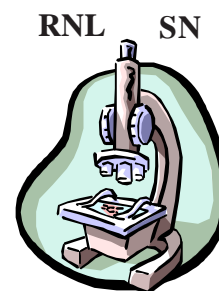


Ministère de la Santé  
et de la Prévention Médicale



République  
du  
Sénégal



# Réseau National de Laboratoires du Sénégal

---

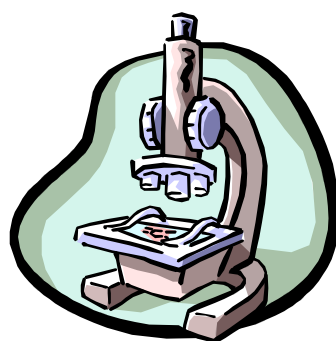
## MANUEL DE PROCEDURES DES TECHNIQUES DE LABORATOIRES D'ANALYSES MEDICALES

**1<sup>ère</sup> Edition**

**Rédaction : Janvier 2004**

**Révision : Novembre 2008**

**REPUBLIQUE DU SENEGAL**  
**MINISTERE DE LA SANTE ET DE LA PREVENTION**  
**RESEAU NATIONAL DE LABORATOIRES**



**MANUEL DE PROCEDURES DES**  
**TECHNIQUES DE LABORATOIRES**  
**D'ANALYSES MEDICALES**

**1<sup>ère</sup> Edition**  
**Rédaction : Janvier 2004**  
**Révision : Novembre 2008**

**REPUBLIQUE DU SENEGAL**

**MINISTERE DE LA1 SANTE ET DE LA PREVENTION**

**RESEAU NATIONAL DE LABORATOIRES**

**MANUEL DE PROCEDURES TECHNIQUES  
DE LABORATOIRES D'ANALYSES MEDICALES**

**Coordonnateur :**

**Professeur Ahmad Iyane Sow,  
Coordonnateur du Réseau National de Laboratoires**

**Equipe de Rédaction :**

Pr. Moussa Fafa <b>Cissé</b> :	Médecin-Chef des Laboratoires, CHNU Albert Royer
Pr. Jean Marie <b>Dangou</b> :	Laboratoire d'Anatomie Pathologique, FMPOS
Dr. Abdoulaye Séga <b>Diallo</b> :	Laboratoire de Cyto-Génétique, FMPOS
Pr. Aïssatou Gaye <b>Diallo</b> :	Laboratoire de Bactériologie, CHNU Le Dantec
Dr. Ousmane <b>Diop</b> :	Laboratoire de Virologie, Institut Pasteur de Dakar
Pr. Saliou <b>Diop</b> :	Centre National de Transfusion, Service d'Hématologie
Pr. Yémou <b>Dieng</b> :	Laboratoire de Parasitologie, CHNU de Fann
Dr. Roughyatou <b>Ka</b> :	laboratoire de Bactériologie, CHNU de Fann
Dr. Abibatou <b>Sall</b> :	Laboratoire de Biologie, CHNU A. Le Dantec
Pr. Niama Diop <b>Sall</b> :	Laboratoire de Biochimie CHNU A. Le Dantec

**Ont participé à l'atelier de validation :**

Saliou T all (CNTS)	Dr El H. Mokhtar Mboup (CHR Kolda)
Adama Coly (CHU de Fann)	Hawa Thioube (CHU Le Dantec)
Dr Khadidiatou Sèye Guèye (CHR Kaolack)	Dr Mamadou Ngom (OMS, Dakar)
Dr Jeanne Guèye Sarr (DPL)	Ndèye Adjaratou M. Diop (CS Ouakam)
Dr Ibrahima Ndir (Centre de Santé Baudoin)	Farma Thiam (CHU de Fann)
Dr Abba Sow (Région Médicale de Fatick)	Pr Moussa Fafa Cissé (CHU Albert Royer)
Dr Rokhaya Diagne (CHU de Fann)	Abdou Guèye (Centre de Santé de Rufisque)
Dr Mariane Cissé (Labo Régional Kaolack)	Bouso Fall (CHU de Fann)
Dr Oumar Kanté (CHR Ziguinchor)	Dr Arame Diop (CS Garpard Kamara)
Magatte Sy Gaye (CHU de Fann)	Pr Iyane Sow (RNL)
Binta Gassama Gaye (CHU de Fann)	Dr Aminata Touré (HOGGY)
Mamour Faye (CHR Tambacounda)	Dr Oumou Barry Kane (Direction de la Santé)
Dr Roughyatou Ka (CHU de Fann)	Dr Fatou Diallo (CHU Le Dantec)
Dr Awa Ndour Seck (CHR de Louga)	Dr Aïcha M. Sarr (CHU Le Dantec)
Dr Marième Kane (CHR de Thiès)	Aly Fall (Centre de Santé Sicap Mbao)
Dr Lam Toro M. Seck (CHR Ourossogui)	Pr Omar Ndir (Fac. Médecine, Pharmacie)
Samba Ngom (Labo SLAP Thiès)	Dr Aliou Thiam (Labo Régional ST-Louis)
Benoît Chevalier (Hôpital Principal)	Pr Yémou Dieng (CHU de Fann)
Thierno Samb (CHU de Fann)	Dr Ousmane M. Diop (Institut Pasteur)
Pr Jean Marie Dangou (Fac. Médecine)	Dr Katy Ndong Ndiaye (CHR Diourbel)
Pr Omar Faye (Fac. Médecine)	Dr Oumarou Foly Diallo (CHR ST-Louis)
Dr Moctar Dieng (CHU Le Dantec)	

## **AVANT PROPOS**

**La mise en place d'un manuel de procédures techniques constitue un besoin qui s'est fait sentir très tôt au sein du Réseau National de Laboratoires, d'une part pour renforcer les capacités des techniciens des laboratoires d'analyses médicales, d'autre part pour répondre à un souci d'harmonisation des techniques utilisées dans ces laboratoires. Par ailleurs, ce manuel vient accompagner la mise en place de la démarche qualité dans nos laboratoires et constitue un outil de paillasse pour que chaque analyse soit effectuée de la même manière partout au Sénégal.**

**Le Réseau National de Laboratoires du Sénégal est né avec la stratégie d'intégration prônée par l'OMS, ce qui justifie la multidisciplinarité de ce document. Seules les techniques d'analyses biochimiques manquent encore du fait de leur diversité ; nous espérons pouvoir procéder au meilleur choix lors de la prochaine révision. C'est pour nous l'occasion de remercier chaleureusement tous les collègues des différentes disciplines biologiques qui n'ont ménagé aucun effort pour rédiger cet ouvrage, ainsi que ceux qui ont procédé à sa correction et tous les participants à l'atelier de validation.**

**Le présent manuel de procédures comprend trois parties :**

- Le paquet minimum d'activités par niveau que chaque laboratoire doit être en mesure de réaliser,**
- L'équipement minimal nécessaire pour la réalisation de ce paquet minimum d'activités,**
- Les procédures techniques par analyse.**

**Le manuel de procédures est un outil commun que le Réseau National de Laboratoires met à la disposition de tous les laboratoires. Son utilisation est indispensable pour atteindre l'objectif d'harmonisation des techniques ; c'est pourquoi le Réseau National de Laboratoires en appelle à la vigilance de tous les biologistes chefs de laboratoires et de tous les personnels de laboratoires.**

**Nous attendons un retour de l'information à la pratique pour améliorer en continu ce document. Les suggestions des utilisateurs sont également les bienvenues pour la révision du manuel.**

**Professeur Ahmad Iyane Sow  
Coordonnateur du RNL du Sénégal**

# Sommaire

## Chapitre 1 : Paquet minimum d'activités :

<b>1.1 Laboratoire de niveau périphérique :</b>	<b>P. 2</b>
Pour les maladies à potentiel épidémique	P. 3
En Hématologie	P. 3
En Parasitologie	P. 3
En Bactériologie	P. 4
En Biochimie	P. 4
En Anatomie et Cytologie Pathologiques	P. 4
<b>1.2. Laboratoire de niveau intermédiaire :</b>	<b>P. 5</b>
Pour les maladies à potentiel épidémique	P. 5
En Hématologie	P. 5
En Parasitologie	P. 6
En Bactériologie	P. 6
En Biochimie	P. 7
En Anatomie et Cytologie Pathologiques	P. 7
<b>1.3. Laboratoire de niveau National :</b>	<b>P. 8</b>
Pour les maladies à potentiel épidémique	P. 8
En Hématologie	P. 8
En Parasitologie	P. 9
En Bactériologie	P. 9
En Biochimie	P. 10
En Anatomie et Cytologie Pathologiques	P. 11

## Chapitre 2 : Equipements et matériels nécessaires : p. 12

<b>2.1. Laboratoire de niveau périphérique</b>	P. 13
<b>2.2. Laboratoire de niveau intermédiaire</b>	P. 14
<b>2.3. Laboratoire de niveau National</b>	P. 15

## Chapitre 3 : Procédures techniques et réactifs :

	<b>P. 17</b>
3.1. Pour les maladies à potentiel épidémique	P. 18
3.2. En Hématologie	P. 24
3.3. En Parasitologie	P. 58
3.4. En Bactériologie	P. 69
3.5. Antibiogramme	P. 84
3.6. En Anatomie et Cytologie Pathologiques	P. 95

# **Chapitre 1**

## **PAQUET MINIMUM D'ACTIVITES PAR NIVEAU**

## **1.1. Laboratoire de niveau périphérique :**

### 1.1.1. Pour les maladies à potentiel épidémique :

#### **Choléra :**

- Examen macroscopique
- Examen microscopique
- Ensemencement de milieu de transport (EPHA, Cary Blair)

#### **Méningite cérébro-spinale :**

- Examen macroscopique
- Examen microscopique
- Recherche d'antigènes solubles (agglutination au latex)
- Ensemencement de milieu de transport (Trans-Isolate, ...)

#### **Shigellose :**

- Examen macroscopique
- Examen microscopique
- Ensemencement de milieu de transport (Cary Blair)

#### **Fièvre jaune et autres fièvres hémorragiques :**

- Conditionnement des échantillons prélevés
- Acheminement au Laboratoire National de Référence

### 1.1.2. En Hématologie

- Hémogramme
- Vitesse de sédimentation
- Test d'Emmel
- Taux des réticulocytes
- Temps de saignement
- Temps de Quick (Taux de prothrombine et INR)
- Temps de céphaline activée (TCA)
- Dosage du fibrinogène
- Groupage sanguin dans les systèmes ABO et Rhésus

### 1.1.3. En Parasitologie

#### **Dans le sang :**

- Recherche directe d'hématozoaires : goutte épaisse et frottis sanguin
- Recherche indirecte d'hématozoaires : Test d'immunochromatographie ICT, Optimal, Paracheck etc ...
- Recherche directe de Trypanosomes et de microfilaires

#### **Dans les urines**

- Recherche directe de *Schistosoma haematobium*, de *Trichomonas vaginalis*, de microfilaires, de levures.

#### **Dans les selles :**

- Recherche des kystes, amibes, œufs et parasites par un examen direct
- Identification macroscopique de vers intestinaux

#### **Dans le LCR :**

- Recherche de cryptocoque à l'encre de chine.

#### 1.1.4. En Bactériologie

**Dans les urines :**

- Examen macroscopique
- Examen microscopique

**Dans le pus :**

- Examen macroscopique
- Examen microscopique

**Dans les sécrétions broncho-pulmonaires :**

- Examen macroscopique
- Examen microscopique

**Dans les sécrétions ORL :**

- Examen macroscopique
- Examen microscopique

**Sécrétions génitales (voir manuel du programme de lutte contre les IST)**

- Examen macroscopique
- Examen microscopique

#### 1.1.5. En Biochimie

**Dans le sang :**

- Glycémie
- Azotémie
- Cholestérol total
- Créatininémie
- Ionogramme (Na, K, Cl)
- Protidémie
- Albuminémie
- Bilirubinémie
- Transaminases (ASAT, ALAT)

**Dans les urines :**

- Albumine
- Sucre
- Corps cétoniques

#### 1.1.6. En Anatomie et Cytologie Pathologiques

Frottis cervico-vaginal de dépistage

Liquides biologiques

Ponction à l'aiguille fine de masses palpables

Biopsies et pièces opératoires (si le Centre de santé est doté d'un bloc opératoire)



## **1.2. Laboratoire de niveau intermédiaire :**

### 1.2.1. Pour les maladies à potentiel épidémique

#### **Choléra :**

- Examen macroscopique
- Examen microscopique
- Isolement et Identification
- Antibiogramme
- Acheminement des souches au Laboratoire National de Référence

#### **Méningite cérébro-spinale :**

- Examen macroscopique
- Examen microscopique
- Recherche d'antigènes solubles (agglutination au latex)
- Isolement et Identification
- Antibiogramme
- Acheminement des souches au Laboratoire National de Référence

#### **Shigellose :**

- Examen macroscopique
- Examen microscopique
- Isolement et Identification
- Antibiogramme
- Acheminement des souches au Laboratoire National de Référence

#### **Fièvre jaune et autres fièvres hémorragiques :**

- Conditionnement des échantillons prélevés
- Acheminement au Laboratoire National de Référence

### 1.2.2. En Hématologie

- Hémogramme
- Vitesse de sédimentation
- Test d'Emmel
- Taux des réticulocytes
- Temps de saignement
- Temps de Quick (Taux de prothrombine et INR)
- Temps de céphaline activée (TCA)
- Dosage du fibrinogène
- Dosage des PDF
- Dosage du D-Dimère
- Groupage sanguin dans les systèmes ABO et Rhésus
- Recherche de l'antigène D faible
- Test de Coombs direct
- Test de Coombs indirect
- Test de compatibilité au laboratoire entre poche de sang et receveur
- Dépistage et identification des agglutinines irrégulières

### 1.2.3. En Parasitologie

#### **Dans le sang :**

Recherche directe d'hématozoaires : goutte épaisse et frottis sanguin

Recherche indirecte d'hématozoaires : Test d'immunochromatographie: ICT, Optimal, Paracheck etc...

Recherche directe de Trypanosomes et de microfilaires

Recherche des parasites sanguicoles par des techniques de concentration : leucoconcentration à la saponine (microfilaires), triple centrifugation (trypanosomes)

Détermination de la parasitémie.

#### **Dans les urines**

Recherche directe de *Schistosoma haematobium*, de *Trichomonas vaginalis*, de microfilaires, de levures.

Détermination de la charge parasitaire

#### **Dans les selles :**

Recherche des kystes, amibes, œufs et parasites par un examen direct

Identification macroscopique de vers intestinaux

Recherche des kystes et œufs après une technique de concentration

Recherche spéciale d'œufs d'oxyure et de taenia

#### **Dans le LCR :**

Recherche de cryptocoque à l'encre de chine.

### 1.2.4. En Bactériologie

#### **Urines :**

Examen macroscopique

Examen microscopique

Dénombrement des germes urinaires

Identification

Antibiogramme

#### **Pus :**

Examen macroscopique

Examen microscopique

Isolement, identification

Antibiogramme

#### **Sécrétions broncho-pulmonaires :**

Examen macroscopique

Examen microscopique

Isolement, identification

Antibiogramme

#### **Sécrétions ORL :**

Examen macroscopique

Examen microscopique

Isolement, identification

Antibiogramme

### **Sécrétions génitales (voir manuel du programme de lutte contre les IST)**

- Examen macroscopique
- Examen microscopique
- Isolement, identification
- Antibiogramme

**Sang :** Hémoculture

### **Sérologies :**

- Sérodiagnostic de Widal et Félix
- Sérodiagnostic des streptococcies : ASLO, ASDOR-B
- Sérologie syphilitique (voir manuel du programme de lutte contre les IST)
- Sérodiagnostic des infections à VIH (voir manuel du programme VIH)

### 1.2.5. En Biochimie

#### **Dans le sang :**

- Glycémie
- Azotémie
- Cholestérol total
- Cholestérol HDL
- Triglycérides
- Créatininémie
- Ionogramme (Na, K, Cl)
- Protidémie
- Bilirubinémie
- Transaminases (ASAT, ALAT)
- Amylasémie
- Calcémie
- Magnésémie
- Phosphorémie
- Phosphatases alcalines
- Fer sérique
- Electrophorèse des protéines
- Electrophorèse de l'hémoglobine

#### **Dans les urines :**

- Albumine
- Sucre
- Corps cétoniques

### 1.2.6. En Anatomie et Cytologie Pathologiques

Frottis cervico-vaginal de dépistage

Liquides biologiques

Ponction à l'aiguille fine de masses palpables

Biopsies et pièces opératoires

Procédures de coloration des Frottis cervico-vaginaux :

Coloration de Papanicolaou

Coloration de Harris Shorr

Screening des Frottis cervico-vaginaux

### **1.3. Laboratoire de niveau National :**

#### **1.3.1. Pour les maladies à potentiel épidémique**

##### **Choléra :**

Examen macroscopique  
Examen microscopique  
Isolement et Identification  
Antibiogramme  
Acheminement des souches au Laboratoire National de Référence

##### **Méningite cérébro-spinale :**

Examen macroscopique  
Examen microscopique  
Recherche d'antigènes solubles (agglutination au latex)  
Isolement et Identification  
Antibiogramme  
Acheminement des souches au Laboratoire National de Référence

##### **Shigellose :**

Examen macroscopique  
Examen microscopique  
Isolement et Identification  
Antibiogramme  
Acheminement des souches au Laboratoire National de Référence

#### **1.3.2. En Hématologie**

Hémogramme (NFS)  
Vitesse de sédimentation  
Test d'Emmel  
Taux des réticulocytes  
Electrophorèse de l'hémoglobine  
Dosage de l'Hb F  
Dosage de l'Hb A2  
Adénogramme  
Myélogramme  
Temps de saignement  
Temps de Quick (Taux de prothrombine et INR)  
Temps de céphaline activée (TCA)  
Temps de thrombine  
Dosage du fibrinogène  
Dosage des D-Dimère  
Dosage des facteurs de la coagulation  
Dosage du facteur Willebrand  
Dosage des protéines S, C et de l'antithrombine  
Détermination des anticorps anti phospholipides (LA et APA)  
Groupage sanguin dans les systèmes ABO et Rhésus  
Recherche de l'antigène D faible  
Phénotypage étendu  
Test de Coombs direct  
Test de Coombs indirect  
Test de compatibilité au laboratoire entre poche de sang et receveur  
Dépistage et identification des agglutinines irrégulières

### 1.3.3. En Parasitologie

#### **Dans le sang :**

- Recherche directe d'hématozoaires : goutte épaisse et frottis sanguin
- Recherche indirecte d'hématozoaires : Test d'immunochromatographie : ICT, Optimal, Paracheck etc...
- Recherche directe de Trypanosomes et de microfilaires
- Recherche des parasites sanguicoles par des techniques de concentration : leucoconcentration à la saponine (microfilaires), triple centrifugation (trypanosomes)
- Détermination de la parasitémie.
- Identification des microfilaires
- Sérologie parasitaire et mycologique
- Recherche et culture de Leishmanies

#### **Dans les urines :**

- Recherche directe de *Schistosoma haematobium*, de *Trichomonas vaginalis*, de microfilaires, de levures.
- Détermination de la charge parasitaire
- Test d'éclosion des œufs de schistosomes

#### **Dans les selles :**

- Recherche des kystes, amibes, œufs et parasites par un examen direct
- Identification macroscopique de vers intestinaux
- Recherche des kystes et œufs après une technique de concentration
- Recherche spéciale d'œufs d'oxyure et de taenia
- Recherche spéciale des larves d'anguillule
- Recherche des Cryptosporidies
- Recherche des Microsporidies
- Recherche d'*Isospora belli*, de *Cyclospora*

#### **Dans le LCR :**

- Recherche de cryptocoque à l'encre de chine.

#### **Prélèvements divers**

- Recherche de parasites.
- Recherche de champignon par examen direct, culture et antifongigramme.
- Recherche de *Pneumocystis carinii*

### 1.3.4. En Bactériologie

#### **Urines :**

- Examen macroscopique
- Examen microscopique
- Dénombrement des germes urinaires
- Identification
- Antibiogramme

#### **Pus :**

- Examen macroscopique
- Examen microscopique
- Isolement, identification
- Antibiogramme

**Sécrétions broncho-pulmonaires :**

Examen macroscopique  
Examen microscopique  
Isolement, identification  
Antibiogramme

**Sécrétions ORL :**

Examen macroscopique  
Examen microscopique  
Isolement, identification  
Antibiogramme

**Sécrétions génitales (voir manuel du programme de lutte contre les IST)**

Examen macroscopique  
Examen microscopique  
Isolement, identification  
Antibiogramme

**Sang : Hémoculture****Sérologies :**

Sérodiagnostic de Widal et Félix  
Sérodiagnostic des streptococcies : ASLO, ASDOR-B  
Sérologie syphilitique (voir manuel du programme de lutte contre les IST)  
Sérodiagnostic des infections à VIH (voir manuel du programme VIH)

**Antibiogramme**

### 1.3.5. En Biochimie

**Dans le sang :**

- Glycémie
- Azotémie
- Créatininémie
- Cholestérol total
- Cholestérol HDL
- Triglycérides
- Ionogramme (Na, K, Cl)
- Gaz du sang (pH, PaCO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub>)
- Protidémie
- Bilirubinémie
- Transaminases (ASAT, ALAT)
- Phosphatases alcalines
- Gamma GT
- Amylasémie
- Calcémie
- Magnésémie
- Phosphorémie
- Fer sérique
- Ferritine
- Transferrine

- Electrophorèse des protéines
- Electrophorèse de l'hémoglobine
- Hormones Thyroïdiennes (T3, T4, TSH)
- Fertilité (FSH, LH, Prolactine)
- Hormones sexuelles (Testostérone, Oestradiol, Progestérone...)
- Marqueurs tumoraux (PSA, CA 125, CA 15-3...)

**Dans les urines :**

- Albumine
- Sucre
- Corps cétoniques
- Densité
- pH

### 1.3.6. En Anatomie et Cytologie Pathologiques

Frottis cervico-vaginal de dépistage

Liquides biologiques

Ponction à l'aiguille fine de masses palpables

Biopsies et pièces opératoires

Procédures de coloration des Frottis cervico-vaginaux

Coloration de Papanicolaou

Coloration de Harris Shorr

Screening des Frottis cervico-vaginaux

**Chapitre 2**

**EQUIPEMENTS ET MATERIELS**

**NECESSAIRES PAR NIVEAU**



## 2.1. Laboratoire de niveau périphérique : centres de santé des Districts

Équipement / Matériel	Quantité minimale
Agitateur type vortex	1
Appareil semi automatique d'hémostase	1
Armoire réfrigérée type « banque de sang »	1
Automate de numération et approche de formule sanguine	1
Bac de coloration	2
Balance portable (portée 5000 g)	1
Bain marie thermostaté	1
Bec Bunsen	2
Centrifugeuse de paillasse	1
Déminéralisateur	1
Distillateur d'eau	1
Egouttoir	2
Glacière et accumulateurs de froid	2
Microscopes optiques	2
Micropipettes à volume variable 0 à 1000 µl	2 de chaque
Minuterie	2
Réfrigérateur avec congélateur	1
Spectrophotomètre UV-VIS	1

Cet équipement est à compléter par le matériel consommable et les réactifs

## 2.2. Laboratoire de niveau régional : Hôpitaux régionaux, labo régionaux

<b>Equipement / Matériel</b>	<b>Quantité minimale</b>
Agitateur de plaques	1
Agitateur type vortex	2
Agitateur magnétique	1
Appareil semi automatique d'hémostase	1
Armoire réfrigérée type « banque de sang »	1
Autoclave vertical (150 litres ou plus)	1
Automate de numération et approche de formule sanguine	1
Automate de biochimie environ 100 tests/heure	1
Bac de coloration	2
Balance portable (portée 5000 g)	1
Bain marie thermostaté	1
Bec Bunsen	4
Centrifugeuse de paillasse	2
Centrifugeuse sur pied	1
Centrifugeuse réfrigérée	1
Chaîne Elisa (Laveur + incubateur + lecteur)	1
Chaîne d'électrophorèse	1
Déminéralisateur	1
Densitomètre	1
Dispositif complet d'électrophorèse	1
Distillateur d'eau	1
Etuves bactériologiques	2
Glacière et accumulateurs de froid	4
Micropipettes à volume variable 0 à 1000 µl	2 de chaque
Microscopes optiques	3
Minuterie	2
Réfrigérateur avec congélateur	3
Rotateur	1
Spectrophotomètre	1
Spectrophotomètre UV-VIS	2

Cet équipement est à compléter par le matériel consommable et les réactifs

### 2.3. Laboratoire de niveau national : Hôpitaux nationaux, laboratoires de référence des programmes de lutte contre les maladies prioritaires

Equipement / Matériel	Quantité minimale
Agitateur de plaques	1
Agitateur type vortex	2
Agitateur magnétique	2
Armoires de rangements de lames et de blocs	2
Automate d'hémostase	1
Automate d'enrobage à la paraffine	1
Automate de déshydratation	1
Automate de coloration	1
Armoire réfrigérée type « banque de sang »	1
Autoclave vertical (150 litres ou plus)	1
Automate d'hématologie en formule complète	1
Automates de numération et approche de formule sanguine	1
Automate de biochimie environ 150 tests/heure	1
Bac de coloration	2
Bain marie thermostaté	1
Balance portable (portée 5000 g)	1
Bec Bunsen	4
Bouteille de transport d'azote liquide	2
Centrifugeuse de paillasse	2
Centrifugeuse réfrigérée	1
Centrifugeuse sur pied	2
Chaîne Elisa (Laveur + incubateur + lecteur)	1
Chaîne d'électrophorèse	1
Congélateur à -80°C	1
Cryomicrotome	1
Cytocentrifugeuse	1
Déminéralisateur	1
Densitomètre	1
Dispositif complet d'électrophorèse	1
Distillateur d'eau	1
Etuves bactériologiques	2
Four à micro-ondes	1
Gazomètre	1
Glacière et accumulateurs de froid	4
Incinérateur (accessibilité)	-
Micropipettes à volume variable 0 à 1000 µl	2 de chaque
Microscopes optiques	4
Microscopes de recherche	1
Microscope à observateurs multiples	1
Microtome	2

Minuterie	2
Platine chauffante	1
Photomicroscope	1
Réfrigérateur avec congélateur	3
Rotateur	2
Spectrophotomètre	1
Spectrophotomètre UV-VIS	2
Trocarts de Mallarmé pour myélogramme	4

# **Chapitre 3**

## **PROCEDURES TECHNIQUES**

## 3.1. MALADIES A POTENTIEL EPIDEMIQUE

### 3.1.1. Choléra :

#### Prélèvement

En cas de suspicion de choléra, les selles sont prélevées chez le patient conscient, dans un pot propre hermétiquement fermé.

