blanc.

La couleur est stable au moins 60 minutes

- Calcul

Cholesterol (mg/dl) = (Abs Ech./ Abs Stand) x 200 (conc-stand)

- Facteur de conversion mg/dl X 0,0258= mmol/l

- Valeur de référence : Evaluation du risque

Moins de 200mg /dl normal

200- 239 mg/dl suspects

240 mg/dl and above Elevée

- Intérêt Clinique

- ❖ Diagnostique de l'infarctus du myocarde

- ❖ Dépistage et surveillance des états d'hyper lipémie I^{aire} et II^{aire}

III. BANQUE DU SANG

- Matériel de la banque de la banque du sang
 - ❖ Tube à hémolyse ;
 - ❖ Centrifugeuse ordinaire ;
 - ❖ Tube à essai ;
 - ❖ Pipette pasteur ;
 - ❖ Portoir becher ;
 - ❖ Plaque d'opaline ;
 - ❖ Micro pipette ;
 - ❖ Ouate hydrophile ;
 - ❖ Baguette en verre ;
 - ❖ Loupe ;
 - ❖ Microscope ;
 - ❖ Gant ;
 - ❖ Papier bristol.
- Analyse réelles réalisées

1. GROUPE SANGUIN ABO ET RHESUS

a) Méthode de Simonin

- Échantillon : plasma ou serum
- Réactif
 - ❖ Hématies test A à 10%
 - ❖ Hématies test B à 10%
- Matériel
 - ❖ Centrifugeuse ordinaire ;
 - ❖ Micro pipette de 100ml ou pipette pasteur ;
 - ❖ Tube à hémolyse en verre ou en plastique ;
 - ❖ Papier bistol.
- Mode opératoire

Le plasma ou le serum peut être obtenu soit par :

- ❖ La centrifugation des échantillons à 300trs /minutes
 - ❖ Par sédimentation des hématies (par le plasma),
rétraction du caillot (par le serum).
- Disposer pour chaque échantillon 2 tubes notés A et B

- ❖ Mettre 100ml ou 2 gouttes de plasma dans tous les deux tubes
- ❖ Ajouter 2 gouttes d'hématies test A dans le tube marqué A et 2 gouttes de plasma dans tous les deux tubes
- ❖ Bien mélanger, centrifuger à 1500 ou 2000 tours pendant 5 minutes, il se forme 2 phases bien distinctes (le culot globulaire et le surnageant)
- ❖ Sécouer légèrement les tubes pour décoller le culot globulaire situé au fond du tube puis déposer le contenu du tube sur le papier bristol et observer les agglutinations.

Lecture :

Le test est positif lorsque le culot globulaire reste tel quel et ne forme pas une phase homogène avec le surnageant le test est négatif lorsque le culot globulaire forme avec le surnageant une phase homogène.

RESULTAT

Echantillon	Hématies test A	Hématies test B	Groupe sanguin
Serum ou plasma	-	+	A
	+	-	B
	-	-	AB
	+	+	O

NB : les hématies test préparées se conservent au frigo à 2-8°C ou après avoir ajouté quelques gouttes d'acide de sodium

b. Méthode de beth vincent

- Echantillon : sang total prélevé sur anticoagulant (EDTA, citrate)
- Réactif : sérums anti A, anti B et anti AB.
- ❖ Matériel
 - Plaque d'opaline de groupage
 - Micropipette de 100ul ou 1000 ul et embouts
 - Ouate hydrophile ou papier hygiénique

- Tubes à hémolyse en verre ou en plastique
 - ❖ Mode opératoire
 - Mettre sur la plaque d'opaline 3 gouttes de sang (mélangé au préalable à distance d'environ 3 à 5 cm au moyen de micropipettes
 - Ajouter deux gouttes de serum, anti A sur la 1^{ère} goutte, anti B sur la 2^{ème} goutte et anti AB sur la 3^{ème} goutte.
 - Mélanger les différents gouttes de sang avec leurs réactifs à l'aide du bout d'un tube à hémolyse.
- NB :** Bien essuyer le bout du tube à l'aide du coton hydrophile ou papier hygiénique chaque fois que l'on passe d'une goutte à l'autre.
- Imprimer un mouvement d'oscillation à la plaque d'opaline pendant 1 à 3 minutes.
 - Observer la présence (+) ou l'absence (-) d'agglutinations.