Chez le malade fatigué ou avec des troubles de la conscience, un écouvillonnage rectal est effectué.



**Pot de coproculture**

#### Transport

Le prélèvement est immédiatement acheminé au laboratoire ; si le transport est différé, les selles doivent êtreensemencées dans un milieu Cary Blair.

##### a) *Examen macroscopique :*

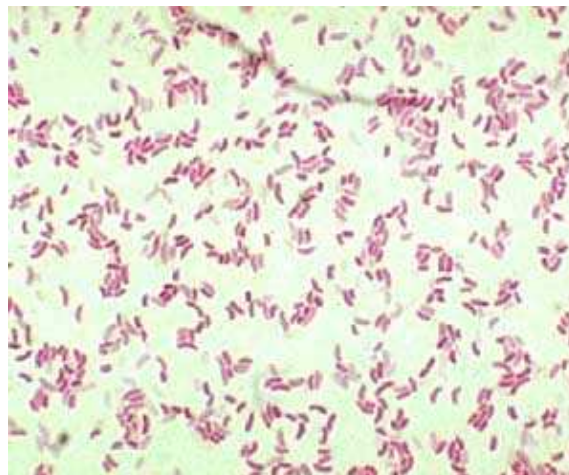
L'examen macroscopique apprécie à l'œil nu l'aspect des selles qui, dans les cas typiques, sont liquidiennes, ressemblant à de l'eau de riz.

D'autres aspects sont cependant possibles.

##### b) *Examen microscopique :*

Il s'agit surtout d'un examen à l'état frais (une goutte de selles entre lame et lamelle observée à l'objectif x 40) pour rechercher essentiellement une mobilité suspecte des bactéries, à savoir des bacilles très mobiles grâce à une ciliature polaire, comparés à des étoiles filantes.

Une coloration de Gram peut être effectuée : les vibrions se présentent alors sous forme de bacilles à Gram négatif incurvés (en virgule).



**Aspect en virgule des vibrions après coloration de Gram**

NB : Les laboratoires périphériques qui ne peuvent pas procéder à la culture :

- rendent les résultats obtenus aux deux premières étapes (examens macroscopique et microscopique)
- ensemencent un milieu de transport (Cary Blair) qui sera envoyé au laboratoire régional ou national le plus proche.



### Milieu de Cary Blair (gélose semi solide)

#### c) Isolement :

La culture des selles à la recherche de *Vibrio cholerae* est effectuée sur deux sortes de milieux :

/Le milieu d'enrichissement qui est un bouillon permettant une culture abondante et rapide des vibrions : l'Eau Peptonée Hypersalée Alcaline (EPHA) est utilisée en général. Après ensemencement, ce milieu est incubé à 37°C pendant 4 h puis repiqué sur milieu d'isolement.

/Les milieux d'isolement, qui peuvent être sélectifs ou non, permettent d'obtenir des colonies caractéristiques :

- Sur gélose nutritive alcaline (GNA), les colonies de vibrions sont de taille moyenne, à surface lisse, transparentes, avec des contours réguliers.
- Sur gélose TCBS (Thiosulfate, Citrate, Bile, Saccharose), les colonies sont moyennes à grosses, lisses, à contours réguliers, de couleur jaune du fait de la fermentation du saccharose.



Aspect des colonies de *V. cholerae* sur GNA (à droite) et sur TCBS (à gauche)

#### d) Identification

L'identification est réalisée en deux étapes sur les colonies suspectes après vérification de leur morphologie et de leur mobilité à l'examen microscopique (bacilles très mobiles par ciliature polaire, à Gram négatif incurvés) :

/ Identification biochimique d'abord qui est effectuée grâce :

- au test à l'oxydase qui est positif
- à l'ensemencement d'une galerie d'identification minimale (Kligler-Hajna, Mannitol-Mobilité, Citrate de Simmons, Urée-Indole, Eau peptonée sans indole, Eau peptonée nitratée).

Les principaux caractères biochimiques de *Vibrio cholerae* sont les suivants : Glucose (+) fermenté sans gaz, Lactose (-) ou lent avec test à l'ONPG (+), SH2 (-), uréase (-), indole (+), nitrate réductase (+), catalase (+), oxydase (+). La classique sensibilité au composé O/129 n'est plus un test spécifique à cause de la circulation de plus en plus fréquente, de souches résistantes.

/ Identification immunologique par agglutination sur lame grâce à un test au latex pour déterminer le sérotype et le sérotype. Les sérogroupes O1 et O139 sont responsables d'épidémies ; le sérotype O1 compte trois sérotypes : Ogawa, Inaba et Hikojima.



**Test d'agglutination sur lame pour le sérogroupage (positif à gauche, négatif à droite) [Source : A. Dodin]**

NB : En cas d'épidémie, une démarche plus rapide (ci-dessous décrite) est adoptée et lorsque l'épidémie est confirmée les analyses de selles sont réalisées chez 1 malade sur 10.

- Après les examens macroscopique et microscopique, un milieu d'enrichissement est ensemencé et incubé pendant 3 heures.
- Le 1<sup>er</sup> tube est repiqué sur un 2<sup>e</sup> contenant de l'EPHA et réisolé parallèlement sur milieux d'isolement (GNA, TCBS).
- Au bout de trois autres heures, la même opération est répétée à partir du 2<sup>e</sup> tube d'EPHA.
- Après 16 à 18 heures, les tests suivants sont réalisés sur colonies suspectes isolées sur GNA : examen microscopique, test à l'oxydase et tests d'agglutinations.

NB : à défaut de GNA, on peut utiliser la gélose Mueller Hinton

le test d'agglutination ne doit pas être effectué sur les colonies de TCBS

#### *d) Antibiogramme :*

Il est réalisé sur gélose Mueller Hinton (MH) selon la technique décrite plus loin.

Les antibiotiques suivants doivent être testés pour les besoins de la surveillance comme du traitement : amoxicilline, tétracycline, doxycycline, chloramphénicol, cotrimoxazole, furazolidone, érythromycine, norfloxacine.

#### *e) Acheminement des souches au Laboratoire National de Référence :*

Les souches identifiées et isolées en culture pure seront envoyées au Laboratoire National de Référence sur milieu de conservation qui sera mis à la disposition des laboratoires du Réseau, et conformément aux règles d'expédition des échantillons infectieux.



### 3.1.2. Méningite cérébro-spinale :

#### a) *Prélèvement*

Le prélèvement du LCR se fait par ponction lombaire qui est un acte médical (doit être effectué par un médecin).

Le recueil se fait dans trois tubes stériles dont un destiné à l'étude bactériologique.

#### b) *Transport*

Le LCR doit être acheminé rapidement au laboratoire car les bactéries responsables généralement de méningites sont fragiles.

Au laboratoire, le tube peut être conservé à 37°C en attendant d'être traité

#### c) *Examen macroscopique :*

L'aspect du liquide céphalorachidien (LCR) est noté dès l'arrivée de l'échantillon.

Il peut être clair louche, trouble, purulent, hématique, xanthochromique. **Un LCR clair n'exclut pas une méningite** : c'est les cas des méningites purulentes au début ou décapitées par une antibiothérapie préalable, c'est aussi le cas des méningites tuberculeuses, virales, parasitaires ...

#### d) *Examen microscopique :*

Il permet une étude cytologique et bactériologique :

/ La cytologie quantitative est effectuée sur le LCR total par dénombrement sur cellule de Malassez ou de Nageotte qui permet de déterminer le nombre de cellule par millimètre cube de LCR. Ce nombre est égal à 1 à 3 / mm<sup>3</sup> dans un LCR normal.

/ La cytologie qualitative, réalisée sur le culot de centrifugation, précise la nature des cellules présentes (polynucléaires, lymphocytes ...)

/ Un frottis est réalisé à partir du culot de centrifugation pour une coloration de Gram. L'examen au microscope peut mettre en évidence des bactéries

Exemples : . diplocoques à Gram négatif en 'grain de café'

. diplocoques à Gram positif lancéolés, encapsulés

. bacilles à Gram négatif polymorphes, ...

#### e) *Recherche d'antigènes solubles (agglutination au latex) :*

Elle permet un diagnostic rapide de la méningite grâce un test d'agglutination effectué sur le surnageant de centrifugation. (suivre les directives formulées par le fabricant du kit utilisé).

**NB :** Pour les laboratoires ne disposant pas de plateau technique pour faire plus, les résultats obtenus sont rendus (examens macroscopique, cytologie quantitative et qualitative, test d'agglutination) et le reste de l'échantillon de LCR est mis dans un milieu de transport comme le Trans-Isolate qui sera acheminé au Laboratoire régional ou national le plus proche.

#### f) *Culture*

Dès l'arrivée du LCR, il est ensemencé sur milieux enrichis qui seront incubés sous atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub>.

#### g) *Isolement et Identification de Neisseria meningitidis (agent de méningite épidémique):*

La culture est réalisée avec le LCR total sur des milieux riches : Mueller Hinton et Gélose au sang cuit additionnée de mélange polyvitaminique.

Après isolement, un test à l'oxydase est réalisé sur les colonies suspectes puis une galerie d'identification ensemencée (Galerie API NH, Galerie *Neisseria* 4 heures).

Les principaux caractères d'identification de *Neisseria meningitidis* sont les suivants : diplocoques à Gram négatif, aérobie stricte, oxydase (+), Maltose (+), Glucose (+).

Les tests d'agglutination permettront la confirmation, en précisant le séro groupe.

**g) Antibio gramme :** La sensibilité des souches aux antibiotiques suivants sera particulièrement surveillée : chloramphénicol, cotrimoxazole, aminopénicilline, céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération.

**h) Acheminement des souches au Laboratoire National de Référence :**

Les souches identifiées et isolées en culture pure seront envoyées au Laboratoire National de Référence sur milieu de conservation qui sera mis à la disposition des laboratoires du Réseau, et conformément aux règles d'expédition des échantillons infectieux.

### 3.1.3. Shigellose :

**a) Prélèvement :**

Les selles sont recueillies dans des pots propres.

**b) Transport :**

Le prélèvement est immédiatement acheminé au laboratoire ; si le transport est différé, les selles doivent êtreensemencées dans un milieu Cary Blair.

**c) Examen macroscopique :**

Il vérifie la consistance des selles, la présence de glaire, de sang de mucus.



**Selles sanglantes, suspectes de shigellose**

**d) Examen microscopique :**

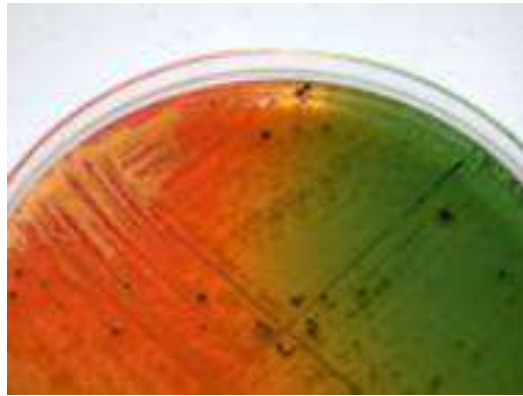
En cas de shigellose, on note la présence de nombreux polynucléaires et un déséquilibre de la flore avec prédominance de bacilles immobiles.

En outre, cet examen permet d'écarter la présence d'amibe.

**NB :** Les laboratoires périphériques qui ne peuvent pas procéder à la culture rendent les résultats obtenus aux deux premières étapes, puisensemencent un milieu de transport (Cary Blair) qui sera envoyé au laboratoire régional ou national le plus proche.

**e) Isolement et Identification :**

L'ensemencement est réalisé sur milieux sélectifs (exemples :gélose Hektoen, gélose SS (Salmonella - Shigella) qui sont incubés à 37°C. Au bout de 24 heures, les colonies suspectes (Lactose -, SH2 -) sontensemencées sur milieu Urée – Indole.



### Culture sur gélose Hektoen

Après 18 à 24 heures d'incubation, les souches uréase (-) sont mises en culture sur une galerie d'identification en tubes (kligler hajna, mannitol mobilité).

Les principaux caractères des shigelles sont : bacilles à Gram négatif, immobiles, AAF, catalase (+) sauf *S. dysenteriae*-1, uréase (-), fermentent le glucose sans production de gaz, H<sub>2</sub>S (-), Citrate de Simmons (-). Les caractères différentiels des espèces sont résumés dans le tableau ci-dessous.

*Shigella dysenteriae* est la seule espèce renfermant un sérotype épidémiogène, *Shigella dysenteriae*-1.

Caractères	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. boydii</i>	<i>S. sonnei</i>
Mannitol	(-)	(+)	(+)	(+)
Indole	(-)	V	V	(-)
ONPG	V	(-)	V	(+)

**f) Antibiogramme** : tester les antibiotiques suivants : amoxicilline, acide nalidixique, cotrimoxazole, tétracycline.

**g) Acheminement des souches au Laboratoire National de Référence :**

Les souches identifiées et isolées en culture pure seront envoyées au Laboratoire National de Référence sur milieu de conservation qui sera mis à la disposition des laboratoires du Réseau, et conformément aux règles d'expédition des échantillons infectieux.

## 3.2. HEMATOLOGIE

### 3.2.1. Hématologie cellulaire

#### a) Hémogramme (NFS)

C'est l'étude quantitative et qualitative des éléments figurés du sang.

Le prélèvement est effectué sur tube EDTA

*(Le sang de contrôle (haut, normal et bas) passé une à deux fois par jour selon le nombre de prélèvements doit donner des résultats inclus dans les normes établies par le laboratoire).*

Il doit comporter :

- ◆ la numération des cellules sanguines (globules rouges, globules blancs et plaquettes)
- ◆ l'étude des constantes hématologiques :
  - Taux d'hémoglobine (Hb)
  - Hématocrite (Ht)
  - Volume globulaire moyen (VGM)  
 $VGM = Ht / \text{nombre de GR (en millions)} \times 10$   
Il est exprimé en femtolitre (fL) ou en microns cube ( $\mu 3$ )
  - Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH)  
 $TCMH = Hb / \text{nombre de GR (en millions)} \times 10$   
Il est exprimé en pico gramme (pg)
  - Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH)  
 $CCMH = Hb / Ht \times 100$   
Il est exprimé en pourcentage

◆ L'étude morphologique des cellules sur frottis sanguin qui permet en outre d'établir la formule leucocytaire.

#### Réalisation d'un frottis

- Déposer à 1 cm de l'extrémité d'une lame parfaitement propre, une goutte de sang à l'aide d'un capillaire.

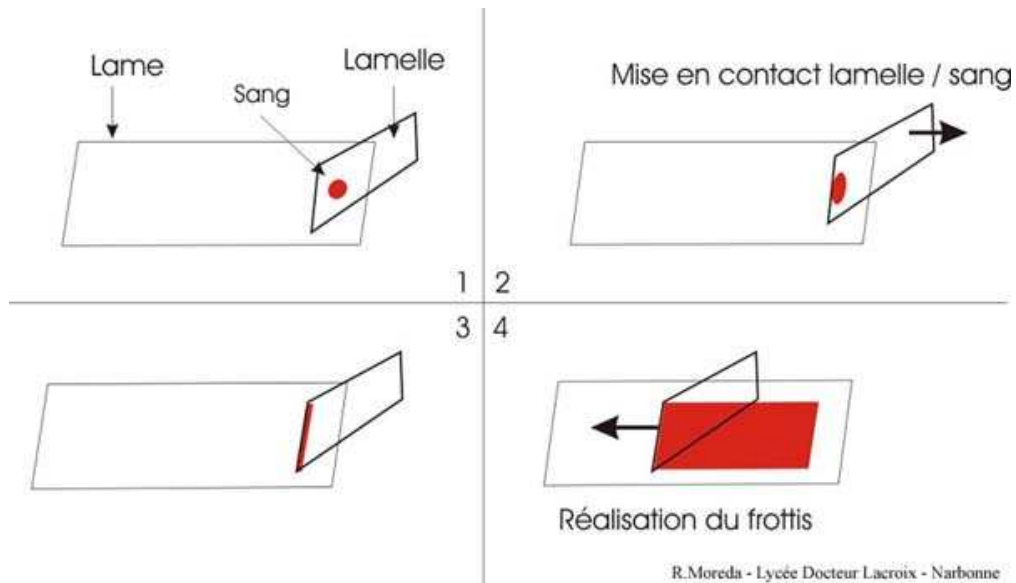
- Placer le bord de la lamelle à étalement en contact avec la lame, à proximité de la goutte de sang.

- Faire glisser la lamelle inclinée à 45° sur la lame jusqu'à atteindre la goutte de sang. Le sang s'étend par capillarité sur toute la largeur de la lamelle.

- Tirer la lamelle d'un mouvement régulier et rapide. Il faut conserver l'inclinaison et ne pas trop appuyer sur la lamelle. Tout le sang doit être étalé avant d'atteindre le bout de la lame.

- Sécher à l'air.

NB : A la place de la lamelle, on peut utiliser une lame à bord mousse



### Réalisation d'un frottis

#### Coloration au May Grunwald Giemsa (MGG)

- Fixation

- Placer la lame du frottis sur un support horizontal au dessus d'un bac de coloration.
- Verser sur la lame 5 gouttes de colorant May-Grünwald pur de façon à recouvrir complètement le frottis. Laisser agir 3 minutes. Laver à l'eau tamponnée (à défaut utiliser l'eau de robinet)

- Coloration au Giemsa

- Préparer une dilution du Giemsa au dixième avec de l'eau tamponnée (eau neutre)
- Recouvrir le frottis de la solution diluée
- Laisser agir 20 mn
- Laver à l'eau

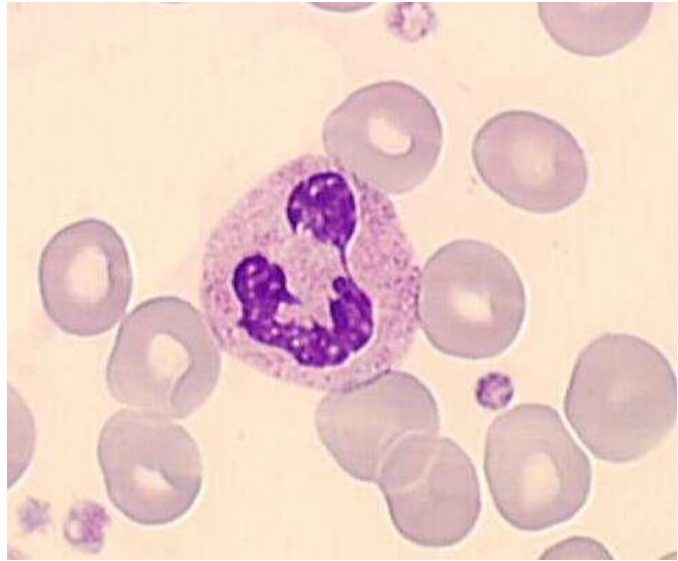
- Séchage

- Laisser sécher la lame à l'air, en position inclinée, après avoir essuyé la face inférieure de la lame avec du papier filtre.
- Attendre au moins 5 minutes avant l'examen microscopique du frottis.

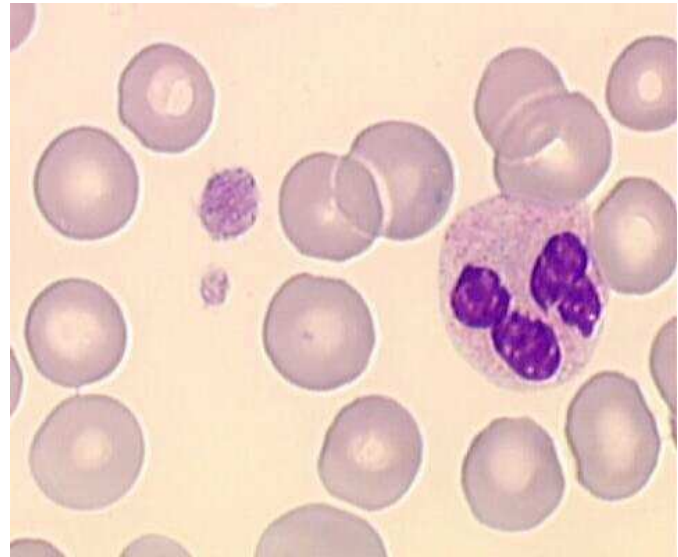
*Galerie de photographies des éléments figurés du sang après coloration au MGG*

Polynucléaire neutrophile

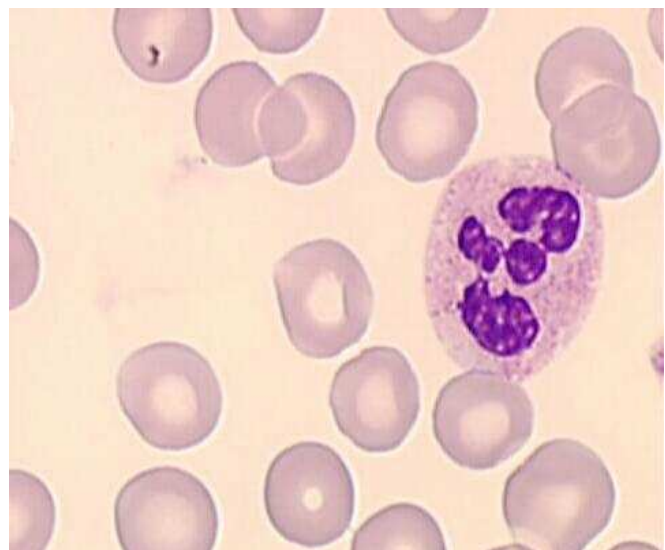
- Taille: 12 à 14µm, arrondi
- Noyau : 3 à 5 lobes
- Cytoplasme : acidophile, petites granulations marron clair (granulations neutrophiles)



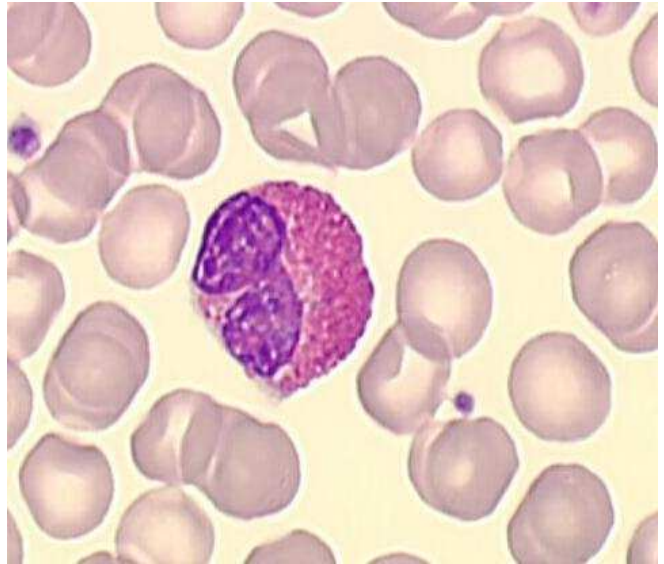
Polynucléaire neutrophile : La chromatine du noyau forme des mottes denses avec de petits espaces clairs. Deux plaquettes sont visibles à gauche de l'image.