	Anti A	Anti B	Anti AB	Groupe sanguin
Sang total	+	-	-	A
Sang total	-	+	+	B
Sang total	+	+	+	AB
Sang total	-	-	-	O

c. Facteur rhésus

- Echantillon : sang veineux prélevé sur anti coagulant (EDTA ou citrate de Na)
- Réactif : serum anti D
- Matériel :
 - ❖ Rhésuscope
 - ❖ Micropipette de 100ul, embouts ou pipette pasteur
 - ❖ Tubes à hémolyse en verre ou plastique
 - ❖ Tige en verre
 - ❖ Coton hydrophile ou papier hygiénique
- Mode opératoire :
 - ❖ Mettre deux gouttes de sang sur la plaque du rhésuscope chauffé

- ❖ Ajouter sur cette goutte de sang deux gouttes de serum anti D
- ❖ Mélanger à l'aide d'une tige en verre ou à l'aide d'un tube
- ❖ Imprimer un mouvement d'oscillation du réshuscope en le basculant et cela pendant 3 minutes
- ❖ Observer ensuite la présence ou l'absence d'agglutination
- Résultat
 - ❖ La réaction est positive lorsqu'il ya presence d'agglutination ceci indique que le sang contient le facteur rhésus. On note Rh+
 - ❖ La réaction est négatif lorsqu'il n'ya pas d'agglutination. Mais ceci n'indique pas l'absence du facteur rhésus car il existe des AgD qui ont un pouvoir agglutinant tres faible. On note anti D(-) comme résultat.

« Si l'anti D ne réagit pas par beth vincent on fait la recherche de l'AgD^U

d. D^u faible

- Echantillon : sang veineux prélevé sur anti coagulant (EDTA ou citrate de Na)
- Réactif :
 - ❖ Serum anti D
 - ❖ Réactif de coombs (anti globuline humaine)
 - ❖ H₂O physiologique
- Matériel :
 - ❖ Centrifugeuse ordinaire
 - ❖ Rhésuscope
 - ❖ Pipettes pasteur avec tétine
 - ❖ Tubes à hémolyse (en plastique de préférence).
 - ❖ Ouate hydrophile ou papier hygienique.
- Mode opératoire

Mettre dans un tube à hémolyse :

- ❖ 1cc de sang veineux (environ)
- ❖ 2cc d'eau physiologique
- Bien mélanger par retournement du tube
- Effectuer le lavage des hématies :
 - ❖ Centrifuger à 3000 TPM pendant 3'
 - ❖ Décanter puis jeter le surnageant à l'aide de la pipette pasteur
 - ❖ Ajouter au culot globulaire 2cc d'eau physiologique puis bien mélanger. Faire cette opération 3 fois (lavage).
- Préparation de suspension d'hématies à 10%
 - ❖ Mettre dans un tube à hémolyse 2cc d'H₂O physiologique
 - ❖ Ajouter 6 à 7 gouttes du culot de l'hématie lavée
 - ❖ Bien mélanger le tout
 - ❖ Mettre dans un tube à hémolyse :
 - ✓ 2 gouttes de suspension des hématies
 - ✓ 2 gouttes de serum anti D
 - ❖ Bien mélanger
 - ❖ Incuber au bain marie à 37°C pendant 15 à 30'
 - ❖ Effectuer 3 lavages à l'eau physiologique comme on l'a fait ci-dessus avec le lavage des hématies.

NB : Lavage pendant 3' à 3000 TPM (3 fois)

- ❖ Décanter le surnageant dans le tube
- ❖ Sécouer le culot globulaire contenu dans le tube
- ❖ Mettre le contenu du tube sur rhéuscope
- ❖ Ajouter 2 gouttes du sérum de coombs
- ❖ Bien mélanger avec le fond du tube à hémolyse
- ❖ Allumer l'ampoule du rhéuscope (la Rx se fait à chaud).
- ❖ Imprimer un mouvement d'oscillation au rhéuscope en le basculant et cela pendant au moins 2 minutes.
- ❖ Observer ensuite la présence ou l'absence d'agglutination

Résultat

Présence d'agglutination : réaction positive à faible pouvoir d'AgD.
On note Rh faiblement positif.

Absence d'agglutination : réaction négative on note Rh négatif.

2. HEMOGLOBINE

- ❖ Ech : sang total prélevé sur anti coagulant (EDTA ou citrate de Na)
- ❖ reactif : solution de drabkin
- ❖ matériel :
 - spectro photomètre ;
 - Mélangeur (mixeur ou vortex) ;
 - Micropipette 20ml ;
 - Pipette gradué 5cc ;
 - tube à essai ;
 - Agitateur ;
 - Minuterie ;
 - courbe de valeur d'Hb pré établie ;
- ❖ Mode opératoire :
 - Dans un tube à essai contenant 5cc de réactif de drabkin mettre 20 ml de sang préalablement mélangé
 - Bien mélanger les deux substances par le vortex
 - Lire les absorbances au photomètre à 540nm, le zéro de l'appareil contre le blanc réactif
 - Ramener toutes les densités optiques obtenues dans la courbe d'étalonnage puis rapporter chaque densité optique à la [] en hémoglobine correspondante

Résultat :

Les résultats s'expriment en g/dl, g %,g/l

3. TEST DE COMPATIBILITE MAJEUR

- Principe

Les globules rouges de donneur mis en contact avec le serum d'un receveur agglutine ou hémolyse s'il ya une incompatibilité.

Mais quand il ya aucune incompatibilité il n'ya pas d'agglutination ni hemolyse.

- Materiel

- Tube à hémolyse
- Portoir
- Pipette pasteur

- Réactif :

- Serum
- Suspension des hématies

d. Mode opératoire

- Laver 3 fois les hematies du donneur et préparer une suspension à 5% à partir du culot
- Dans un tube à hémolyse mettre 2 gouttes de serum de receveur et 2 gouttes de la suspension des hématies de donneur
- Bien melanger, centrifugé à 2000 TPM pendant 1 minute
- Observer la réaction à l'oeil nu ou au microscope
- S'il n'ya ni agglutination, ni hémolyse ajouter 2 gouttes d'albumine bovine et incubé à 37 °c pendant 30 minutes, centrifuger à 200 TPM pendant 1 minute, observer la réaction
- S'il n'ya ni agglutination, ni hémolyse, laver 3 fois et ajouter de sérum de coombs au culot, centrifuger à 2000 TPM pendant 1 minute, observer la réaction
- S'il n'ya ni agglutination, ni hémolyse, on peut conclure qu'il ya compatatibilité.

IV. SERIOLOGIE

1. *Anti strepto lysine (ASLO)*

- Principe

La reaction ASLO est une suspension de particules de latex polystyrène recouvertes de streptolysine O Stabilisée. Le réactif est standardisée pour donner une agglutonation visible en présence d'un serum en présentant une concentration d'anti streptolysine O supérieur ou égale à 1 ml

- Matériel et reactif

- Micro pipette ;
- Agitateur rotatif ;
- Lames réactionnelles ;
- Embouts ;
- Kits ;
- Réactif de latex ;
- Serum négatif ;
- Serum positif.

- Mode opératoire :

- Laisser venir les réactifs et les échantillons à la température ambiante
- Placer une goutte de contrôle positif (50ml) sur le (2) de lame déposer une goutte de contrôle négatif
- 50 ml de chaque sérum non dilué sur les puits suivants :
- Resuspend le réactif ASLO par agitation douce et placer une goutte (50ml) sur chaque puits
- A l'aide d'un embout de pipette, homogène sur le mélange réactionnel dans chaque puits
- Mélanger par rotation de la lame (80 à 1000) TPR, pendant 2 minutes et lire immédiatement sous une lumière directe.

Résultat

Une réaction négative est traduite par une suspension laiteuse uniforme, ne présentant aucune agglutination.