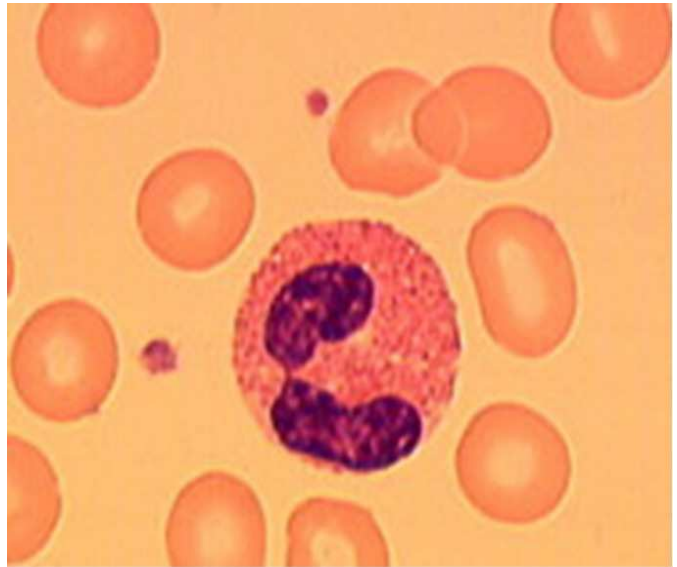
Polynucléaire neutrophile: Le noyau est formé ici de 5 lobes reliés entre eux par un fin fil de chromatine. Le cytoplasme est rosé et rempli de petites granulations



Polynucléaire éosinophile : Noyau souvent bilobé (comme sur cette image). Cytoplasme rempli de grosses granulations oranges (éosinophiles)

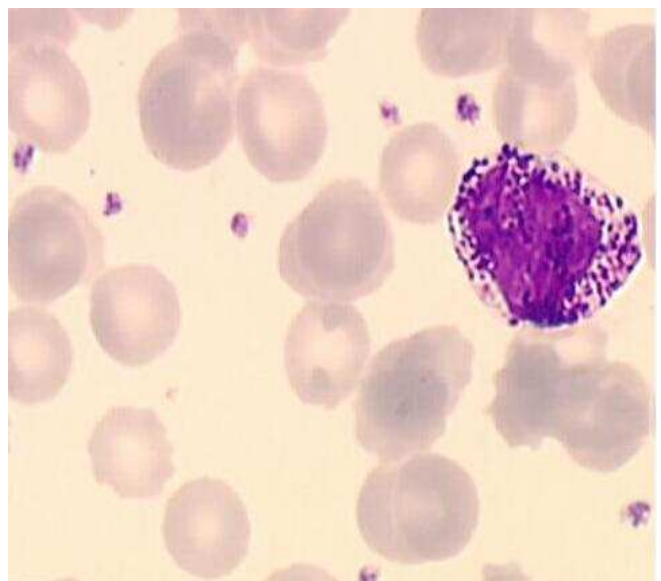


Polynucléaire éosinophile

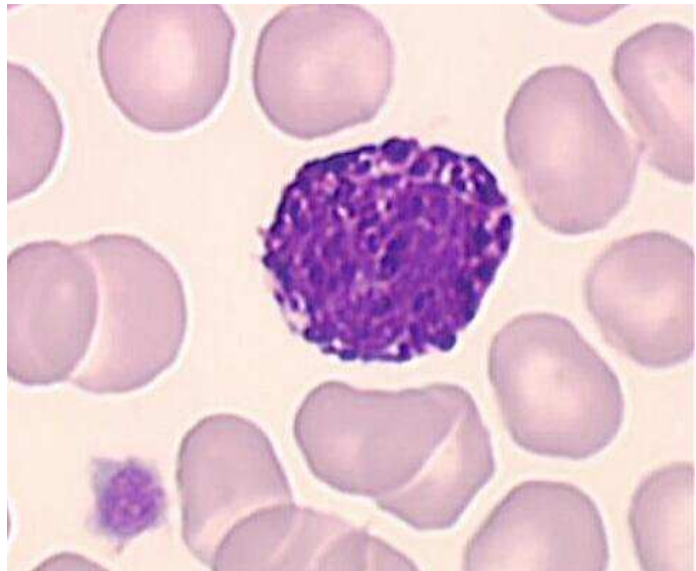


***Polynucléaire basophile***

- *Taille:11 à 13 $\mu$  arrondi*
- *Noyau:2 à 4 lobes denses*
- *Cytoplasme:acidophile clair*
- *Granulations:bleu violet foncé, nombreuses pouvant recouvrir le noyau*

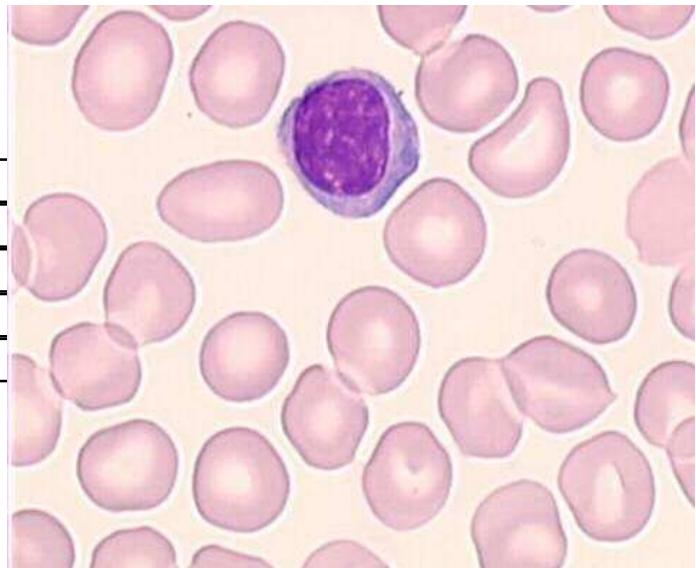


*Polynucléaire basophile: les nombreuses granulations violet foncé sont le critère majeur d'identification de la cellule.*



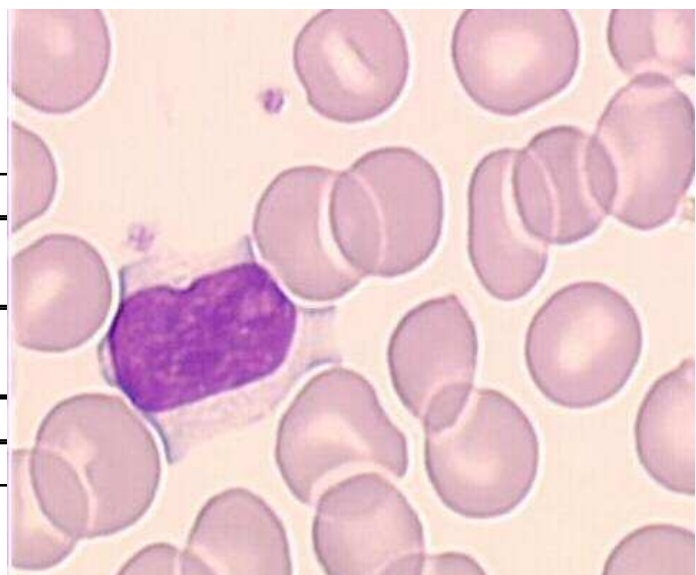
Lymphocyte (Petit):

- Taille: 9-11 $\mu$  arrondi
- Noyau: rond et dense
- Cytoplasme: basophile clair
- Granulations: néant



Lymphocyte (Grand):

- Taille: 10-15 $\mu$  arrondi, déformable
- Noyau: rond, ovale ou en drapeau
- Cytoplasme: bleu très clair



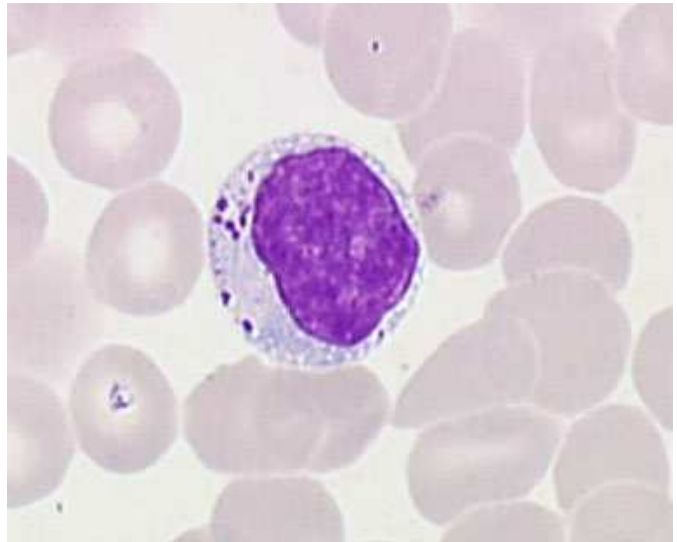


---

**Lymphocyte (Granuleux):**

---

- Taille: 10-14 $\mu$  arrondi,
  - Noyau: rond, ovale
  - Cytoplasme: bleu clair
  - Granulations: quelques granulations azurophiles
- 

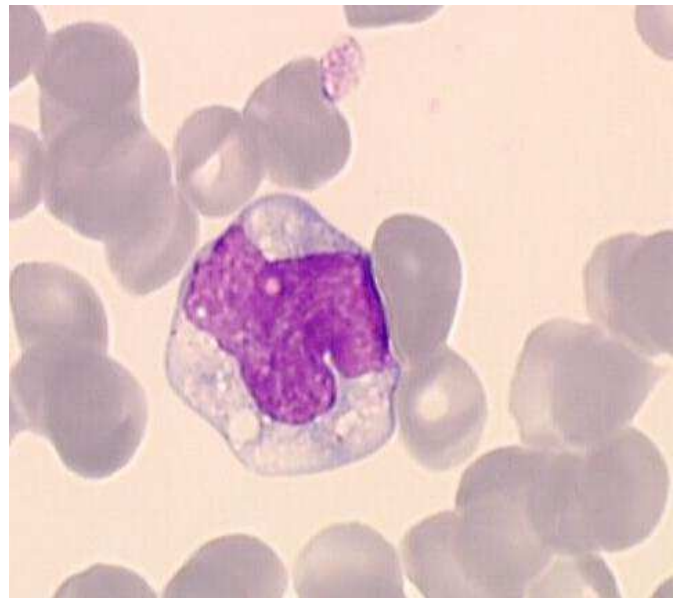


---

**Monocyte**

---

- Taille: 18-20 $\mu$  arrondi,
  - Noyau: rond ou irrégulier
  - Cytoplasme: bleu clair, peut contenir des vacuoles
  - Granulations: très fines, très nombreuses, azurophiles
- 



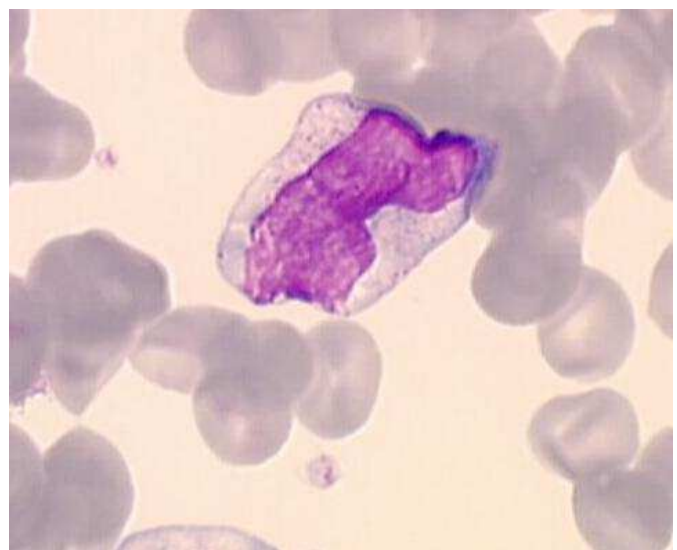
---

**Monocyte:**

---

Noyau irrégulier, cytoplasme gris dans lequel on devine de fines granulations

---



---

Paquettes:

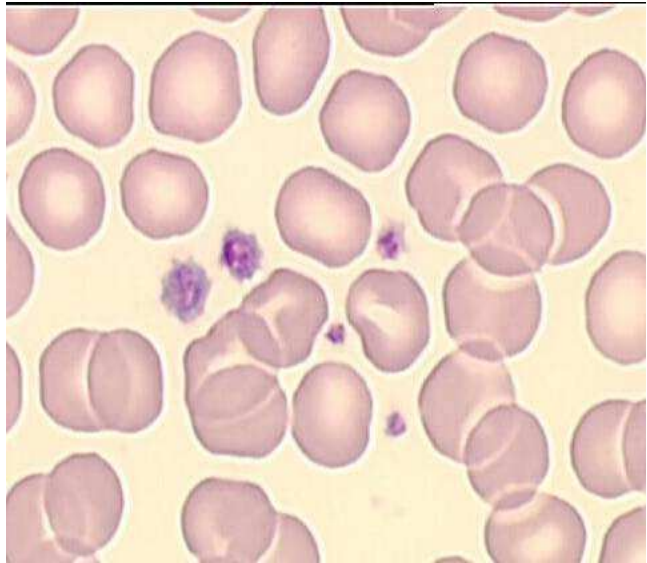
---


Cinq petits éléments colorés en violet.

---

NB : une différence de taille = anisocytose plaquettaire

---



 **Numération globulaire et paramètres érythrocytaires**

	1ère semaine	8 jours à 3 mois	3 mois à 3 ans	3 à 6ans	6 à 15 ans	Adulte
<b>Hématies 10<sup>6</sup>/μL (Tera/L)</b>	5,0 à 6,0	3,8 à 4,8	3,6 à 5,2	4,1 à 5,3	4,0 à 5,4	H : 4,5 à 5,8 F : 3,8 à 5,4
<b>Leucocytes 10<sup>3</sup>/μL (Giga/L)</b>	10,0 à 30,0	6,0 à 18,0	6,0 à 15,0	5,0 à 13,0	5,0 à 11,0	4,0 à 10,0
<b>Plaquettes 10<sup>3</sup>/μL (Giga/L)</b>	150 à 400	150 à 400	150 à 400	150 à 400	150 à 400	150 à 400
<b>Hémoglobine g/dL</b>	14,5 à 22,5	10 à 16	10,5 à 13,5	10,5 à 13,5	11,5 à 14,5	H : 13,5 à 17,5 F : 12,5 à 15,5
<b>Hématocrite %</b>	44 à 58	38 à 44	36 à 44	36 à 44	37 à 45	H : 40 à 50 F : 37 à 47
<b>VGM fl</b>	100 à 120	85 à 96	70 à 86	73 à 89	77 à 91	82 à 98
<b>TCMH pg</b>	34 à 38	24 à 34	23 à 31	24 à 30	24 à 30	> ou = 27
<b>CCMH g/dL</b>	32 à 36	32 à 36	32 à 36	32 à 36	32 à 36	32 à 36

## Formule leucocytaire

en 10 <sup>3</sup> /μL	1ère semaine	8 jours à 3 mois	3 mois à 3 ans	3 à 6 ans	6 à 15 ans	Adulte
Polynucléaires neutrophiles	6,0 à 26,0	1,5 à 8,5	1,5 à 8,5	1,5 à 8,5	1,8 à 8,0	1,8 à 7,5
Polynucléaires éosinophiles	0,2 à 0,85	0,2 à 1,2	0,05 à 0,7	0,02 à 0,65	0 à 0,6	0,04 à 0,8
Polynucléaires basophiles	0 à 0,64	0 à 0,2	0 à 0,2	0 à 0,2	0 à 0,2	0 à 0,2
Lymphocytes	2,0 à 11,0	2,0 à 11,0	4,0 à 10,5	2,0 à 8,0	1,5 à 6,5	1,0 à 4,5
Monocytes	0,4 à 3,1	0,05 à 1,1	0 à 0,8	0 à 0,8	0 à 0,8	0,2 à 1,0

### b) Vitesse de sédimentation

#### ▪ Conditions de prélèvement

- Prélèvement de sang veineux (en général au pli du coude) ; le tube de prélèvement contient un anticoagulant : EDTA ou citrate trisodique à 3,8% dans une proportion de 20% (1 volume d'anticoagulant pour 4 volume de sang)
- Le prélèvement est réalisé de préférence à jeun

#### ▪ Principe

C'est la vitesse à laquelle les hématies contenues dans le plasma sédimentent au fond d'un tube calibré et gradué, appelé tube de Westergreen. Elle correspond à la hauteur de chute des particules sanguines dans le tube.

#### ▪ Matériel et réactifs

- le tube de Westergreen : c'est une pipette de dimensions standardisées : longueur totale 300 mm, diamètre inférieur à 2,5 mm. Cette pipette est graduée de 0 à 200 mm de haut en bas. Elle est en matière plastique et à usage unique.
- le support : généralement adapté aux pipettes, il permet de les maintenir strictement verticales.

#### ▪ Technique

- Aspirer le sang, bien homogénéisé, dans la pipette de Westergreen jusqu'au trait 0 en tirant sur la languette présente dans la pipette.
- Placer aussitôt la pipette sur le support.

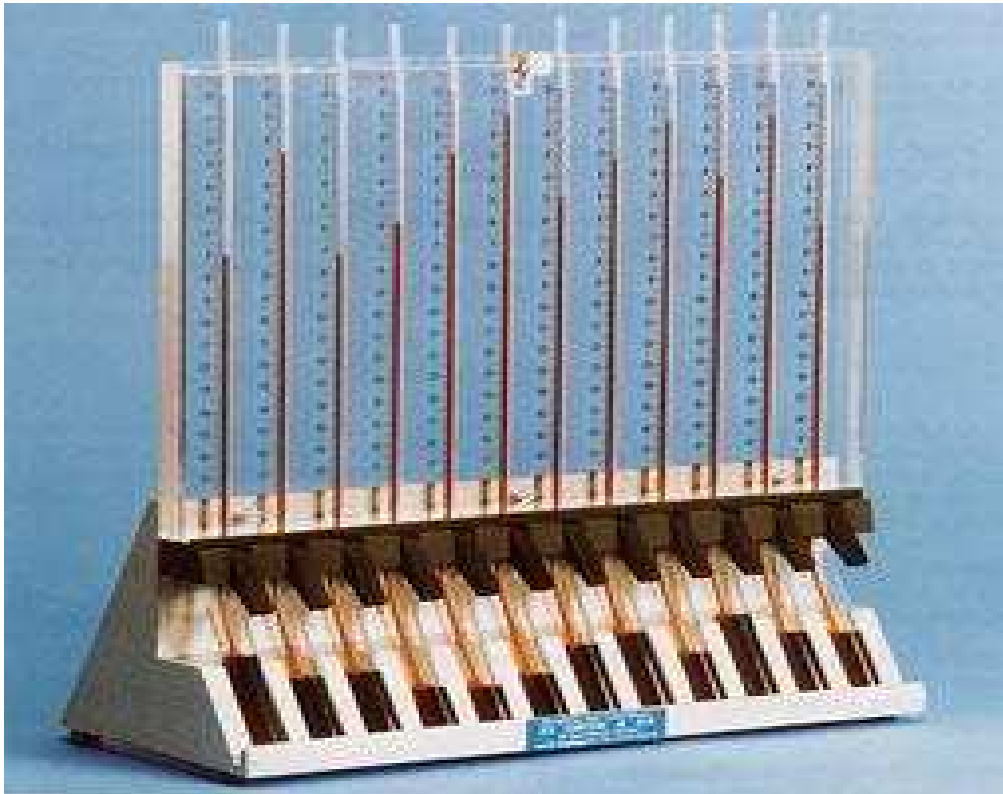
- Lecture

Lire la hauteur du plasma surnageant (exprimée en mm) au bout d'une heure.

**NB : les anciennes lectures à 2h et 24h n'ont pas d'intérêt.**

- Résultats

Les valeurs normales sont :  
- enfant : 6 à 25 mm  
- femme adulte : 4 à 20 mm  
- homme adulte : 3 à 10 mm



### **Portoir pour vitesse de sédimentation**

- Causes d'erreurs

La sédimentation des hématies peut être ralentie artificiellement si :

- l'échantillon sanguin est partiellement coagulé
- la mesure est faite à partir d'échantillon sanguin prélevé depuis plus de 2 heures
- la température du laboratoire est basse

La sédimentation des hématies peut être augmentée artificiellement si :

- la pipette de Westergreen est inclinée
- l'échantillon sanguin est hémolysé ou prélevé avec un excès d'anticoagulant
- la température du laboratoire est élevée.

*b) Test d'Emmel ou test de falciformation des hématies*

▪ Conditions de prélèvement

- le prélèvement est effectué sur sang veineux dans un tube avec ou sans anticoagulant
- il n'est pas nécessaire d'être à jeun

▪ Principe

En présence d'un réducteur (métabisulfite de sodium à 2%), les hématies du drépanocytaire prennent une forme en « faucille » ou en « feuille de houx ».

▪ Matériel et réactifs

- Spatule
- Méta bisulfite de sodium en poudre
- Balance de précision
- Eau distillée
- Flacon de 125 ml
- Papier buvard
- Lame
- Lamelles
- Vernis à ongles

▪ Technique

○ Préparation du métabisulfite

- déposer le papier buvard sur le plateau de la balance
- calibrer l'appareil
- à l'aide de la spatule, prélever la poudre de méta bisulfite et la déposer sur le papier buvard
- peser exactement 2 grammes de cette poudre
- recueillir les 2 grammes dans un flacon de 125 ml
- ajouter 100 ml d'eau distillée
- mélanger et attendre 15 mn environ pour que la solution soit stable
- tester la solution de méta bisulfite à 2% avec les échantillons positifs de la veille

NB : Le contrôle de qualité interne exige de préparer le métabisulfite tous les jours et de le vérifier sur des échantillons considérés connus positifs et négatifs.

○ Préparation du test

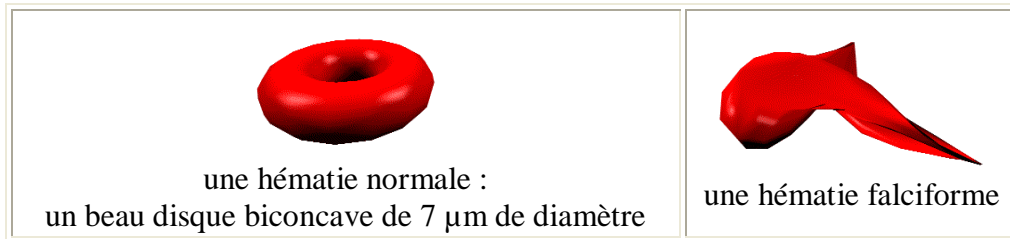
- déposer sur une lame propre une goutte de sang et une goutte de la solution de métabisulfite
- mélanger doucement
- déposer sur le mélange une lamelle en évitant les bulles d'air
- essuyer délicatement l'excès du mélange avec du papier buvard (à défaut utiliser une compresse)
- sceller les bords de la lamelle avec du vernis à ongles ou de la paraffine, le but étant d'empêcher le contact des hématies avec l'oxygène de l'air ambiant.