La presence d'une agglutination visible, comparable à contrôle est synonyme de la réaction positive.

2. Facteur Rhumatoïde (FR)

- **Intérêt** : c'est pour le diagnostic de la poly arthrite rhumatoïde
- **Materiels**
 - Micro pipettes ;
 - Embouts ;
 - Tube à essai ;
 - Courte à fond noir.
 - Portoir
 - Agitateur different
- **Mode opératoire**
 - Attendre que les réactifs et les seums à tester soit à la t° amiante
 - Diluer les serums à tester au 1/20 dans le tampon (50ml de sérum)
 - 950 ml de tampon
 - Deposer sur des emplacements successifs de la carte, une goutte de serum positif (R₂), une goutte de serum à tester
 - Bien melanger en etalant bien chaque emplacement à l'aide d'un agitateur différent
 - Imprimer à la coute un lent mouvement de rotaton observé l'apparution eventuelle d'une agglutination en 2 minutes
- **Résultats**
 - Réaction négative : suspension
 - Réaction positive : agglutination

3. WIDAL

- **Principe**

Il consiste à mettre en évidence des anticorps anti O et anti h anti A(H) et B(H) dans le serum du malade atteint de la fièvre thypho paratyphiques à l'aide des antigènes spécifiques connus.

- **Materiel et réactif**

- Plaque avec godet ;
- Micro pipette+embouts ;
- Agitateur ;
- Tubes à hémolyse ;
- Rotor mécanique
- Réactif antigène O,H Stable à 2-8°C
- Echatillon : sérum claire

- **Mode opératoire**

- A l'aide d'une micropipette, prelever 50ml de serum et le déposer dans le 1^{er} godet et 2^e godet placer 50ml de sérum contrôle positif dans les 2 autres cercles suivants (3^e et 4^e cercle)
- Melanger le contenu de chaque cercle à l'aide des tiges différentes
- Agiter la plaque et observer les agglutinations pendant 1minute.

- **Résultat**

- négatif : quand il n'ya pas d'agglutination
- Positif : quand il ya agglutibnatination

II^{EME} PARTIE : ACTIVITES QUOTIDIENNES

III.1 ACTIVITE JOURNALIERE

Semaine du 17/09 au 14/12/2012

Heure d'arrivée et depart : 8h00' à 15h00'

III.2. STASTIQUE

III.2.1 bacteriologie

Tableau stastique

Type d'Analyse	Uro culture	Copro culture	Varia culture
Echantillon negative	100	40	60
Echantillon positive	140	60	90
total	240	100	150

Ce tableau ci-dessus révèle le résultat des analyses effectuées pendant le temps passé en ce service.

III.2.2. Biochimie

Type d'analyse	Gluc	urée	AC. Unique	Cholestrol
Cas positif	55	38	32	22
Cas négative	95	52	88	38
Total	150	90	120	60

Ce tableau nous montre les résultats obtenus pendant le temps de notre stage en ce service.

III.2.3. Banque du sang

Type d'analyse	G.S	Du faible	Compatibilité
Echantillon positive	-	15	13
Echantillon negative	-	48	32
Total	90	63	45

Le test de compatabilité que nous avons réalisés a montré un résultat que nous avons ci-haut :

- le cas negatif quand il n'y a pas agglutination (compatibilité)
- le cas positif quand il ya agglutination (incompatilité).

III.2.4. Serologie

Analyse	ASLO	FR
Cas positif	8	11
Cas negatif	28	18
Total	36	29

Nous avons remarqués que les cas négatifs sont supérieurs aux cas positifs. Ainsi seul le Widal qui fait le contraire car c'est l'infection la plus fréquente

III.3. DIFFICULTÉS RENCONTRES

Etant stagiaire, nous avons rencontrés tant de difficultés pour la maitrise d'autres analyses que nous n'avions pas encoure effectués. Malgré les efforts consentis pour la collaboration entre stagiaire et encadreur il yavait d'autres encadreurs qui se comportaient indéferemment à notre égard, n'ayant pas la volonté des nous encadrer entant que leurs successeurs.