- Lecture

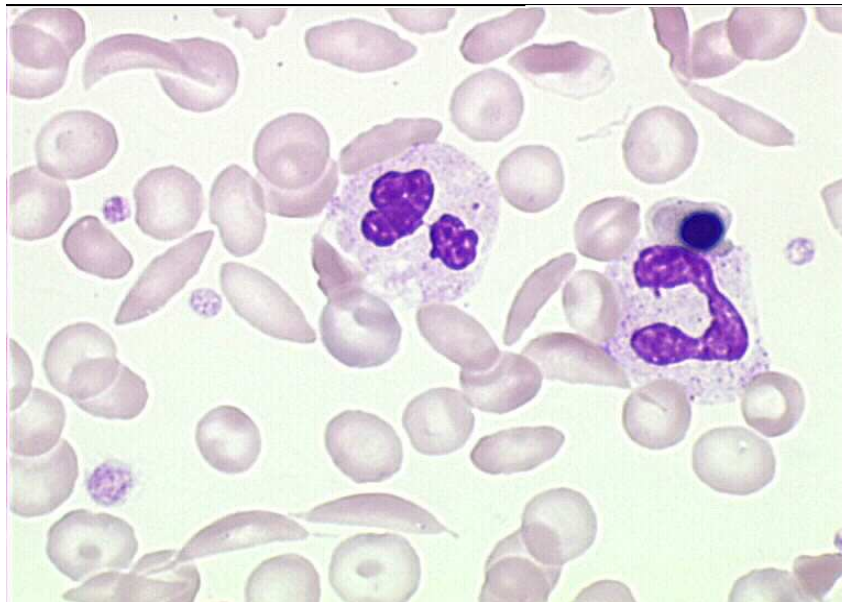
Elle se fait au bout de 15 à 30 mn au microscope à un grossissement 40.

- Résultats

- test négatif : les hématies gardent leur forme régulièrement arrondie ;
- test positif : présence de nombreuses hématies en forme de « faucille ».



**Hématies normale et falciforme**



**Frottis sanguin avec présence de drépanocytes**

- Causes d'erreurs

- Etalement mal fait avec hématies « traumatisées »
- Présence de bulles d'air

*b) Taux des réticulocytes*

- Conditions de prélèvement

- sang veineux sur tube EDTA ou sang capillaire
- il n'est pas nécessaire d'être à jeun

- Principe

Les réticulocytes sont des globules rouges jeunes qui possèdent encore des ribosomes et des mitochondries. Ils sont dès lors capables d'un métabolisme assez intense et ils synthétisent encore activement de l'hémoglobine. On les reconnaît le plus facilement au moyen de colorations utilisant le bleu de crétyl ou le bleu de méthylène nouveau : dans ces conditions les organites cellulaires cités plus haut sont rendus visibles sous la forme d'une "*substance granulo-filamenteuse*" caractéristique.

- Matériel et réactifs

- bleu de crétyl brillant ou bleu de méthylène
- tube à hémolyse
- bain marie
- pipette Pasteur
- lame

- Technique

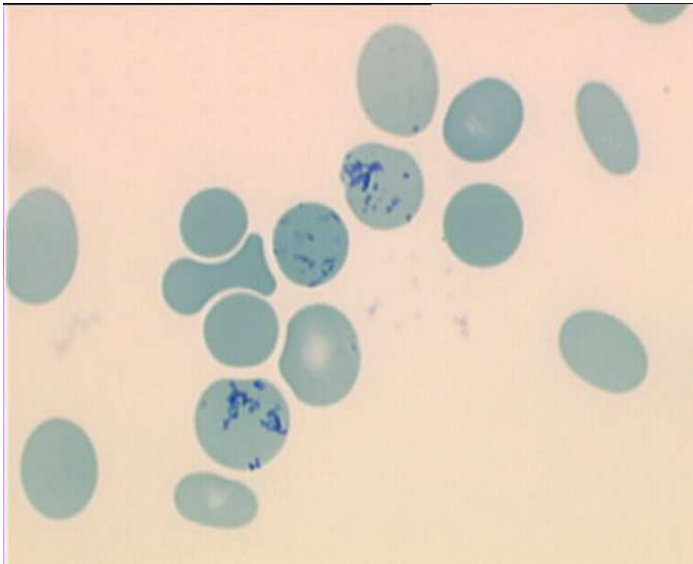
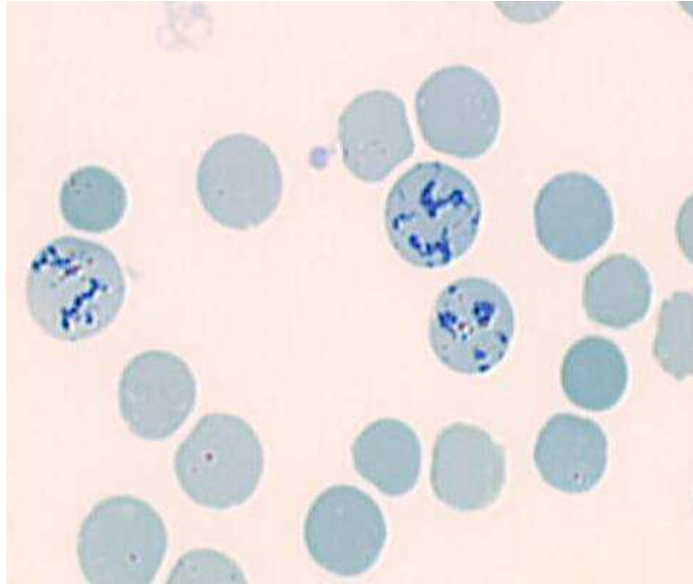
- dans un tube à hémolyse, déposer 1 goutte de sang et 1 goutte de bleu de crétyl (si le taux d'Hb est inférieur à 11 g/dL, mettre 2 gouttes de sang et 1 goutte de bleu de crétyl)
- incuber au bain marie à 37°C pendant 20 mn
- puis confectionner un frottis et lire au microscope au grossissement 100 avec de l'huile à immersion (idéalement lire sur dix champs ; compter le nombre de réticulocytes et de globules rouges et exprimer le pourcentage de réticulocytes sur le nombre globules rouges).

- Résultats

Le résultat est exprimé en pourcentage et surtout en valeur absolue de réticulocytes par mm<sup>3</sup> de sang. Le taux normal est de :

- 0,2 à 2% chez l'adulte (généralement 0,5 à 1,5%)
- 2 à 6% chez le petit enfant

Le taux des réticulocytes traduit l'activité de l'érythropoïèse médullaire. Il est un indicateur du type d'anémie.



**Frottis avec présence de réticulocytes (3 réticulocytes sont visibles sur chaque frottis)**

- Causes d'erreurs
  - corps de Jolly
  - hématies à ponctuations basophiles (mieux visibles sur microscope à diaphragme fermé)
  - inclusions parasitaires (plasmodium)
  - corps de Heinz



## b) Détermination de la résistance globulaire osmotique

### ▪ Conditions de prélèvement

- sang veineux
- utiliser un tube avec de l'héparine (EDTA contient des sels)

### ▪ Principe

Les hématies, qui in vivo sont dans un milieu isotonique, se comportent in vitro dans des solutions hypotoniques comme des osmomètres. Par osmose, l'eau diffuse du milieu le moins concentré en osmoles vers le compartiment le plus concentré en osmoles.

Dans les solutions hypotoniques, l'eau pénètre dans les hématies qui gonflent grâce aux propriétés d'élasticité de la membrane plasmique. Au-delà d'un volume maximal, les hématies éclatent en libérant l'hémoglobine dans le milieu extérieur : il y a hémolyse.

Dans certaines pathologies et notamment lors d'anémies hémolytiques, la résistance globulaire osmotique (ou RGO) des hématies peut être :

- augmentée : l'hémolyse apparaît pour des solutions de concentration en NaCl inférieure à celle provoquant normalement l'hémolyse, donc pour des solutions d'hypotonie supérieure. C'est le cas lors de  $\beta$  thalassémies
- diminuée : l'hémolyse apparaît pour des solutions de concentration en NaCl supérieure à celle provoquant normalement l'hémolyse, donc pour des solutions d'hypotonie inférieure. C'est le cas lors de la microsphérocytose.

### ▪ Matériel

- tubes à hémolyse
- portoir
- eau distillée
- NaCl
- Pipette
- Etuve
- Centrifugeuse

### ▪ Technique

La détermination de la RGO se réalise sur sang total ou sur sang déplasmatisé, à 37°C pendant une heure. On réalise une gamme de solutions de NaCl hypotoniques par rapport au plasma. Les concentrations en NaCl de ces solutions varient de 2,6 à 6g/L et sont croissantes de 0,2 en 0,2g/L.

- disposer les 18 tubes à hémolyse sur un portoir et les numérotés
- préparer les 18 solutions de NaCl à partir d'une solution mère à 7g/L et d'eau distillée selon le protocole présenté dans le tableau suivant :

N° des tubes	1	2	3	4	5	....	14	15	16	17	18
Nombre de gouttes d'eau distillée	5	6	7	8	9		18	19	20	21	22
Nombres de gouttes de solution mère de NaCl à 7g/L	30	29	28	27	26		17	16	15	14	13
Concentration finale en NaCl en g/L	6	5,8	5,6	5,4	5,2		3,4	3,2	3	2,8	2,6

- mettre d'abord l'eau distillée
- distribuer la solution de NaCl à 7g/L avec la même pipette après l'avoir correctement rincée avec cette solution
- ajouter dans chaque tube une goutte de sang homogénéisé, ou d'hématies déplasmatisées
- mélanger doucement, boucher les tubes et les porter à l'étuve à 37°C pendant 1 heure
- centrifuger tous les tubes 2 mn à 2000 tours par minute.

▪ Lecture

○ Lecture directe

Faire la lecture de la gamme de gauche à droite en partant des solutions les moins hypotoniques. Observer :

- dans les premiers tubes, le surnageant est incolore, les hématies sont intactes et forment un culot rouge au fond du tube : il n'y a pas d'hémolyse
- à partir d'un certain tube, le surnageant devient jaune, quelques hématies ont été lysées et ont libéré leur hémoglobine : il y a hémolyse partielle ; dans les tubes suivants, le culot globulaire diminue de plus en plus et la couleur du surnageant s'accroît
- à partir d'un certain tube, le culot globulaire a disparu, toutes les hématies sont détruites, l'hémolyse est totale : il reste un petit culot blanchâtre composé de restes membranaires.

Noter les concentrations en NaCl des solutions des 2 tubes :

- Hi ou hémolyse initiale : premier tube où le surnageant est jaune
- Ht ou hémolyse totale : premier tube où le culot globulaire a disparu.

○ Lecture au spectrophotomètre

Compléter la lecture en mesurant l'absorbance de chaque surnageant à 540 nm afin de doser la quantité d'hémoglobine libérée. L'absorbance du surnageant du premier tube de la gamme correspondra à 0% d'hémolyse et l'absorbance du surnageant du dernier tube correspondra à 100% d'hémolyse.

Tracer la courbe % d'hémolyse = f (concentration en NaCl)

Déterminer la valeur de la concentration en NaCl correspondant à 50% d'hémolyse (H50%)

▪ Résultats

○ Lecture directe

Les valeurs normales sont les suivantes :

Valeurs normales de la RGO

	<b>Sang total</b>	<b>Hématies déplasmatisées</b>
Hi	4,4 à 4,6 g/L	4,8g/L
Ht	3,4g/L	3,6g/L

○ Lecture au spectrophotomètre

La valeur normale moyenne H50 % est de 3,8 à 4,2g/L

- Interprétation
- pour des valeurs obtenues supérieures à la normale, la RGO est diminuée, les hématies sont plus fragiles.
- Pour des valeurs obtenues inférieures à la normale, la RGO est augmentée, les hématies sont plus résistantes

#### *b) Adénogramme*

- Principe

C'est l'étude cytologique du suc ganglionnaire après ponction à l'aiguille fine. L'adénogramme permet un diagnostic d'orientation des proliférations lymphoïdes, qu'elles soient bénignes ou malignes.

- Matériel
- aiguille fine (23 G de préférence) et seringue
- lames
- coton
- alcool

- Technique

- la peau non anesthésiée et désinfectée est étirée
- introduire l'aiguille (de type intramusculaire) montée sur une seringue avec un piston bien mobile, dans le ganglion
- le tissu ganglionnaire est alors aspiré en faisant varier plusieurs fois l'orientation de l'aiguille (en maintenant toujours l'aspiration)
- le contenu de la seringue est ensuite chassé sur la lame
- on confectionne des frottis qui seront colorés au MGG

NB : Le suc ganglionnaire sera d'autant moins mêlé de sang et donc facile à analyser que l'on évitera d'aspirer. La meilleure technique consiste à laisser un peu de suc cellulaire remonter dans l'aiguille en massant fermement le ganglion, puis à chasser ce suc sur une lame et à procéder à l'étalement.

#### *c) Myélogramme*

- Principe

C'est l'étude cytologique de la moelle osseuse.

- Sites de la ponction

La moelle osseuse rouge est essentiellement située dans les épiphyses des os longs et dans les os plats. Le site de ponction préférentiel chez l'adulte est le sternum et l'épine iliaque chez l'enfant. Chez le nourrisson, il faut préférer l'épine iliaque ou la tubérosité tibiale antérieure.

- **Matériel**

La ponction est réalisée à l'aide d'un trocart : le trocart de Mallarmé qui est composé de 2 éléments distincts :

- une aiguille creuse, à l'extrémité inférieure effilée. Sa partie supérieure est composée de 2 branches perpendiculaires à l'axe de l'aiguille, branches permettant une bonne prise en main par l'opérateur ;
- un mandrin à l'extrémité supérieure aplatie afin de pouvoir exercer une pression suffisante. Le mandrin traverse l'aiguille creuse.

Aiguille et mandrin doivent avoir une extrémité pointue, tranchante et non émoussée.

- **Prélèvement**

Au site de la ponction :

- la peau est soigneusement désinfectée
- le trocart tenu fermement par l'opérateur, est enfoncé perpendiculairement à la peau et à la surface osseuse avec un mouvement de rotation jusqu'à ce que l'on franchisse la corticale osseuse
- après pénétration, le mandrin est retiré et remplacé par une seringue qui aspire de la substance médullaire (volume prélevé est inférieur à 0,5cc)
- enlever la seringue et replacer le mandrin
- le contenu de la seringue est déposé directement sur la lame pour un frottis médullaire réalisé de la même façon qu'un frottis sanguin

NB : si la première aspiration a ramené du matériel, l'aiguille peut être retirée et un pansement légèrement compressif est appliqué au point de ponction.

- **Coloration**

Les frottis confectionnés sont séchés à l'air et colorés au May Grunwald Giemsa mais éventuellement avec des colorants cytochimiques.

- **Lecture**

Elle se fera d'abord au faible grossissement pour apprécier la richesse cellulaire puis au fort grossissement pour l'étude des différentes lignées.

### **3.2.2. Hémostase**

L'exploration de la coagulation doit se faire sur des prélèvements avec comme anticoagulant le citrate trisodique à raison d'un volume d'anticoagulant pour 9 volumes de sang.

Les tests doivent être réalisés dans les 4 heures qui suivent le prélèvement.

Les outils du contrôle de qualité reposent sur deux types d'échantillons biologiques :

- des pools de plasmas normaux ou anormaux préparés localement et aliquotés
- des plasmas lyophilisés préparés industriellement par différentes firmes pharmaceutiques qui sont soit des plasmas étalons ou standards de calibration ou alors des plasmas de « contrôle » ayant une valeur moyenne et un intervalle de confiance déterminée selon la technique utilisée.

Ces différents échantillons sont utilisés pour le contrôle de qualité journalier qui permet la validation quotidienne des résultats. Il est préférable de passer ces contrôles en début et en cours de série et de mentionner les résultats sur un graphe. L'ensemble des procédures de contrôle de qualité interne doit être clairement décrit dans un cahier technique qui doit être régulièrement mis à jour. Le contrôle de qualité

interne doit aussi vérifier les étapes pré analytiques (prélèvements) et post analytiques (validation, rendu et archivage des résultats).

#### *a) Temps de saignement*

##### ▪ Principe

C'est un test global qui explore l'hémostase primaire dans son ensemble (l'adhésion, l'agrégation et le facteur Willebrand)

.Il est réalisé in vivo et mesure la durée de l'hémorragie provoquée par une incision de la couche superficielle de la peau des les conditions normalisées.

Nous décrirons la méthode d'Ivy 3 points qui est la méthode de référence.

##### ▪ Matériel

- tensiomètre
- vaccinostyle stérile
- papier buvard
- éther
- chronomètre

##### ▪ Technique

- Placer le brassard à tension au bras gonflé à 40 mm Hg, pression qui sera maintenue constante toute la durée du test,
- désinfecter la peau de l'avant bras avec l'éther (l'alcool entraîne une vasodilatation), laisser sécher,
- réaliser 3 piqûres distantes de 2 cm chacune au niveau de l'avant bras à l'aide du vaccinostyle
- déclencher immédiatement le chronomètre,
- l'excès de sang est épongé délicatement toutes les 30 secondes à l'aide du papier buvard (éviter de toucher et de frotter les berges des points de piqûre) ;
- noter le temps au bout duquel le saignement s'arrête au niveau de chaque point de piqûre et faire la moyenne

##### ▪ Résultats

La valeur normale chez l'adulte doit être inférieure à 5 mn.

#### *b) Temps de Quick (Taux de prothrombine et INR)*

##### ▪ Principe

C'est le temps de coagulation d'un plasma citraté, pauvre en plaquettes recalcifié en présence de thromboplastine tissulaire. Le TQ explore la voie extrinsèque de la coagulation.

- Matériel et réactifs
      - Matériel (commun pour les autres tests d'hémostase)
        - Billes magnétiques
        - Barrettes
        - Plasma Citrate
        - Micropipette
        - Coagulomètre au moins semi automatique (type ST *art*)
        - Embouts
      - Réactif
        - Thromboplastine calcique (réactif déclenchant)
    - Technique
      - déposer les barrettes dans la zone d'incubation
      - distribuer une bille dans chaque cupule
      - mettre 50µL de plasma citraté dans chaque cupule
      - incuber pendant 1mn
      - transférer dans la zone de lecture
      - déclencher la coagulation en distribuant 100µL de thromboplastine calcique (préincubée à 37°C) dans chaque cupule

*Le temps de coagulation se mesure par l'arrêt du mouvement de billes*

- Résultats
      - Expression en pourcentage d'activité prothrombinique

En pratique courante, le temps de Quick (TQ) est converti en taux de prothrombine (TP) exprimé en pourcentage. La conversion du TQ en TP se fait à l'aide d'une droite d'étalonnage ou droite de « Thivolle », établie à partir de plasmas normaux testés en dilution.

Les valeurs moyennes normales sont comprises entre 70 et 100%.

- Expression des résultats lors des traitements aux antivitamines K (AVK)

Pour la surveillance des traitements aux AVK le pourcentage utilisé dans l'expression du TQ ne convient pas, car les thromboplastines commerciales utilisées ont une sensibilité inégale aux AVK. Le rapport international normalisé (ou International Normalized Ratio : INR) est un nombre sans dimension, égal au rapport entre le TQ du malade (TQm) et le TQ du témoin (TQt), rapport élevé à l'index international de sensibilité (ou International Sensitivity Index : ISI).

L'ISI est déterminé pour chaque thromboplastine commerciale par rapport à une préparation de référence. Il est fourni par le fabricant à chaque utilisateur.

$$INR = (TQm / TQt)^{ISI}$$

Les valeurs exprimées en terme d'INR définissent deux niveaux d'anticoagulation :

- anticoagulation faible : INR= 1,5 à 3
- anticoagulation élevée : INR= 3 à 5

Un INR supérieur à 5 est associé à un risque hémorragique excessif

### c) Temps de céphaline activée (TCA)

#### ▪ Principe

C'est le temps de coagulation d'un plasma citraté, pauvre en plaquettes, recalifié à 37°C en présence de substitut plaquettaire (céphaline) et d'un activateur (kaolin, silice ou acide ellagique) standardisant l'activation des facteurs contacts et en présence de calcium.

Le TCA explore la voie endogène de la coagulation ainsi que la voie commune. Seul le facteur VII n'interfère pas sur ce test.

#### ▪ Réactifs

- réactif céphaline activateur
- solution de CaCl<sub>2</sub>

#### ▪ Technique

- placer les barrettes dans la zone d'incubation
- mettre une bille dans chaque cupule
- ajouter 50µL de plasma citraté et 50µL de céphaline activateur
- incuber pendant 3mn
- transférer la barrette en zone de lecture
- déclencher la coagulation en ajoutant 50µL de solution de CaCl<sub>2</sub>

*Le temps de coagulation se mesure par l'arrêt du mouvement de billes*

#### ▪ Résultats

Ils sont exprimés en secondes et varient entre 20 et 40 secondes selon le réactif utilisé.

Est considéré comme pathologique un écart supérieur à 8 secondes par rapport au contrôle.

Chez les enfants de moins de 5 ans, le TCA est souvent à la limite supérieure des valeurs normales voire légèrement allongé, sans anomalies associées.

NB : Si le TCA d'un patient est allongé, on réalise un TCA sur le mélange à volume égal du plasma du malade et du plasma du témoin :

- une correction du TCA indique un déficit en un ou plusieurs facteurs de la voie intrinsèque
- une non correction du TCA indique la présence d'anticoagulants circulants.

### d) Temps de thrombine

#### ▪ Principe

C'est le temps de coagulation d'un plasma citraté pauvre en plaquettes, recalifié à 37°C en présence d'une quantité déterminée de thrombine, quantité choisie de façon à entraîner la coagulation en 20 secondes d'un plasma témoin.

Le temps de thrombine explore la fibrinoformation.

#### ▪ Matériel

Solution de thrombine calcique.

- Technique

- mettre 100µL de plasma dans les barrettes placées en zone d'incubation et contenant des billes
- incuber 2 mn
- déclencher la coagulation en ajoutant 100µL de solution de thrombine calcique

- Résultats

Un temps de thrombine est généralement inférieur à 22 s. Tout écart supérieur ou égal à 5s entre le temps de thrombine du plasma à tester et le temps de trombine du plasma témoin est considéré comme significatif.

*e) Dosage du fibrinogène par méthode chronométrique (Clauss)*

- Principe

Le temps de coagulation d'un plasma citraté pauvre en plaquettes, dilué dans des proportions adéquates, mis en présence d'un excès de thrombine à 37°C et en optimum calcique, est directement fonction du taux de fibrinogène fonctionnel plasmatique.

- Réactifs

- solution de thrombine contenant un inhibiteur spécifique de l'héparine permettant le dosage du fibrinogène sur le plasma des patients traités par cet anticoagulant.
- Tampon pH 7,35 permettant la dilution du plasma (tampon Owren-Koller)

- Technique

- réaliser une dilution du plasma au 1/20 avec le tampon
- mettre 100µL de la dilution dans les cupules placées en zone d'incubation et contenant des billes
- incuber 1mn
- Transférer la barrette en zone de mesure et déclencher la coagulation en ajoutant 50µL de solution de thrombine calcique.

- Résultats

Le taux de fibrinogène normal est compris entre 2 et 4 g/L (le temps de coagulation mesuré est compris entre 8 et 20 secondes.

*f) Dosage des D-Dimères*

- Principe

Les D-Dimères sont des structures spécifiques des produits de dégradation de la fibrine. Ils sont mis en évidence directement dans le plasma citraté par une réaction d'agglutination passive utilisant des particules de latex sensibilisées avec un anticorps monoclonal anti D-Dimères ne réagissant pas avec le fibrinogène. Les particules de latex sont sensibilisées de telle sorte que l'on observe une agglutination à partir d'une concentration plasmatique des D-Dimères égale ou supérieure à 500ng/mL.

- Réactifs

- suspension de latex sensibilisée avec des anticorps anti D-Dimères
- plasma contrôle positif
- plasma contrôle négatif
- solution tampon pH 8,2



- Technique

- Protocole qualitatif
  - sur une carte, déposer

50 µL de contrôle positif      50 µL de plasma à tester      50 µL de contrôle négatif

- ajouter à coté de chaque dépôt, une goutte de suspension de latex homogénéisé
  - mélanger avec un agitateur
  - imprimer à la plaque un mouvement rotatoire pendant 2 mn et observer l'apparition éventuelle d'agglutination
  - valider impérativement les témoins
- Protocole semi quantitatif
    - diluer l'échantillon de 1/2 en 1/2 dans le tampon 8,2
    - procéder pour chaque dilution comme pour le test qualitatif

- Résultats

La réaction est positive lorsqu'on observe une agglutination

Le seuil de sensibilité de la technique étant de 500µL, une agglutination indique une concentration de D-Dimères égale ou supérieure à 500ng/MI dans la dilution correspondante : la concentration plasmatique en D-Dimères est donc estimée en multipliant cette valeur par l'inverse de la dernière dilution donnant une agglutination.

- Interprétation

Les valeurs physiologiques en D-Dimères sont inférieures à 500ng/mL

Des valeurs supérieures traduisent une activation de la fibrinolyse consécutive à une activation anormale de la coagulation.

NB : Il existe une méthode immuno-enzymatique plus sensible mais plus longue dans sa réalisation.

*g) Dosage de l'activité des facteurs de la coagulation*

Le dosage consiste à mesurer le temps de coagulation d'un plasma contenant tous les facteurs de coagulation à l'exception du facteur à doser, celui ci étant apporté par le plasma à étudier, convenablement dilué.

Le système test utilisé doit être sensible au facteur à mesurer : temps de Quick pour les facteurs II + X, V et VII, temps de céphaline activée pour les facteurs VIII, IX, XI, XII et contacts.

*h) Dosage du facteur Willebrand*

Il s'agit d'apprécier l'activité biologique d'agrégation plaquettaire du facteur Willebrand en présence d'un inducteur qui est la Ristocétine. La vitesse d'agrégation des plaquettes est proportionnelle au taux de facteur Willebrand contenu dans le plasma. Cette vitesse est mesurée par un agrégomètre ou un automate d'hémostase.

En ce qui concerne le facteur Willebrand 3 entités peuvent être dosées :

- Mesure de l'activité CoFacteur de la Ristocétine : peut être réalisée par une technique d'agglutination sur lame (test semi quantitatif) ou une technique d'agrégation de plaquettes lavées en présence de plasma et de Ristocétine

Le taux normal est compris entre 50 et 150%

- Mesure du Facteur Willebrand Antigène (vWAg) : ce facteur peut être dosé par des méthodes immunologiques à l'aide d'antisérum hétérologue par électro-immuno-diffusion (Laurell), immuno-enzymologie (ELISA), ou radio-immunologie.
- Mesure du Facteur VIIIc

*i) Dosage des protéines S, C et de l'antithrombine*

Les protéines S, C et l'antithrombine sont les inhibiteurs physiologiques de la coagulation. Leur mesure repose sur des techniques chronométriques ou immunologiques (*en centre spécialisé uniquement*).

*j) Détermination des anticorps anti phospholipides (LA et APA)*

Les anti phospholipides de type lupus anticoagulant (LA) sont dépistés devant un allongement d'un temps de la coagulation non corrigé par l'adjonction d'un plasma normal.

Le principe des tests spécifiques d'identification de cet anticoagulant circulant est basé, soit sur des tests de potentialisation en diluant la céphaline ou la thromboplastine, soit sur des tests de neutralisation en apportant un excès de phospholipides.

Les antiphospholipides de type anticardioline (APA) ne perturbent pas les tests de coagulation. Leur diagnostic est réalisé par des tests immunologiques (Elisa ou radio-immunologie).

### **3.2.3. Immuno-hématologie et transfusion sanguine**

Les prélèvements peuvent être réalisés soit sur tube sec soit sur tube avec anticoagulant.

Le contrôle de qualité interne repose sur l'analyse quotidienne d'échantillons de contrôle effectuée dans les mêmes conditions que celles appliquées aux échantillons biologiques.

*a) Groupage sanguin dans les systèmes ABO*

▪ Principe

Le groupage sanguin dans le système ABO repose sur deux épreuves réalisées simultanément et complémentaires, toutes deux étant des réactions d'agglutination directe :

- épreuve de Beth Vincent (ou épreuve globulaire) : les hématies à tester sont mises en contact avec des anticorps sériques connus afin d'identifier les allo-antigènes de ces hématies.
- épreuve de Simonin (ou épreuve sérique) : des hématies tests, dont les allo-antigènes du système ABO (H) sont connus, sont mises en contact avec le sérum à tester afin d'identifier les anticorps du système ABO(H) présents dans ce sérum

▪ Réactifs

○ Sérums tests

- sérum-test anti-A
- sérum-test anti-B
- sérum-test anti-AB

○ Hématies tests

Ce sont des hématies humaines prélevées sur une solution anticoagulante et conservatrice, lavées 3 fois en sérum physiologique, puis remises en suspension dans cette solution.

Sont utilisées :

- des hématies-tests A
- des hématies tests B
- des hématies tests O

NB : les hématies tests doivent être préparées quotidiennement au laboratoire.

- Les diverses techniques

Elles doivent toujours être réalisées:

- deux fois
- par deux manipulateurs différents

Elles sont variées :

- technique en plaque
- technique en tube à hémolyse
- technique en microplaque (technique manuelle ou automatisée)
- technique en gel (technique manuelle ou automatisée)

### **Technique en plaque : technique classique manuelle**

- ✓ Epreuve globulaire directe de Beth Vincent

Sur une plaque :

- déposer dans l'ordre : - une goutte de sérum test anti-A
  - une goutte de sérum test anti-B
  - une goutte de sérum test anti-AB
- ajouter à côté de chaque goutte de sérum test, une goutte de culot d'hématies à tester (une petite goutte ou des hématies diluées)
- mélanger soigneusement les deux gouttes puis animer la plaque d'un mouvement rotatoire lent
- observer au bout d'une minute et rechercher s'il y a ou non agglutination

NB : il est important qu'il n'y ait pas trop d'hématies risquant d'empêcher l'observation correcte des agglutinations.

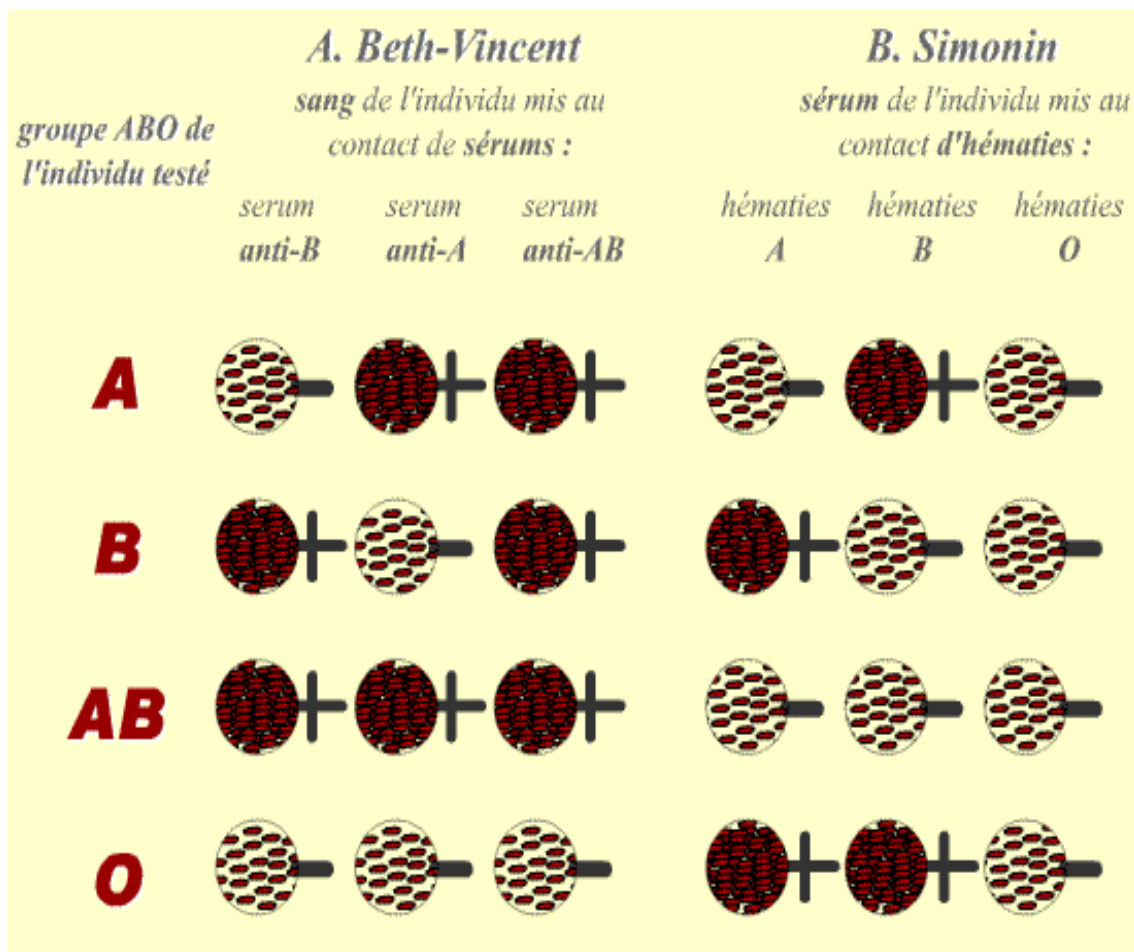
- ✓ Epreuve sérique indirecte de Simonin

Sur une plaque :

- déposer dans l'ordre : - une goutte de suspension d'hématies-tests A
  - une goutte de suspension d'hématies-tests B
- ajouter à côté de chaque goutte deux gouttes de culot du sérum à tester (une petite goutte ou des hématies diluées)
- mélanger soigneusement les deux gouttes puis animer la plaque d'un mouvement rotatoire lent
- observer au bout d'une minute et rechercher s'il y a ou non agglutination

	Groupe A	Groupe B	Groupe AB	Groupe O
Globule Rouge				
Anticorps	 Anti-B	 Anti-A	Aucun	 Anti-A et Anti-B
Antigène	Antigène A	Antigène B	Antigène A et B	Pas d'antigène

### Les différents groupes sanguins



### Epreuves de Beth Vincent et de Simonin

✓ Les témoins

Les épreuves de Simonin et de Beth Vincent doivent être obligatoirement validées par des témoins :

■ Témoin «AB» : mélanger une goutte de sérum AB et une goutte de culot d'hématies à tester.

Ce témoin ne doit pas présenter d'agglutination. Il permet de s'assurer que les hématies testées ne sont pas agglutinées par des anticorps sériques autres que les Ac anti-A ou anti-B. La présence d'agglutination signifie une poly agglutinabilité

Le témoin AB permet de contrôler l'épreuve de Beth Vincent.

■ Témoin « allo » : mélanger une goutte de sérum à tester et une goutte de culot d'hématies tests O.

Ce témoin ne doit pas présenter d'agglutination. Il permet de s'assurer qu'il n'y a pas dans le sérum à tester, d'Ac susceptibles de réagir avec des structures érythrocytaires autres que les Ag A et B.

La présence d'agglutination attesterait de la présence d'allo Ac en dehors du système ABO.

Le témoin allo permet donc de contrôler l'épreuve de Simonin.

■ Témoin « auto » : mélanger une goutte de sérum à tester et une goutte de culot d'hématies à tester

Ce témoin, réalisé à partir des hématies et du sérum du sujet ne doit pas présenter d'agglutination. Il permet de s'assurer que dans le sérum du sujet, il n'y a pas d'auto-anticorps dirigés contre des structures de membrane des hématies et que les hématies ne sont pas auto-agglutinables.

Il permet donc le contrôle des agglutinations observées dans les deux épreuves.

▪ Quelques causes d'erreurs

- Erreurs de manipulation : - erreurs d'étiquetage des échantillons  
- existence d'homonymes  
- technicité défailante

- Erreurs sérologiques :
  - agglutination faible ou incomplète
  - double population d'hématies (après une transfusion hétérogroupe ou incompatible)
  - altérations des érythrocytes : on observe une positivité dans tous les tests sériques.

a) *le Phénotypage Rhésus*

▪ Principe

C'est la recherche à la surface des hématies testées des allo Ag courants du système Rhésus, l'Ag D, l'Ag C, l'Ag E, l'Ag c et l'Ag e, en mettant en contact ces hématies avec des Ac spécifiques connus :

- anti-D
- anti-C
- anti-c
- anti-E
- anti-e

▪ Réactifs nécessaires

- sérum-test anti-D d'origine humaine ou monoclonale
- sérum-test anti-E d'origine humaine ou monoclonale
- sérum-test anti-e d'origine humaine ou monoclonale
- sérum-test anti-C d'origine humaine ou monoclonale
- sérum-test anti-c d'origine humaine ou monoclonale

- Technique sur plaque chauffée à 40°C
  - Mode opératoire
- prélever dans un mélange constitué du même volume de culot globulaire et de plasma
- délimiter sur la plaque chauffante d'un microscope, huit espaces séparés les uns des autres de 2 à 3 cm
- au niveau de chaque espace, réaliser rapidement les dépôts comme indiqués ci-dessous

### Technique du phénotypage Rhésus

1	2	3	4	5	6	7	8
1 goutte de sang à tester	1 goutte hématies O Rhésus+	1 goutte hématies O rhésus –	1 goutte de sang à tester	1 goutte de sang à tester	1 goutte de sang à tester	1 goutte de sang à tester	1 goutte de sang à tester
+	+	+	+	+	+	+	+
1 goutte de sérum témoin albumineux	1 goutte de sérum test anti-D	1 goutte de sérum test anti-D	1 goutte de sérum test anti-D	1 goutte de sérum test anti-C	1 goutte de sérum test anti-c	1 goutte de sérum test anti-E	1 goutte de sérum test anti-e

- mélanger sans délai, à laide d'un agitateur bien propre
- agiter en inclinant doucement la plaque sur le rhésuscope par des mouvements lents de balancier, pendant 1 à 3 secondes
- observer tout d'abord les témoins (dépôts 1, 2 et 3). Si les résultats attendus sont observés, lire alors les essais et conclure.

- Résultats attendus pour les témoins

<b>1 : témoin réactif</b>	<b>2 : témoin positif</b>	<b>3 : témoin négatif</b>
Il ne doit pas présenter d'agglutination. Une image d'agglutination peut être due : - à une auto-agglutination des hématies testées en raison d'une altération membranaire ou de la présence d'auto-Ac dans le sérum - à une formation de rouleaux d'hématies dus à la BSA et pouvant être confondus avec des agglutinants	Il doit présenter une agglutination. Il permet de tester l'efficacité du sérum anti-D en milieu albumineux en s'assurant que dans ces conditions, les Ac anti-D agglutinent bien les hématies porteuses d'Ag D.	Il ne doit pas présenter d'agglutination. Il permet de vérifier : - la spécificité des Ac anti-D en vérifiant qu'ils ne donnent pas de réactions croisées avec d'autres Ag - la non formation de rouleaux d'hématies par le sérum anti-D.

- Lecture des essais
- présence d'agglutination : les hématies du sang testé portent à leur surface l'Ag spécifique des Ac utilisées
- absence d'agglutination : les hématies du sang testé ne portent pas à leur surface l'Ag spécifique des Ac utilisés.

**NB : En laboratoire, il est usuel de réaliser simultanément le groupage ABO et le phénotypage Rhésus**

*a) Recherche de l'Ag D faible (par le test de Coombs indirect)*

▪ Principe

Il consiste à vérifier si les hématies possèdent l'Ag D faible (lorsqu'elles se sont avérées sans Ag D avec le test précédent), en utilisant des Ac anti-D lors d'une réaction d'agglutination active indirecte (artificielle) utilisant comme artifice des antiglobulines.

L'antigène D faible se recherche d'abord par 1 préchauffage des hématies à l'aide d'un rhésuscope afin de mieux mettre à nu les épitopes de l'antigène.

▪ Réactifs nécessaires

- sérum test anti-D
- hématies O Rhésus standard +
- hématies O Rhésus standard -
- sérum antiglobuline humaine
- sérum albumineux sans Ac anti-D

▪ Technique

- \* dans un tube à hémolyse, mettre 1ml de sang à tester
- \* laver les érythrocytes à tester en sérum physiologique et préparer, à partir de ces érythrocytes, une suspension à 5% dans du sérum physiologique
- \* prendre 4 tubes à hémolyse et introduire dans les tubes 2, 3, et 4 : 100 µL de sérum anti D et dans le tube 1 : 100 µL de sérum albumineux témoin sans anti-D
- \* ajouter :
  - en 1 : 50 µL d'érythrocytes à examiner
  - en 2 : 50 µL d'érythrocytes O Rh standard +
  - en 3 : 50 µL d'érythrocytes O Rh standard -
  - en 4 : 50 µL d'érythrocytes à examiner
- \* incuber les 4 tubes au bain marie pendant 45mn
- \* laver 3 fois la pastille globulaire en eau physiologique de la façon suivante :
  - remettre les hématies en suspension dans l'eau physiologique, centrifuger 1 mn à 750 g
  - la même opération est répétée 3 fois
    - après le dernier lavage, la totalité du surnageant doit être bien éliminée
- \* ajouter 100 µL de sérum antiglobuline
- \* agiter doucement pour remettre les érythrocytes en suspension
- \* centrifuger 1 mn à 400 g
- \* faire la lecture après agitation douce

- Interprétation des résultats

- Premier cas

L'agglutination n'est observée que dans le tube 2 : cela signifie que les érythrocytes testés ne possèdent pas d'Ag D faible. Le sujet est donc Rh standard –

- Deuxième cas

L'agglutination n'est observée que dans les tubes 2 et 4 : cela signifie que les érythrocytes testés possèdent l'Ag D faible. Le sujet est donc D faible.

- Troisième cas

Les tubes 1, 2 et 4 présentent une agglutination :

- l'agglutination du tube 2 est normale
- l'agglutination dans le tube 1 témoigne de la présence d'auto-Ac sur les érythrocytes ou de formation de rouleaux en présence de BSA. Le résultat positif dans le tube 4 ne peut être validé.

- Quatrième cas

Aucune agglutination n'est observée dans le tube 2 (ni dans aucun des 3 autres tubes), il s'agit d'une erreur ou de mauvais réactifs notamment le sérum anti D. il faut donc recommencer.

*b) Phénotypage étendu*

Il consiste à rechercher un ou plusieurs antigènes érythrocytaires autres que ceux qui sont définis par le groupage ABO-D et le phénotypage Rhésus.

Pour un système donné, la recherche de chaque antigène est basée sur l'utilisation de l'anticorps monoclonal spécifique et du témoin adéquat.

Le contrôle de qualité interne doit utiliser deux échantillons de contrôle de phénotypes garantis, l'un étant négatif, et l'autre d'expression « hétérozygote ».

*c) Test de Coombs direct*

- Principe

Le test direct à l'antiglobuline ou test de Coombs direct permet la mise en évidence de la sensibilisation in vivo des hématies humaines par des anticorps de nature Ig G et/ou des fractions du complément. Ce test doit être réalisé sur un échantillon de préférence anti coagulé.

Il repose sur l'utilisation d'antiglobuline humaine polyspécifique ou monospécifique.

Le contrôle de qualité utilise des hématies préalablement sensibilisées par une antiglobuline in vitro par des Ig G et éventuellement du complément.

- Technique

- Laver les hématies à tester 3 fois
- Diluer les hématies lavées à 5%
- Mettre dans un tube à hémolyse 1 goutte de la dilution
- Ajouter une goutte d'antiglobuline
- Centrifuger 1 mn à 1000 tr/mn



- Lecture : - si présence d'agglutination : CD Positif
- si absence d'agglutination: CD Négatif

#### d) *Test de Coombs indirect*

- Principe

Ce test met en présence le sérum à tester dans lequel on recherche des anticorps libres, avec des hématies comportant des sites antigéniques spécifiques de ces anticorps. Le test est positif lorsqu'il existe une agglutination des hématies en présence d'une antiglobuline.

- Technique

- Faire un panel O+
- Diluer le pannel à 5%
- Mettre dans un tube à hémolyse 1 goutte de la dilution
- Ajouter 3 gouttes de sérum à tester
- Incuber 45 mn au bain marie préchauffé à 37°C
- Après incubation lire une première fois
- S'il n'y a pas d'agglutination faire 3 lavages à l'eau physiologique
- Bien égoutter l'eau du troisième lavage
- Ajouter une goutte d'antiglobuline
- Centrifuger une minute à 1000 tr/mn
- Remettre doucement les hématies en suspension,
- Agiter et incliner pour déceler la présence d'agglutination ou observer au microscope x 40 (entre lame et lamelle)

- Lecture

- Si présence d'agglutination : CI + = Présence d'anticorps dans le sérum
- Si agglutination absente : CI - = Absence d'anticorps dans le sérum

#### e) *Recherche des agglutinines irrégulières (RAI)*

- Principe de la recherche de l'agglutination par le test de Coombs indirect

On recherche dans un sérum des Ac irréguliers en incubant le sérum en présence d'hématies porteuses des Ag spécifiques. Les anticorps, s'ils sont présents, s'unissent aux Ag : on obtient des hématies sensibilisées, mais souvent sans provoquer une agglutination, en raison :

- des forces de répulsion électrostatiques importantes entre hématies voisines
- du caractère masqué, peu accessible de certains antigènes

Provoquer l'agglutination en réalisant un pontage spécifique entre Ac unis à des hématies voisines grâce à des antiglobulines spécifiques des épitopes des Ig humaines.

Il s'agit donc d'une réaction d'agglutination active indirecte.

NB : D'autres tests peuvent être utilisés, il s'agit de :

- la recherche de l'agglutination par le test aux enzymes
- la recherche de l'agglutination en milieu salin (ne détecte que les Ac irréguliers complets)
- Technique en tubes à usage unique

Le sang examiné doit être, de préférence, prélevé sur tube sec, les agglutinines sont alors recherchées sur le sérum.

- réaliser un pannel O+
- laver les hématies 3 fois à l'eau physiologique (le surnageant du dernier lavage doit être complètement éliminé)
- remettre les hématies en suspension dans l'eau physiologique (dilution à 3%)
- Prendre 3 tubes à hémolyse, déposer dans chaque tube, 1 goutte de la dilution et 3 gouttes de sérum à tester
- Incuber le tube 1 à 37°, le tube 2 à 25° (température ambiante) et le tube 3 à 4° pendant 45 mn
- Faire une première lecture en agitant le tube tout doucement
- Si le test est négatif, faire trois lavages à l'eau physiologique (le surnageant du dernier lavage doit être complètement éliminé)
- Dans chaque tube mettre une goutte d'antiglobuline
- Centrifuger 1 mn à 1000 tours/mn

▪ Lecture

- S'il y a présence d'agglutination dans l'un des 3 tubes la RAI est positive et il faut spécifier la température
- S'il n'y a pas d'agglutination, la RAI est négative

*NB : les échantillons positifs doivent faire l'objet d'une seconde étape d'identification qui utilise au moins 10 hématies tests de groupe O qui doivent porter séparément différents antigènes (les différents Ag du système rhésus, Ag Kell, Kidd, Duffy, MNS, Lewis, Lutheran...)*

Le contrôle de qualité interne utilise des échantillons de contrôle comportant des anticorps de spécificité et de titre connus et sur des hématies comportant l'antigène correspondant d'expression « hétérozygote ».

*h) Test de compatibilité au laboratoire entre poche de sang et receveur*

C'est une analyse qui consiste à tester l'échantillon de sérum ou de plasma du receveur vis-à-vis des hématies de la tubulure du produit sanguin à transfuser.

Ce test comporte la sélection des unités de sang à transfuser en respectant les bonnes règles de distribution, puis à préparer des hématies de la tubulure afin qu'elles puissent être testées dans les mêmes conditions techniques que la RAI, et enfin à l'exécution technique du test qui est identique à celle utilisée par la RAI. Le contrôle de qualité interne doit utiliser des échantillons identiques à ceux utilisés pour la RAI.

## 3.3. PARASITOLOGIE

### 3.3.1. Examen parasitologique des selles :

#### a) Prélèvement :

Emettre au laboratoire la totalité des selles dans un récipient adapté à l'usage, étanche et résistant. Les techniques d'analyse demandent un minimum de matières fécales et certains éléments parasitaires sont faiblement représentés dans les selles.

Lorsque l'émission au laboratoire est impossible, l'acheminement de l'échantillon doit être immédiat.

#### b) Examen macroscopique :

Il renseigne sur l'état de la selle (diarrhée / constipation), sur la présence d'anneaux de taenia, d'adultes d'helminthes.

#### c) Examen microscopique à frais :

Il est fait à partir d'un frottis de selles étalées dans une goutte d'eau. La totalité de la préparation doit être examinée au grossissement 10 puis au 40.

Il permet de mettre en évidence : des flagellés ou des amibes mobiles, des kystes, des œufs et larves d'Helminthes intestinaux.

#### d) Examen microscopique après coloration

La coloration de lugol ou du M.I.F précisent certains éléments morphologiques des protozoaires intestinaux.

##### \* Coloration au lugol (solution iodo iodurée à 1%)

- déposer une goutte de selles liquides (ou rendues liquides avec de l'eau physiologique) ;
- ajouter une goutte de lugol sur la préparation et mélanger avant de recouvrir d'une lamelle.

Le lugol colore en jaune les kystes et en brun foncé les vacuoles intra cytoplasmiques.

Le noyau, les cristalloïdes et la membrane cytoplasmique apparaissent par réfringence.