Malgré l'hospitalité, dans d'autre service nous étions comme des spectateurs car nous n'avons pas effectués d'autres analyses même guidé par les encadreur.

Ainsi la préparation du culot globulaire au début n'était pas chose si facile mais après différents efforts nous avons parvenue à maîtriser cela.

III.4. SUGGESTIONS

Nous supplions les autorités de l'INRB à faire le suivi des stagiaires dans différents service car il y a d'autres professionnels qui n'ont pas ce consentement de former les stagiaires. Ainsi de mettre quelques matériels et réactifs à leur disposition pour s'exercer afin d'éviter les erreurs du manque de la pratique.

Nous nous adressons aussi aux autorités de l'ISTM plus précisément à la coordination stagiaire du pouvoir tenir compte de différents services dans les lieux où ils affectent les stagiaire car il ya d'autres lieux qui manquent de services et cela causent tant de difficultés.

CONCLUSION

Nous avons réalisé que le stage est important pour nous car vu la théorie acquis au cours mais sur le terrain cela connaît un peu des variations, cela aide l'étudiant à mieux s'adapter à la vie professionnelle dans le différent cas pouvant se présenter et lui aide à éviter d'autres erreurs car c'est par la pratique que nous acquérons la connaissance et cela reste gravé dans notre cerveau et aussi difficile à oublier.

Ainsi nous interpellons tout étudiant à pouvoir passer leurs stages car c'est une circonstance qui revêt une importance dans la mesure où nous devons appliquer ce que nous avons comme théorie à la pratique. Ayons conscience de ce que nous faisons pour avoir un avenir meilleur car nous détenons la vie et la mort de nos patients ou malades étant corps médical.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	I
INTRODUCTION.....	1
I^{ERE} PARTIES : PRESENTATION ET ORGANISATION DU LIEU DE STAGE	2
I.1. PRESENTATION DE L'ETABLISSEMENT	2
I.2. SITUATION GEOGRAPHIQUE	2
I.3. STRUCTURE ORGANISATIONNELLE	2
I.4. ORGANISATION DU LABORATOIRE	2
<i>I.4.1 Plan du laboratoire</i>	<i>2</i>
<i>I.4.2. Personnel de laboratoire</i>	<i>3</i>
<i>I.4.3. organisation du service</i>	<i>3</i>
<i>I.4.4. Organisation des tâches du prelevement au rendu des resultats</i>	<i>3</i>
ORGANIGRAMME DE L'INRB ET ORGANISATION ADMINISTRATIVE	4
II^{EME} PARTIE : TECHNIQUES REALISEES	5
II.1. SERVICE DE BACTERIOLOGIE	5
<i>II.1.1. Organigramme du service.....</i>	<i>5</i>
<i>II.1.2. DATE DU DEBUT ET DE LA FIN.....</i>	<i>6</i>
<i>II.1.3. TECHNIQUES</i>	<i>6</i>
<i>I.3.1. uroculture</i>	<i>6</i>
<i>II.3.2. Coproculture</i>	<i>10</i>
II. SERVICE DE BIOCHIMIE.....	15
1. DOSAGE DU GLUCOSE.....	15
2. DOSAGE DE L'UREE.....	17
3. DOSAGE DE L'ACIDE URIQUE	18
4. CHOLESTEROLE	19
III. BANQUE DU SANG	21
1. GROUPE SANGUIN ABO ET RHESUS.....	21
2. HEMOGLOBINE	26
3. TEST DE COMPATIBILITE MAJEUR.....	27
IV. SERIOLOGIE	28
3. WIDAL	30
II^{EME} PARTIE : ACTIVITES QUOTIDIENNES.....	31
III.1 ACTIVITE JOURNALIERE	31

III.2. STASTIQUE	31
<i>III.2.1 bacteriologie</i>	31
<i>III.2.2. Biochimie</i>	31
<i>III.2.3. Banque du sang</i>	32
<i>III.2.4. Serologie</i>	32
III.3. DIFFICULTES RENCONTRES	32
III.4. SUGGESTIONS	33
CONCLUSION	34
TABLE DES MATIERES	35