Le lugol détruit les formes végétatives de trichomonas intestinalis

##### \* Coloration au MIF (Mercuriothiolate-Iodo-Formol)

- Le mélange MIF est préparé au moment de l'emploi de la manière suivante : dans un tube à hémolyse, mettre 0,15 ml de solution iodo iodurée à 5% puis 2,35 ml de solution mère MF et mélanger par retournement du tube

- Ajouter au mélange ainsi réalisé une parcelle de selles, homogénéiser à l'aide d'un agitateur. - Laisser sédimenter 30 min puis recueillir avec une pipette Pasteur, la partie supérieure du culot où sont rassemblés les parasites.

Le MIF colore en rouge le cytoplasme, la membrane nucléaire et le caryosome des protozoaires. La chromatine non colorée apparaît par réfringence. Les kystes murs apparaissent en blanc sur fond rosé de la préparation.

#### e) Examen microscopique après la concentration de Ritchie modifié :

Diluer une noix de selles dans de l'eau formolée à 10%. Après avoir tamisé, transvaser 9 ml dans un tube conique et ajouter 3 ml d'éther. Agiter et centrifuger 1 mn à 1000 tours/ mn. Rejeter le surnageant, prélever et examiner le culot.

### **3.3.2. Recherche des Plasmodies**

#### *a) Prélèvement :*

Le sang est recueilli au bout du doigt ou au niveau du talon s'il s'agit d'un bébé après piqûre à l'aide d'un vaccinostyle.

#### *b) Confection :*

/Frottis :

Placer à une extrémité d'une lame une petite goutte de sang. Sans attendre que le sang sèche, appliquer sur la lame à côté de la goutte, entre elle et le centre de la lame, l'arête d'une lame rodée. Former environ 45° du côté de la goutte. Reculer la lame jusqu'à ce qu'elle touche la goutte. Par capillarité, celle-ci s'étale le long du dièdre. Par un mouvement uniforme, sans excessive rapidité, faire parcourir au dièdre la surface de la lame. Ne pas quitter le contact de la lame avant la fin de l'étalement. Agiter la lame pour obtenir un séchage rapide. Colorer.

/Goutte épaisse :

Placer au centre de la lame une goutte de sang. Défibrer le sang en tournant à l'aide du coin d'une autre lame ou d'un vaccinostyle et étendre la surface de la goutte en raclant la surface de la lame (1-2 mn). Laisser sécher 2 h au minimum (étuve à 37°) à l'abri de la poussière et des mouches. Déshémoglobiner avec quelques gouttes d'eau jusqu'à lyse totale des hématies. Egoutter, sécher, colorer.

#### *c) Coloration :*

/Frottis :

- Fixer le frottis avec du méthanol pendant quelques secondes en le trempant dans une cuve qui en contient.
- Préparer une solution de Giemsa à 10% (1 ml de solution mère dans 9 ml d'eau de robinet).
- Recouvrir toute la lame de cette solution et laisser colorer pendant 15 minutes.
- Chasser délicatement le colorant de la lame en ajoutant de l'eau propre goutte à goutte. Faire sécher à l'air libre et examiner au microscope

/Goutte épaisse :

La coloration se fait comme pour le frottis, exception faite de l'étape de la fixation.

#### *d) Lecture :*

Elle se fait à l'objectif à immersion (x 100). La numération des Plasmodiums (parasitémie) est faite sur la goutte épaisse. Le nombre de parasites par microlitre de sang est établi par rapport au nombre de leucocytes, fixé à 8000 par microlitre.

### **3.3.3. Recherche des oeufs de bilharzies dans les urines :**

#### *a) Prélèvement :*

Recueillir soit les urines de fin de miction entre 10 et 14 h après un effort modéré soit celles de 24 heures. Après homogénéisation, centrifuger 10 ml d'urines à 3000 tours /mn pendant 5 minutes.

#### *b) Examen :*

Il est fait sur le culot de centrifugation des urines.  
Parcourir toute la préparation à l'objectif x 10

### 3.3.4. Recherche des microfilaires dans le sang

#### a) Prélèvement

Prélever 5 ml de sang par ponction veineuse. Le sang est recueilli sur anticoagulant, de préférence le citrate de sodium à **3,8%** à raison de **0,4 ml** pour 1,6ml de sang ou à défaut l'EDTA.

#### Remarques :

- Les autres anticoagulants sont déconseillés car l'héparine provoque une agglutination des microfilaires ; le fluorure de sodium et l'oxalate de sodium tuent les microfilaires.
- Pour la recherche des microfilaires diurnes (*Loa loa*) le prélèvement doit être effectué de préférence entre **12 et 14 heures** ; pour celles des microfilaires nocturnes (*Wuchereria bancrofti*), l'heure propice est entre **22 heures et minuit**. Cependant, l'utilisation d'une technique de concentration permet d'effectuer tous les prélèvements pendant la journée.

#### b) Frottis sanguins colorés au Giemsa

Même procédure que pour la recherche des plasmodies mais le temps de coloration doit être **de 25 minutes**.

#### c) Gouttes épaisses colorées au Giemsa

Déshémoglobliniser avec quelques gouttes d'eau jusqu'à lyse totale des hématies. Egoutter, sécher, **fixer au méthanol** puis colorer avec une solution à 10% de Giemsa pendant **25 minutes**. Rejeter le colorant. Laver sous un fin filet d'eau de robinet ; sécher à l'air libre.

#### d) la technique de leucoconcentration à la saponine

Dans un tube à centrifuger cône

- Mettre 5 ml de sang citraté
- Ajouter 10 ml de sérum physiologique
- Mélanger par retournement du tube
- Ajouter quelques gouttes de saponine à 2% jusqu'à l'obtention d'un sang rouge laqué
- Retourner le tube plusieurs fois et s'assurer que l'hémolyse est complète (le liquide au niveau du cône doit être limpide)
- Laisser reposer 5 minutes
- Centrifuger à 1500 tours/mn pendant 10 minutes
- Rejeter le surnageant
- Recueillir à l'aide d'une pipette Pasteur le culot qui renferme les leucocytes et les parasites vivants
- Examiner le culot entre lame et lamelle et après coloration au Giemsa

#### e) Examen microscopique

Les frottis, gouttes épaisses et culot de leucoconcentration colorés au Giemsa doivent d'abord être observés à l'objectif x **10** ou x **40** pour la **recherche des microfilaires**. L'**identification** des espèces de microfilaires se fait à l'objectif **100** sous huile à immersion.

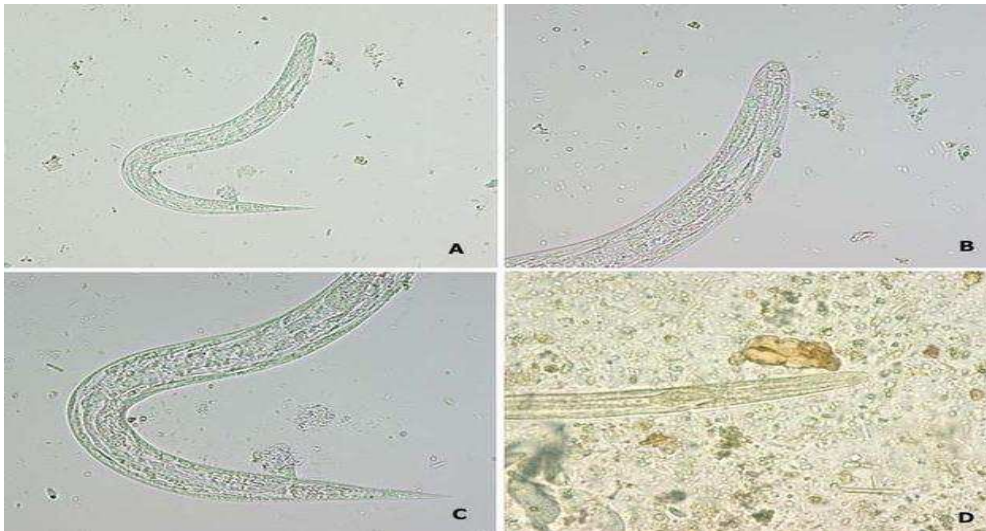
### 3.3.5. Assurance qualité et système de référence :

Deux personnes effectuent les lectures microscopiques. Il doit y avoir corrélation des résultats.

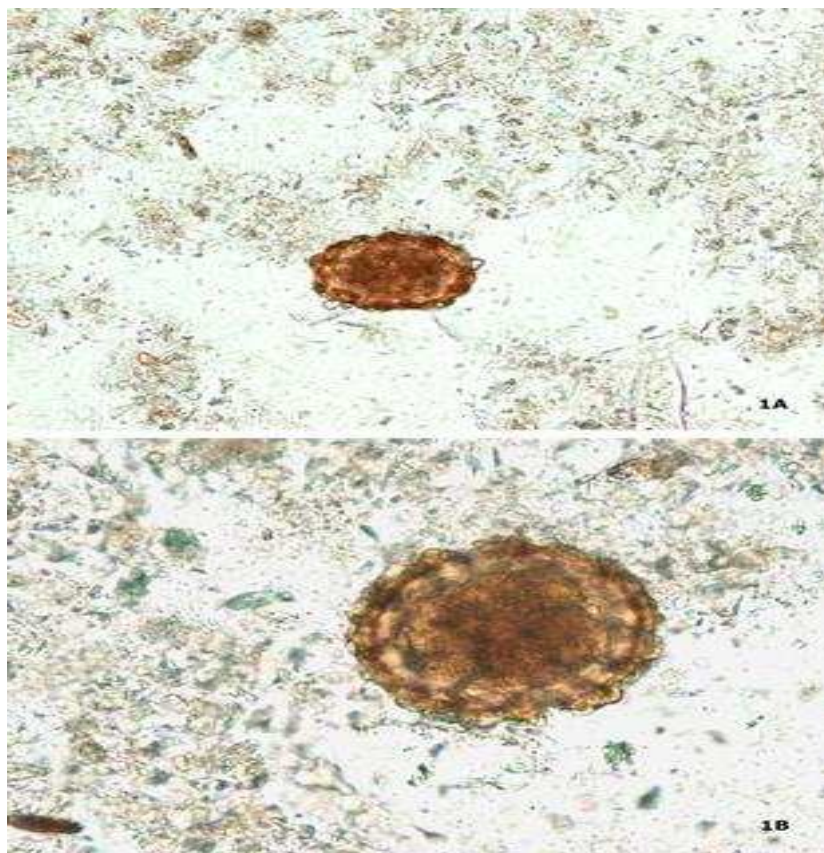
Voir ci-après les photos et tailles des parasites humains.

**I. Dans les selles :**

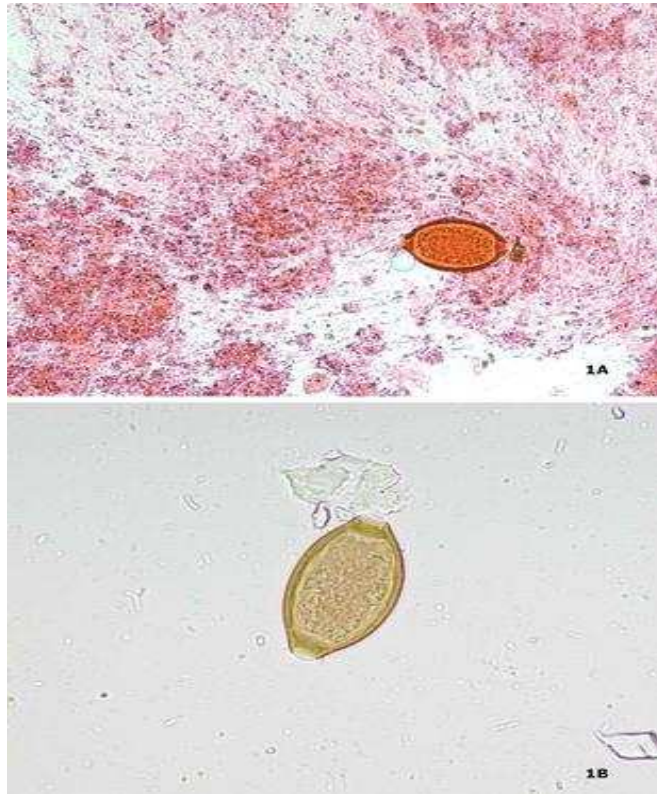
**Larves d'Anguillules :**



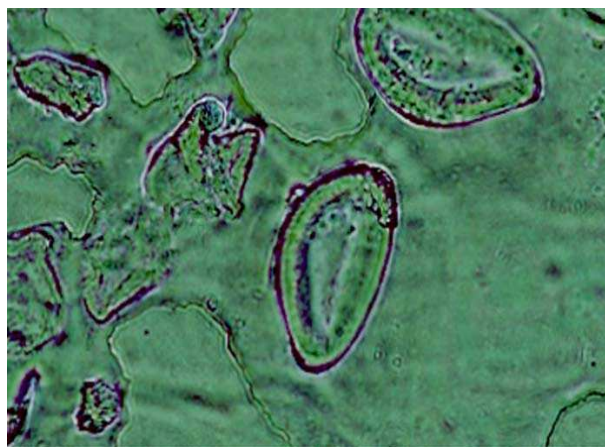
**Œufs d'Ascaris :**



**Œufs de Trichuris trichiura (trichocéphale**



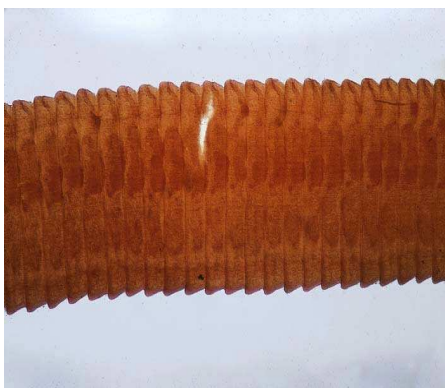
**Œufs d'oxyures au scotch test anal :**



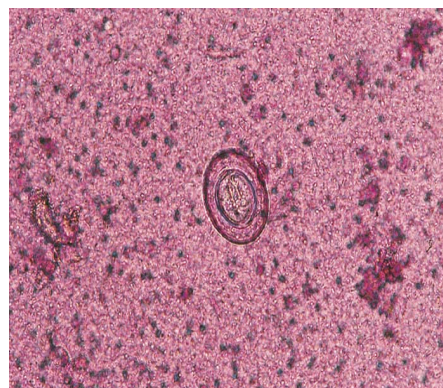
**Œufs d'Ankylostomes :**



**Hyménolépis nana : anneaux et œufs**



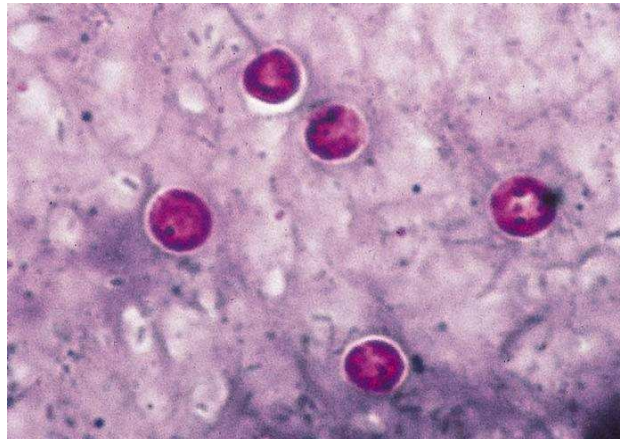
Anneaux



Œufs



**Oocystes de cryptosporidium après coloration de Ziehl Nielsen :**



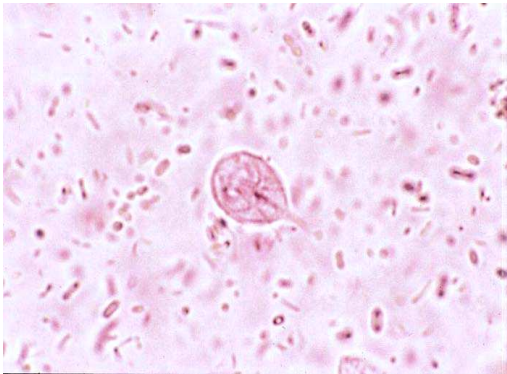
**Œufs de Fasciola Hepatica**



**Amibe Entamoeba histolytica histolytica**



### Forme végétative et kyste de Giardia intestinalis



Trophozoite (forme végétative)

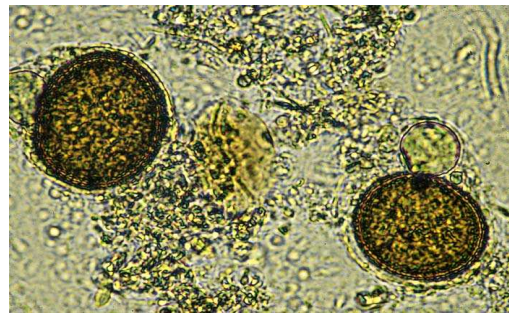


Kyste

### Anneaux et œufs de tænia :

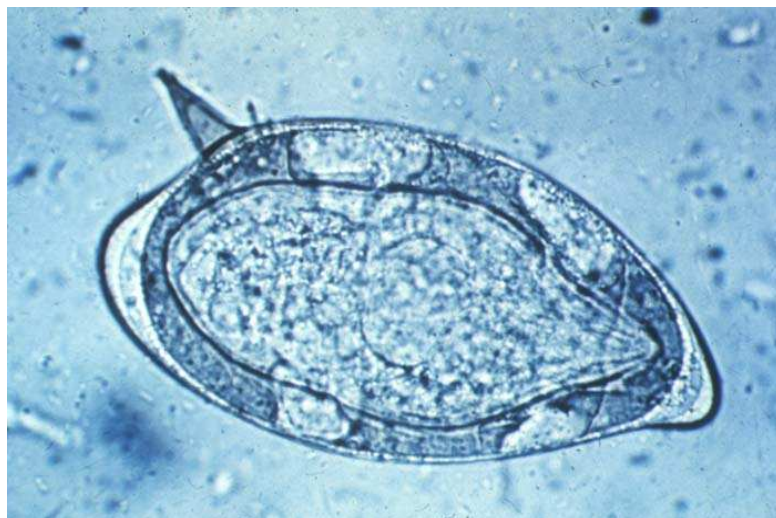


Anneaux de Tænia saginata



Œufs de tænia

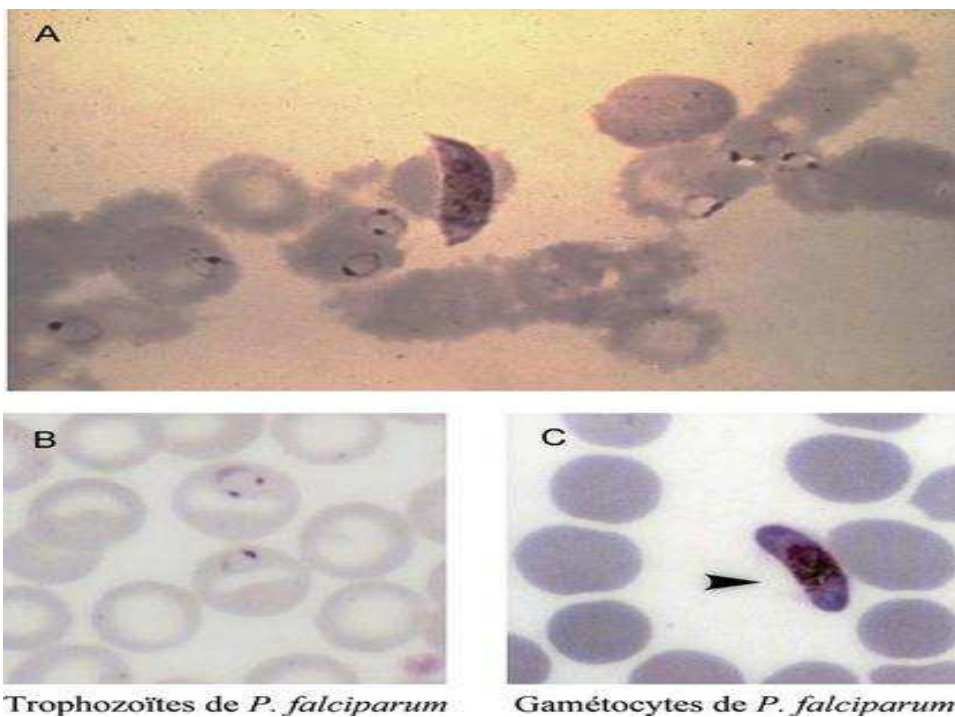
### Schistosoma mansoni :



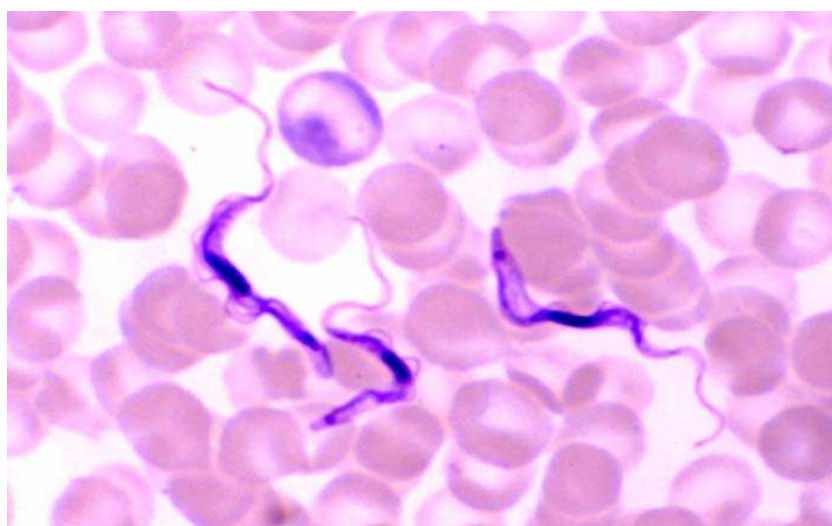
Œufs : éperon latéral

## II. Dans le sang :

### Plasmodium :

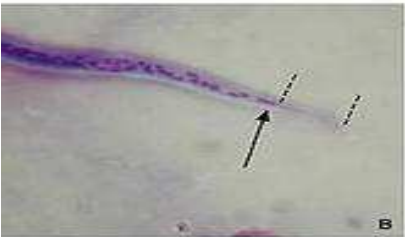


### Trypanosomes :

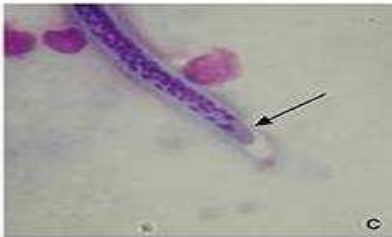


**Filaires :**

*Microfilaire de Wuchereria bancrofti*

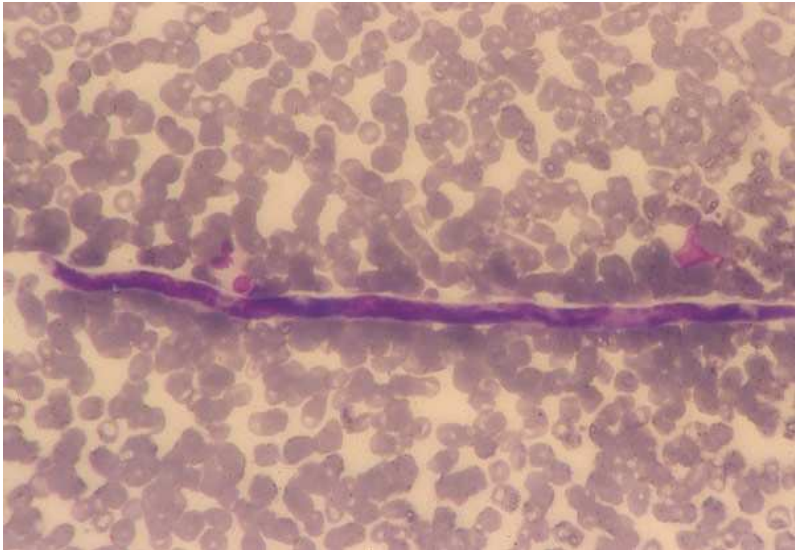


Dernier noyau à distance de l'extrémité caudale



1<sup>er</sup> noyau assez proche de l'extrémité céphalique. Gaine visible « en contraste »

*Microfilaires de Loa Loa*



***Filaire de Médine : Dracunculose***



**III. Dans les urines :**

***Schistosoma haematobium* :**



Œufs : éperon terminal



Accouplement de schistosomes

## 3.4. BACTERIOLOGIE

### 3.4.1. Urines :

#### a) *Prélèvement*

##### Conditions :

- . De préférence, recueillir les urines du matin avant toute miction ; à défaut, on peut prélever les urines à tout moment, après une rétention d'au moins 2 heures.
- . Chez le malade sous sonde, éviter de prélever directement dans la poche : clamber la tubulure et ponctionner en amont du clamping après nettoyage soigneux.
- . Prélever idéalement avant toute antibiothérapie
- . Respecter une asepsie rigoureuse

##### Technique

- . Chez l'adulte et grand enfant :

Au cours d'une miction physiologique, il faut nettoyer le méat urinaire, rejeter les premières gouttes d'urines et recueillir les urines en milieu de jet dans un pot stérile.

- . Chez le Nourrisson et le petit enfant :

Appliquer une poche adhésive stérile autour des organes génitaux externes et la changer toutes les 30 minutes en l'absence de miction.

. En cas de rétention aigue d'urines, le recueil des urines se fait par sondage vésical ou par ponction sus pubienne

##### Transport

Procéder à un envoi immédiat de l'échantillon au laboratoire avec une fiche de renseignements bien remplie. Les urines peuvent aussi être conservées à +4°C pendant 2 heures.

#### b) *Examen macroscopique* :

Il permet d'apprécier à l'œil nu l'aspect des urines : claires, troubles, purulentes, hématisées.

#### c) *Examen microscopique* :

◆ L'examen à l'état frais est effectué sur les urines totales et permet une appréciation quantitative ou semi quantitative des leucocytes, des hématies, des cellules épithéliales (en nombre / champ ou en croix). Cet examen permet également de vérifier la présence de cristaux, de levures, de parasites (*Trichomonas vaginalis*, œufs de bilharzies), et de préciser la morphologie et la mobilité des bactéries.

◆ La coloration de Gram est effectuée sur un frottis réalisé à partir du culot de centrifugation. Elle apporte des informations supplémentaires sur les caractères morphologiques des bactéries. Elle permet de mieux apprécier la flore bactérienne.

#### d) *Culture : Dénombrement des germes urinaires*

Elle se fait sur des milieux permettant un dénombrement des germes urinaires pour déterminer le seuil d'infection.

Il existe plusieurs méthodes dont celle de la lame gélosée qui consiste à immerger la lame de DGU dans les urines et à la mettre en incubation à 37°C pendant 24 heures. La lecture consistera à comparer la densité des colonies bactériennes obtenue avec les modèles fournis dans le kit. Une infection du tractus urinaire est retenue lorsque le DGU donne un résultat supérieur ou égal à 10<sup>5</sup> bactéries / ml avec une culture en souche pure et la présence de leucocyturie. Des méthodes alternatives peuvent être utilisées en l'absence de lames gélosées.

### **e) Identification**

A partir des colonies isolées, une galerie d'identification est ensemencée pour étudier les caractères biochimiques. L'identification est parfois complétée par des tests immunologiques avec des sérums agglutinants.

### **f) Antibiogramme**

Les antibiotiques sont choisis en fonction de l'espèce identifiée. Les antibiotiques éliminés sous forme active par voie urinaire sont toujours inclus dans la liste.

## **3.4.2. Pus et liquides d'épanchement :**

### **a) Introduction**

Le but est de détecter l'agent étiologique d'un épanchement.

Il existe différents types de foyers infectieux suppurés :

- . foyers superficiels : plaies chirurgicales, médicales ou traumatiques, escarres, brûlures etc.
- . foyers profonds : abcès : collection de pus dans une cavité
  - exemples : furoncles, anthrax, abcès des viscères
  - phlegmons : inflammation localisée non collectée (prélèvement souvent impossible)
  - adénites
- . foyers des séreuses : pleurésie : purulente, séro-fibrineuse
  - péritonite purulente, ascite
  - péricardite : purulente, séreuse
  - synovite : purulente, séreuse

### **b) Prélèvements**

\* Indications :

- on ne prélève que les collections fermées
- ne pas prélever les pus de plaies ouvertes car inexploitable

\* Techniques

- nettoyer la peau avec de l'alcool iodé
- soit on prélève le pus avec une seringue
- soit on incise la collection avec un bistouri et on prélève le pus avec une pipette Pasteur ou un écouvillon

\* Transport – conservation

- transporter immédiatement le pus au laboratoire,
- utiliser des milieux de transport / conservation si nécessaire (grande distance)
- transporter le pus à l'abri de l'oxygène (si germes anaérobies à rechercher)

### **c) Technologie au Laboratoire**

/ Examen macroscopique

- noter la consistance du pus
  - . purulent
  - . séreux ou citrin : exsudat, transsudat
- noter la couleur du pus
  - . bleue : faisant penser au bacille pyocyanique
  - . chocolat : faisant penser au pneumocoque
- noter l'odeur : très fétide (évoquant les anaérobies)

/ Examen microscopique

- Coloration de May Grunwald Giemsa : oriente vers une infection bactérienne ou virale
  - . polynucléaires altérés : bactéries pyogènes
  - . lymphocytes : virus, BK
  - . absence de cellules : exsudat, transsudat
- Coloration de Gram : oriente le choix des milieux à ensemercer
  - . qualité de la flore : monomicrobienne ou polymicrobienne
  - . quantité de la flore : abondance de germes

/ Culture :

- milieux
  - . géloses au sang frais ou sang cuit
  - . bouillon thioglycolate, ou bouillon cœur-cervelle
- technique : méthode des quadrants
- recherches particulières
  - . anaérobies : milieu de Rosenow, milieu de Schaedler
  - . gélose de Löwenstein-Jensen pour la culture des BK

/ Résultats et interprétation

- flore monomicrobienne : c'est l'idéal
- flore polymicrobienne
  - . peut se voir en cas de pleurésie ou de péritonite
  - . il s'agit d'une association de germes anaérobies et de germes aérobies

### Caractéristiques des liquides pleuraux

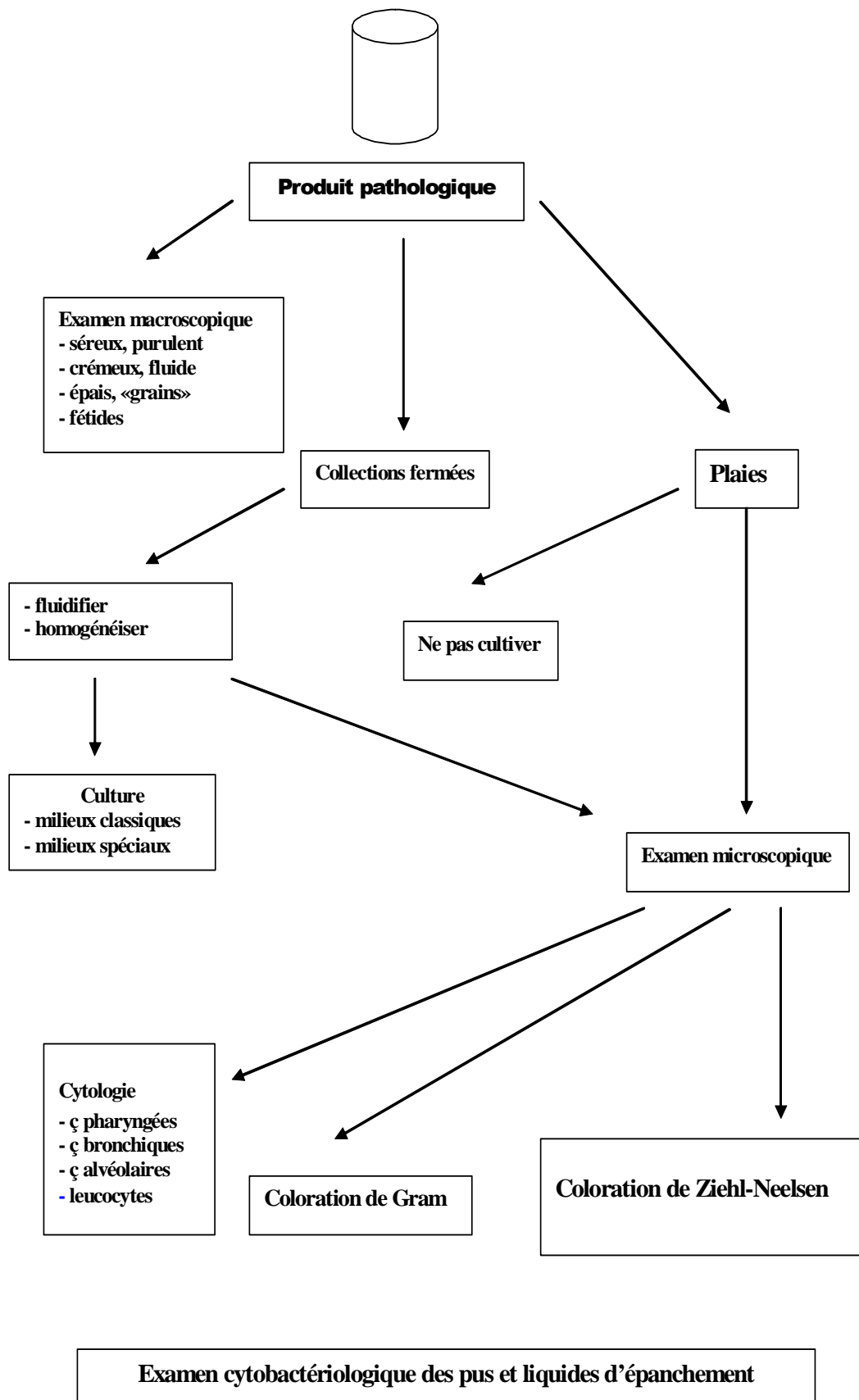
Composition du liquide	Aspect macroscopique du liquide				
	Clair	Clair	Louche	Purulent	Hématique
Cellules/mm <sup>3</sup>	< 500	> 500	> 500	> 2000	-
Lymphocytes	+	+++	±	Rares	+
Neutrophiles	+	Rares	+++	+++++	+
Germes	0	0	0	+++	+ ou 0
Culture	-	BK	+	+	± ; BK
Protéine g/l	< 20	> 20	> 20	> 50	> 20
Interprétation	Transsudat	Exsudat (tuberculose)	Exsudat Pleurésie	Exsudat Abscès	Exsudat

### Caractéristiques des liquides articulaires

Liquide	Normal	Septique	Tuberculose	inflammation
Aspect	Clair	Trouble	Trouble	± trouble
Coagulation spontanée	Non	Oui	Oui	Oui
Leucocytes/mm <sup>3</sup>	<200	50000- 200000	25000	5000-50000
Neutrophiles %	<25%	>80%	Variable	≈ 50%
GS/GL X 100*	≈ 100%	<50%	<50%	≈ 75%
Culture	Négative	Variable	BK	Négative
Dosage des protéines : sans intérêt				

\* : rapport glucose sanguin/glucose dans le liquide X 100





### 3.4.3. Sécrétions broncho-pulmonaires :

#### a) Introduction

Le but de l'étude est de «rechercher l'agent étiologique d'une infection à germes banals des voies respiratoires inférieures»

#### c) Indications

Infections respiratoires inférieures

#### d) Prélèvements

##### \* Techniques

###### /Expectorations

- . matin au réveil, après toilette bucco-dentaire
- . prélèvement physiologique : après une toux

###### /Sécrétions prélevées avec des instruments

- . aspiration trans-trachéale
- . aspiration bronchique
- . brosse bronchique
- . lavage broncho-alvéolaire (LBA)

##### \* Transport - conservation

- / Transport immédiat au laboratoire (< 30mn)
- / Ne pas conserver

##### \* Prélèvements complémentaires

- / Hémoculture
- / Sérum sanguin : recherche d'antigènes solubles

#### e) Technologie au Laboratoire

- Examen macroscopique :
  - / expectorations muqueuses, muco-purulentes, purulentes, hémoptoïques etc.
  - / aspects des liquides d'aspiration
  - / fluidifier, homogénéiser
- Examen microscopique :
  - / fluidifier, homogénéiser
  - / cytologie : coloration de May Grunwald Giemsa
  - . cellules pharyngées < 25/champ (si > 25/champ : rejeter l'échantillon)
  - . leucocytes : > 25/champ : échantillon bon
  - : < 25 + flore monomorphe : échantillon bon
  - : < 25 + flore polymorphe : rejeter l'échantillon
  - . autres cellules : bronchiques, alvéolaires
    - / Bactériologie : coloration de Gram
  - . flore monomorphe + PN > 25/ champ : cultiver
  - . prédominance d'un germe + PN > 25/champ : cultiver
  - . autres situations : ne pas cultiver

- Culture :
  - /milieux
  - . ensemencer toujours : GSO et GSC + Facteurs de croissance
  - . autres milieux : en fonction du Gram
  - /technique
  - . diluer les prélèvements au 1/1000
  - . appliquer méthode des quadrants
  
- Résultats :
  - / Devant des bactéries pathogènes spécifiques
    - bronchopathies
      - . *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. aureus*
      - . *B. catarrhalis*, *N. mucosa*,
      - . Bacille pyocyanique, entérobactéries
    - pneumopathies
      - . pneumonie : *S. pneumoniae*
      - . abcès : *K. pneumoniae*, *S. aureus*, anaérobies
      - . pneumopathies atypiques : *M. pneumoniae*,  
*Chlamydia*, *Legionella pneumophila* ...
  - / Interprétation nécessaire
    - expectorations et aspirations non protégées
      - . seuil :  $10^7$  bactéries / ml de prélèvement
      - . bactérie commensale :  $10^5$  bactéries/ml
      - . signification douteuse :  $10^6$  bactéries/ml
  
- . *Cytologie > 25 leucocytes/ml de prélèvement*
  - aspirations bronchiques protégées, trans-trachéales
    - . seuil :  $10^3$  bactéries / ml de prélèvement
    - . présence de cellules bronchiques et pulmonaires

#### 3.4.4. Sécrétions ORL :

##### a) Introduction

\* Composition de la sphère ORL

- bouche, nez, sinus
- oreille
- pharynx ou gorge

\* Intérêt de la question : Rechercher des agents étiologiques des angines et des otites moyennes aiguës (OMA) non fistulisées.

##### b) Prélèvement du pharynx = prélèvement de gorge

\* Indications du prélèvement de gorge

- tout épisode d'angine
- angines à répétition chez un enfant
- recherche de porteur sain de bactéries pathogènes spécifiques (BPS)

## \* Prélèvement

### /Technique

- matériel : écouvillon stérile ; abaisse-langue
- noter l'aspect anatomo-clinique de l'angine
- technique : frotter 2 écouvillons sur les amygdales, la muqueuse du pharynx, sous les fausses membranes

### /Transport – conservation

- transport immédiat, sans délai (risque de dessèchement)
- milieux de transport-conservation disponibles
- humidifier les prélèvements si culture retardée

## \* Technologie au Laboratoire

### /Examen microscopique

- coloration de Gram
  - . apprécier qualité/quantité de la flore
  - . chercher à isoler le germe prédominant
- coloration au bleu de méthylène
  - . pour apprécier la présence de levures, la cytologie etc.

### /Culture

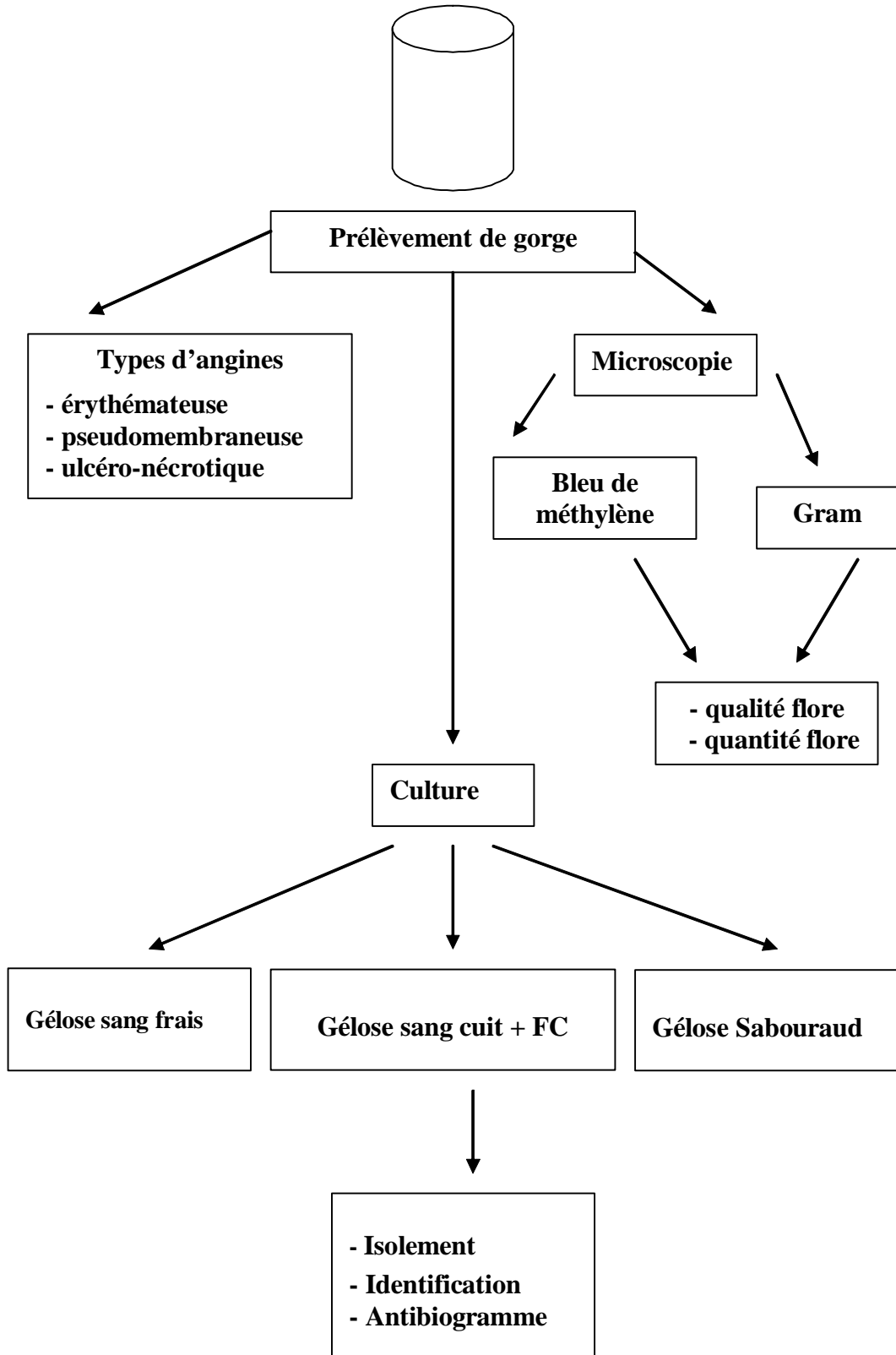
- milieux
  - . géloses au sang frais + acide nalidixique
  - . gélose au sang cuit + complexe vitaminique
  - . bouillon d'enrichissement : streptosel, BGT
  - . spéciaux : au sérum de bœuf coagulé ; Hoyle
- technique : méthode des quadrants

### /Recherches particulières

- *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*
- *Candida albicans*
- virus : *Herpes simplex virus*

### /Résultats

- angines rouges ou érythémato-pultacées
  - . *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, Streptocoque du groupe C, Streptocoque du groupe G
  - . *Staphylococcus aureus*, *H. influenzae*
  - . *Candida albicans*
  - . virus = 50%
- angines pseudomembraneuses
  - . *Corynebacterium diphtheriae*
  - . *Staphylococcus aureus*
  - . virus : EBV (mononucléose infectieuse)
- angines ulcéro-nécrotiques
  - . angine de Vincent : association de 2 germes
  - . chancre syphilitique : *Treponema pallidum*
- angines vésiculeuses : elles sont virales



**Technologie du prélèvement de gorge au Laboratoire de Bactériologie**

### c) Prélèvement de pus d'oreille

#### \* Indications

- otite moyenne aiguë +++
- otite interne +
- furoncle du conduit auditif externe
- ne pas prélever
  - : plaie du conduit auditif externe
  - : otite suppurée spontanément

#### \* Prélèvements

##### /Techniques

- Otite externe : ponction de furoncle
- OMA : faire une paracentèse (acte médical)
  - : nettoyer le CAE (antisepsie)
  - : poser un spéculum et inciser
  - : aspirer le pus

##### /Transport – conservation

- transport immédiat au laboratoire
- milieux de transport-conservation

#### \* Technologie au Laboratoire

##### /Examen macroscopique

- Sécrétions fluides, purulentes
- Odeur : fétides (anaérobies)

##### /Examen microscopique

- coloration de Gram : flore monomicrobienne
- bleu de méthylène : levures, cytologie etc.

##### /Culture

- milieux : GSO, GSC + complexe vitaminique
- technique : méthode des quadrants

##### /Résultats

- otite moyenne aiguë
  - . *S. pneumoniae*, *Streptococcus spp.*
  - . *S. aureus*, *H. influenzae*, Entérobactéries, bacille pyocyanique
- otite externe (furoncle) : *S. aureus*

### d) Autres prélèvements : ORL et oculaire

#### \* Prélèvement de sinus

- indications : sinusites aiguës ou chroniques
- technique : ponction-lavage, écouvillonnage méat
- examen macroscopique
- examen microscopique : flore souvent mixte : aérobie-anaérobie
  - parfois monomicrobienne
- milieux de culture : dépendent de la flore
- germes : *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. aureus*, streptocoques, bactéries anaérobies ...

\* Prélèvement buccal et nasal

- Indications : lèpre, ozène, rhinosclérome, portage
- Technique : écouvillonnage
- Examen macroscopique ;
- Examen microscopique : Gram, Ziehl-Neelsen
- Milieux de culture : fonction du germe recherché
- Germes : *M. leprae*, *K. rhinoscleromatis*, *K. ozenae*, BPS en portage ...

\* Prélèvement oculaire

- Indications : conjonctivites
- Technique : écouvillonnage au niveau de l'angle interne, du cul de sac lacrymal, de la conjonctive palpébrale
- Examen macroscopique
- Examen microscopique après coloration de Gram
- Milieux de culture : fonction du germe recherché
- Germes : *Chlamydia trachomatis*, *Moraxella*, pneumocoque, gonocoque, *Haemophilus*, *Staphylococcus aureus* ...

### 3.4.5. Hémoculture

#### a) Introduction

Il s'agit de «rechercher un agent étiologique dans le sang lors d'une infection»

Le sang est normalement stérile, et la présence de bactéries dans le sang peut signifier :

- . une bactériémie : décharges transitoires de bactéries dans le sang pouvant être physiologique (après les repas) ou pathologique (à partir d'un foyer infectieux),
- . une septicémie : décharges répétées de bactéries dans le sang avec fièvre très élevée. Les causes fréquentes sont : l'endocardite, la thrombophlébite, la fièvre typhoïde.

Les indications de l'Hémoculture sont :

- toute fièvre inexplicée chez un cardiaque, une femme enceinte, un immunodéprimé
- tableau de septicémie
- hypothermie

#### b) Prélèvement :

\* Techniques :

- moment du prélèvement : quand prélever ?
  - . quand ? : avant toute antibiothérapie, au moment des pics fébriles, loin des repas
  - . rythme : faire une hémoculture toutes les 6H
- techniques : comment et où prélever ?
  - . où : tout territoire veineux disponible
  - . comment (technique) : badigeonner la peau à l'alcool  
poser un garrot  
ponctionner la veine avec une seringue stérile  
recueillir 10 ml de sang chez l'adulte, 5 ml chez l'enfant et  
1 ml chez le nouveau-né.

- culture du sang : hémoculture
  - . milieux de culture : bouillon cœur cerveau (BCC), bouillon trypticase soja (BTS) etc.
  - . technique de culture.
    - : nettoyer le capuchon du ballon d'hémoculture avec de l'alcool iodé
    - : disposer d'une flamme : bec bunsen notamment.
    - : injecter le sang dans le ballon sans l'ouvrir au travers du capuchon et cela le plus près possible de la flamme
    - : étiqueter le ballon en précisant l'heure et la date de prélèvement, puis l'acheminer au laboratoire accompagné d'un bulletin d'analyse correctement rempli.

\* Transport-conservation

- transport immédiat au laboratoire
- conservation = incubation à +37°C

*b) Technologie au Laboratoire*

\* Incubation et surveillance

- incubation en atmosphère aérobie à + 37°C
- examiner les ballons tous les jours

\* Traitement d'une hémoculture positive

- le ballon devient trouble en 2-3 jours
- faire un examen à l'état frais et après une coloration de Gram
- repiquer systématiquement sur gélose au sang et gélose MH
- ensemercer une galerie d'identification
- réaliser un antibiogramme

\* Traitement d'une hémoculture négative

- garder les ballons non suspects pendant 7 à 10 jours
- repiquer systématiquement sur gélose au sang
- si culture négative, rendre les résultats

\* Recherches particulières

- médulloculture
  - . fièvre typhoïde, brucellose
  - . tuberculose miliaire
- borreliose, leptospirose : milieux spéciaux

*c) Interprétation des résultats*

\* Hémoculture positive

- le diagnostic bactériologique est sûr en présence de bactéries pathogènes spécifiques comme : .  
Salmonella Typhi

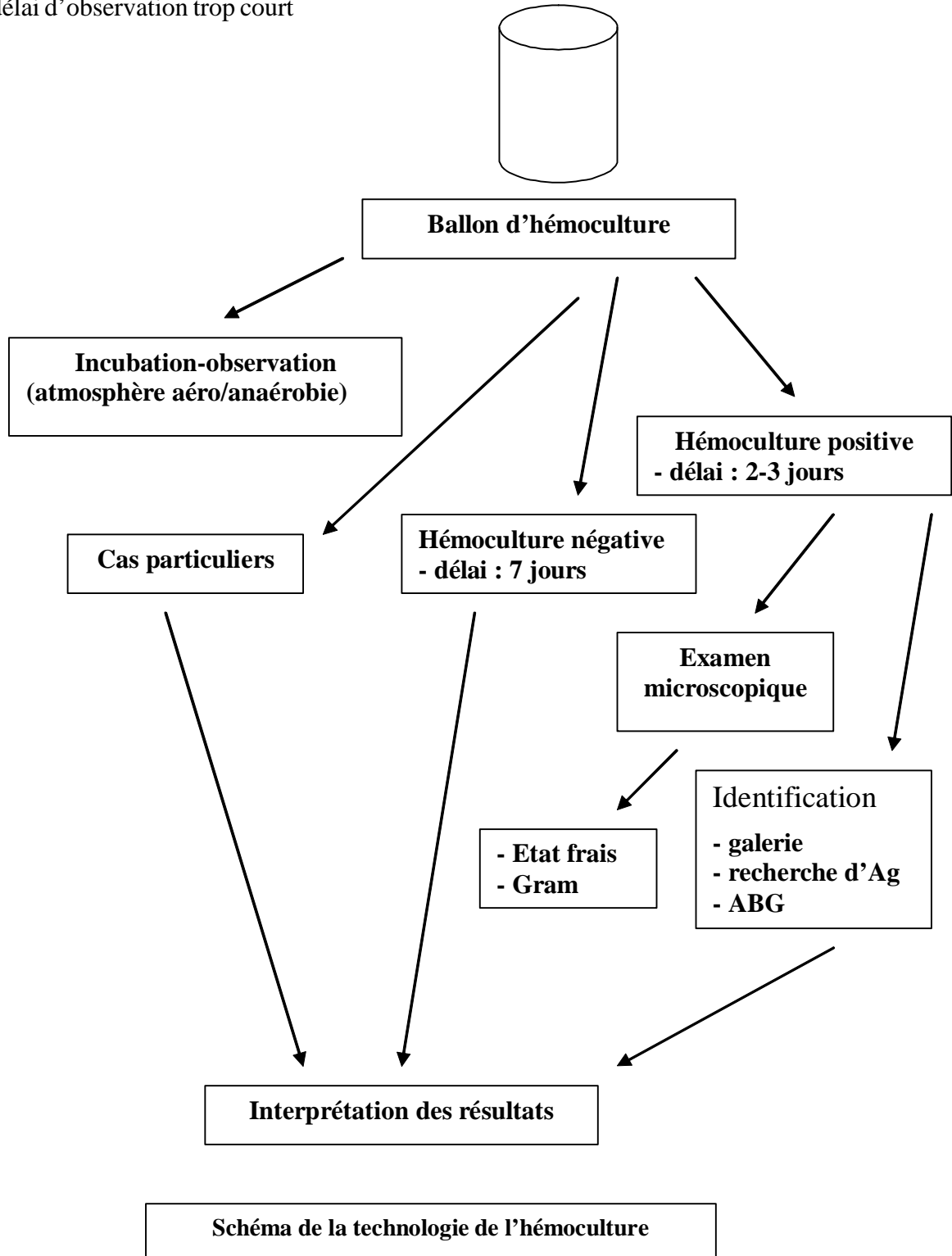
- . *Streptococcus pneumoniae*
- . *Neisseria meningitidis*
- . *Brucella*

- en présence de bactéries pathogènes opportunistes, le diagnostic reposera sur :
  - . leur isolement dans plusieurs ballons successifs
  - . si la culture est positive dans un seul ballon, le choix sera difficile entre une souillure et une bactériémie
    - présence de plusieurs germes dans un ballon
      - . soit c'est une souillure
      - . soit c'est une infection si le malade est cathétérisé, ou immunodéprimé



**\* Hémoculture négative**

- absence d'infection bactérienne du sang
- HC faite tardivement dans l'évolution de la maladie
- malade sous antibiotique
- quantité de sang prélevée insuffisante
- milieux ou conditions de culture inappropriés
- délai d'observation trop court



### 3.4.6. Sérologies :

#### A/ Sérodiagnostic de Widal et Félix

C'est le diagnostic indirect ou sérologique des salmonelloses par la recherche d'anticorps spécifiques des antigènes O, H, Vi de Salmonella Typhi, Salmonella Paratyphi A, B, C, Salmonella Enteritidis et Salmonella Typhimurium.

#### ❖ Indications

Diagnostic des fièvres typhoïde et paratyphoïdes

#### ❖ Prélèvement

sang veineux chez un patient à jeûn  
sérum recueilli après centrifugation

#### ❖ Réactifs

sérums agglutinants de trois types :

- sérums contenant des Antigènes O = Ag somatiques, dénaturés à l'alcool  
TO – AO – BO – CO
- sérums contenant des Antigènes H = Ag flagellaires, dénaturés au formol  
TH – AH – BH – CH – ENH – TMH
- sérums contenant des Antigènes Vi = Ag capsulaires, dénaturés à l'alcool de  
S. Typhi, S. Paratyphi C, S. Dublin

#### ❖ Principe

Réaction d'agglutination entre Ag et Ac (Sérum à étudier et suspensions antigéniques)

#### ❖ Technique

Se fait en deux temps :

- Détecter la présence des Anticorps anti O, H, et Vi aux dilutions 1/100<sup>e</sup> et 1/200<sup>e</sup>
- Procéder au titrage de ces Anticorps

#### 1- DETECTION DES ANTICORPS

Sérum dilué au 1/100<sup>e</sup> + suspensions antigéniques

Sérum dilué au 1/200<sup>e</sup> + suspensions antigéniques

Centrifugation – Chiquenaude – Lecture :

Dégagement de fumée résultat négatif

Présence d'agglutinats (grains) résultat positif

#### 2- TITRAGE

Dilutions du sérum positif

Dilutions croissantes de raison 2 : 1/400, 1/800, 1/1600<sup>e</sup>

Centrifugation – Chiquenaude – Lecture

Titre final = inverse de la dernière dilution positive

Exemple : si dilution à 1/400<sup>e</sup> positive Titre : 400 UI/ml

### ❖ Interprétation

Elle permet de préciser le sérotype de Salmonelle en cause et de déterminer la période de la maladie grâce à l'étude de la cinétique des anticorps

Agglutinines O : apparaissent vers le 8<sup>e</sup> jour, montent puis atteignent le titre de 400.

Ils disparaissent après 2 à 3 semaines

Si le taux est > 100 : infection récente ou en cours

Agglutinines H : apparaissent entre le 10<sup>e</sup> et 12<sup>e</sup> jour, atteignent rapidement le titre de 800 à 1600, mais persistent à titre faible pendant plusieurs mois voire années

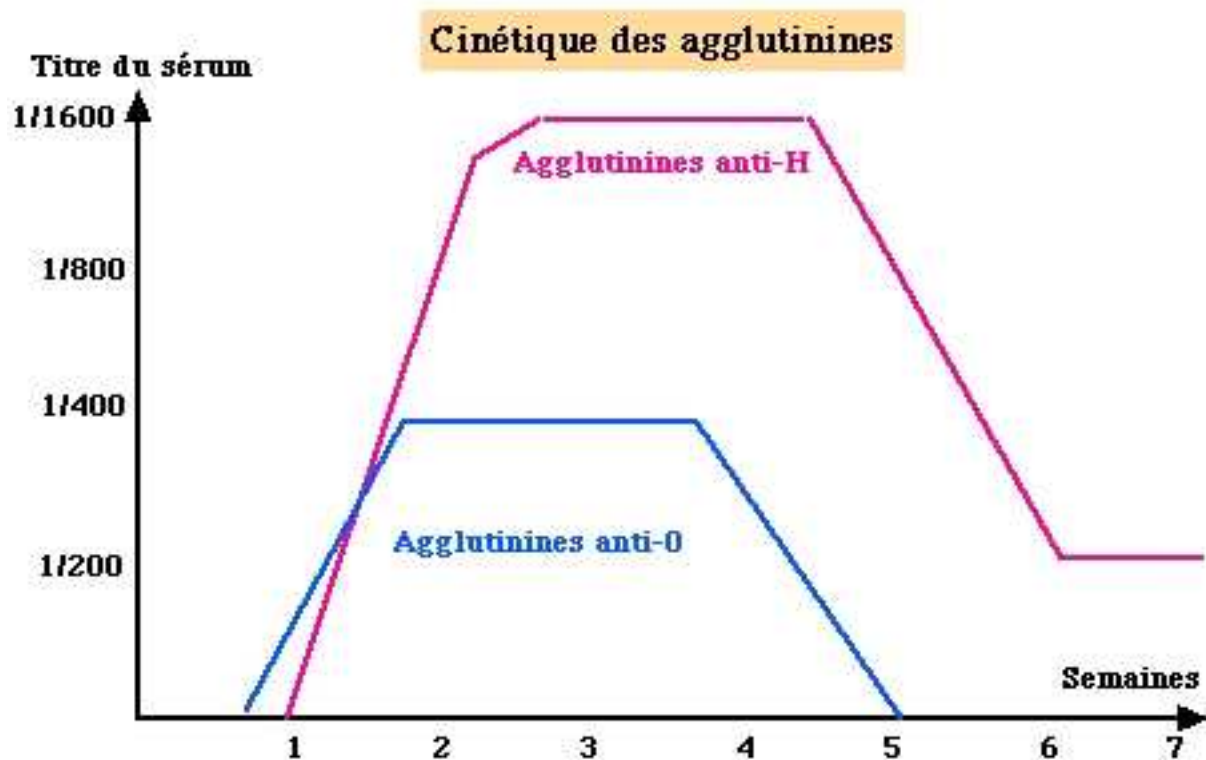
On les retrouve seuls lors d'infection ancienne ou d'une infection récente avec antibiothérapie précoce.

Leur association avec l'Ag O signe une infection récente ou en cours

- Le sérodiagnostic est normalement positif pour un sérotype de Salmonella
- Possibilité de communauté antigénique entre différents sérotypes : coagglutination
- Une sérologie négative n'élimine pas une Salmonellose
- Contrôle au bout de 2 à 3 semaines : évolution des taux

NB : Manque de sensibilité et de spécificité

Il existe des faux positifs : paludisme, dysglobulinémie, typhus exanthématique



### B/ Sérodiagnostic des streptococcies : ASLO

Les streptocoques sécrètent des substances antigéniques appelées toxines qui induisent la production d'anticorps anti-toxines spécifiques par l'organisme infecté.

La recherche de ces anticorps dans le sérum du sujet atteint et leur dosage permettent un sérodiagnostic.

En pratique, la recherche la plus couramment demandée est le dosage des anticorps antistreptolysines O (ASLO).

### ❖ **But**

Recherche d'anticorps antistreptolysine O dans le sérum humain.

### ❖ **Principe**

C'est un test basé sur une réaction d'agglutination sur carte.

Le réactif est constitué par un antigène fait de particules de latex polystyrène recouvertes de streptolysines O.

En présence d'anticorps antistreptolysines O dans le sérum à tester, il se forme une agglutination visible à l'œil nu.

### ❖ **Matériel nécessaire**

- Kit réactif qui comprend : réactif, contrôle positif, contrôle négatif, tiges, carte d'agglutination ( le kit est conservé à +4°C)

- Agitateur mécanique (non indispensable)

### ❖ **Mode opératoire**

- Sortir les réactifs et les laisser à température ambiante
- Prélever le sang du patient, centrifuger et recueillir le sérum
- A l'aide d'une carte sur laquelle sont individualisés des cercles, déposer 50ul de sérum à tester dans un cercle et une goutte de chaque contrôle positif et négatif dans d'autres cercles
  - Agiter le réactif ASLO et ajouter une goutte à coté de chaque échantillon.
  - Mélanger, à l'aide d'une tige à usage unique, de façon à recouvrir toute la surface du cercle (changer de tige pour chaque cercle)
    - Agiter la carte à 100 tours/mn ou imprimer un mouvement de rotation avec les mains pendant 2 minutes
    - Lire la réaction obtenue.

### ❖ **Lecture et Interprétation**

- Absence d'agglutination : réaction négative = absence d'anticorps antistreptolysine O

- Présence d'agglutination : réaction positive = présence d'anticorps antistreptolysine O

Une réaction positive traduit un taux >200UI/ml (seuil de positivité du réactif utilisé, Bio Mérieux)

Tout sérum positif doit être titré.

Pour titrer, on procède à des dilutions sériées de 2 à 2 (1/2, 1/4, 1/8 etc...)

Le taux final sera défini comme étant la plus grande dilution qui donne une réaction positive (sérum positif à la dilution 1/A : titre = A x seuil

exemple : un sérum positif à la dilution 1/8 correspond à un titre de 8 x 200 soit 1600 UI/ml.

Un taux d'ASLO < ou = 200UI/ml est considéré comme normal chez le sujet africain.

Un taux > 200UI/ml signe une infection récente.

### 3.5. Antibiogramme

**Source:** Comité de L'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie - Recommandations 2007

**3.5.1 - Enterobacteriaceae, bacilles à Gram négatif non fermentaires (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* ...), *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp.**

#### - Inoculum

A partir d'une culture de 18-24 h sur milieu gélosé non sélectif, préparer une suspension en bouillon Mueller-Hinton ou en solution saline (0,9 % NaCl) équivalente au standard McFarland 0,5 (~ 10<sup>8</sup> UFC/ml).

Cette suspension peut également être préparée à partir d'une culture en bouillon Mueller-Hinton obtenue après incubation à 37° C au bain-marie agité pendant 3 à 5 h, et dont la densité est ajustée au standard McFarland 0,5.

#### - Milieu

Gélose Mueller-Hinton

#### - Ensemencement

Diluer la suspension inoculum au 1/100 (~ 10<sup>6</sup> UFC/ml) et ensemercer par écouvillonnage ou par inondation en respectant les mesures de sécurité nécessaires.

Cas particulier : Pour *Staphylococcus aureus* et pour l'oxacilline, diluer la suspension inoculum au 1/10 (~ 10<sup>7</sup> UFC/ml) et incuber à 30°C sur milieu non supplémenté en chlorure de sodium ou à 37°C sur milieu hypersalé (2 à 4%).

Prolonger éventuellement l'incubation jusqu'à 48 h si la croissance apparaît faible après 24 h.

#### - Lecture

Après 18-24 h d'incubation à 35-37° C.

#### - Antibiotiques à étudier

##### ❖ *Enterobacteriaceae*

<b>Amoxicilline ou Ampicilline</b>	<b>Imipénème</b>
<b>Amoxicilline + ac. Clavulanique ou ampicilline/sulbactam</b>	<b>Chloramphénicol</b>
<b>Ticarcilline</b>	<b>Tétracycline / Doxycycline (si Shigella)</b>
<b>Pipéracilline ou Mezlocilline</b>	<b>Gentamicine</b>
<b>Mécillinam</b>	<b>Kanamycine</b>
<b>Céfalotine</b>	<b>Tobramycine</b>
<b>Céfoxitine</b>	<b>Cotrimoxazole</b>
<b>Ceftriaxone ou céfotaxime</b>	<b>Colistine</b>
<b>Ceftazidime</b>	<b>Nétilmicine</b>
<b>Céfixime</b>	<b>Acide nalidixique</b>
<b>Aztréonam</b>	<b>Norfloxacin ou Péfloxacin ou ofloxacin</b>
	<b>Ciprofloxacine</b>
	<b>Nitrofuranes</b>

### Concentrations critiques, diamètres critiques et lecture interprétative

Antibiotique	Charge disque	Concentration critique mg/ml		Diamètre critique mm	
		S	R	S	R
<b>C</b>	<b>30</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>23</b>	<b>19</b>
<b>TE</b>	<b>30 UI</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>19</b>	<b>17</b>
<b>CS</b>	<b>50</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>15</b>	<b>15</b>
<b>SXT</b>	<b>1,25/23,75</b>	<b>2/38</b>	<b>8/152</b>	<b>16</b>	<b>10</b>
<b>NT</b>	<b>300</b>	<b>32</b>	<b>128</b>	<b>17</b>	<b>14</b>
<b>NA</b>	<b>305</b>	<b>5</b>	<b>16</b>	<b>20</b>	<b>15</b>
<b>CIP</b>	<b>5</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>25</b>	<b>22</b>
<b>NOR</b>	<b>5</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>25</b>	<b>22</b>
<b>PEF</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>22</b>	<b>16</b>

❖ *Pseudomonas aeruginosa*

<b>Ticarcilline</b>	<b>Kanamycine (Résistance naturelle)</b>
<b>Ticarcilline/ac. clavulanique</b>	<b>Gentamicine</b>
<b>Pipéracilline</b>	<b>Tobramycine</b>
<b>Aztréonam</b>	<b>Amikacine</b>
<b>Cefsulodine</b>	<b>Nétilmicine</b>
<b>Ceftazidime</b>	<b>Colistine</b>
<b>Imipénème ou méropénème</b>	<b>Péfloxacine</b>
<b>Aztréonam</b>	<b>Ciprofloxacine</b>
<b>Chloramphénicol</b>	

- Concentrations critiques, diamètres critiques et lecture interprétative

Antibiotique	❖ Autres bacilles à Gram négatif non fermentaires ( <i>Acinetobacter spp.</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> ....)			Diamètre critique mm	
	Charge disque	Concentration critique mg/ml	R	S	R
TIC	75	16	64	22	18
TCC	75/10	16/2	64/2	22	18
PIP	Ticarcilline	16	64	Amikacine	12
IMP	10	4	8	22	17
ATM	Ticarcilline/ac. clavulanique	4	32	Netilmicine	15
CAZ	Pipracilline	4	32	Tobramycine	15
CFS	30	8	32	22	14
CFM	Pipracilline/tazobactam	4	32	Chloramphénicol	15
TM	10	4	4	21	14
AN	Ceftazidime	4	4	Tétracycline	14
GM	30	8	16	17	15
NET	15	4	4	16	14
CS	Imipénème	4	4	Colistine	17
CIP	50	4	4	19	17
RIF	Gentamicine	4	4	Cotrimoxazole	19
	5	1	2	22	19
	30	4	19	19	14

**- Concentrations critiques, diamètres critiques et lecture interprétative**

Antibiotique	Charge disque	Concentration critique mg/ml		Diamètre critique mm	
		S	R	S	R
TIC	75	16	64	22	18
TCC	75/10	16//2	64/2	22	18
PIP	75	16	64	18	12
IMP	10	4	8	22	17
ATM	30	4	32	20	15
CAZ	30	4	32	21	15
CFM	30	4	32	21	15
TM	10	4	4	16	14
AN	30	8	16	17	15
GM	15	4	4	16	14
NET	30	4	4	19	17
C	30	8	16	23	19
TE	30 UI	4	8	19	17
CS	50	4	4	22	19
PEF	5	1	4	22	16
CIP	5	1	2	22	19
SXT	1,25/23,75	2/38	8/152	16	10

❖ *Staphylococcus spp.*

<b>Pénicilline G</b>	<b>Acide fusidique</b>
<b>Oxacilline (sur MH 5% NaCl)</b>	<b>Cotrimoxazole</b>
<b>Céfoxitine</b>	<b>Chloramphénicol</b>
<b>Gentamicine</b>	<b>Tétracycline</b>
<b>Kanamycine</b>	<b>Péfloxacin</b>
<b>Tobramycine</b>	<b>Ciprofloxacine</b>
<b>Erythromycine</b>	<b>Fosfomycine</b>
<b>Lincomycine</b>	<b>Vancomycine</b>
<b>Pristinamycine</b>	



**- Concentrations critiques, diamètres critiques et lecture interprétative**

Antibiotique	Charge disque	Concentration critique mg/ml		Diamètre critique mm	
		S	R	S	R
PG	6	0,25	0,25	29	29
OX	5	2	2	20	20
FOX	30			27	23
K	30 UI	8	16	15	133
TM	10	1	1	20	20
GM	15	1	1	20	20
E	15 UI	1	4	22	17
L	15	2	8	21	17
P	15	1	2	22	19
PEF	5	1	4	22	16
CIP	5	1	2	22	19
C	30	8	16	23	19
TE	30 UI	4	8	19	17
FA	10	2	16	22	15
RIF	30	0,5	16	29	14
VAN	30	4	8	17	-
SXT	1,25/23,75	2/38	8/152	16	10

❖ *Enterococcus* spp.

Ampicilline	Chloramphénicol
Oxacilline	Tétracycline
Kanamycine	Erythromycine
Gentamicine	Lincomycine ou clindamycine
Nitrofuranes	Pristinamycine
Vancomycine	Cotrimoxazole
	Fluoroquinolones

**- Concentrations critiques, diamètres critiques et lecture interprétative**

Antibiotique	Charge disque	Concentration critique mg/ml		Diamètre critique mm	
		S	R	S	R
AM	10	4	16	19	14
K	1000	250	500	14	12
GM	500	250	500	17	11
C	30	8	16	23	19
TE	30 UI	4	8	19	17
E	15 UI	1	4	22	17
L	15	2	8	21	17
P	15	1	2	22	19
SXT	1,25/23,75	2/38	8/152	16	10
VAN	30	4	8	17	-

**3.5.2 - *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* spp.**

**- Inoculum**

A partir d'une culture de 18-24 h sur gélose Mueller-Hinton additionnée de 5 % de sang de mouton, préparer une suspension en bouillon Mueller- Hinton ou en solution saline (0,9 % NaCl) équivalente au standard McFarland 0,5 (~10<sup>8</sup> UFC/ml)

**- Milieu**

Gélose Mueller-Hinton additionnée de 5 % de sang de mouton.

Pour le cotrimoxazole, utiliser une gélose Mueller-Hinton + 5 % de sang de cheval hémolysé.

**- Ensemencement**

Diluer la suspension inoculum au 1/10 (~ 10<sup>7</sup> UFC/ml) et ensemencer par écouvillonnage ou par inondation en respectant les mesures de sécurité nécessaires.

**- Lecture**

Après 18-24 h d'incubation à 35-37°C

**- Antibiotiques à étudier**

❖ *Streptococcus pneumoniae*

<b>Pénicilline G</b>	<b>Chloramphénicol</b>
<b>Ampicilline ou amoxicilline</b>	<b>Cotrimoxazole</b>
<b>Oxacilline</b>	<b>Fosfomycine</b>
<b>Céfotaxime ou ceftriaxone</b>	<b>Lincomycine</b>
<b>Gentamicine</b>	<b>Pristinamycine</b>
<b>Kanamycine</b>	<b>Norfloxacine</b>
<b>Tétracycline</b>	<b>Vancomycine</b>
<b>Erythromycine</b>	

**- Concentrations critiques, diamètres critiques et lecture interprétative**

Antibiotique	Charge disque	Concentration critique mg/ml		Diamètre critique mm	
		S	R	S	R
<b>OX</b>	<b>5</b>			<b>21</b>	<b>-</b>
<b>K</b>	<b>1000</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>14</b>	<b>10</b>
<b>GM</b>	<b>500</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>17</b>	<b>11</b>
<b>C</b>	<b>30</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>23</b>	<b>19</b>
<b>TE</b>	<b>30 UI</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>19</b>	<b>17</b>
<b>E</b>	<b>15 UI</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>22</b>	<b>17</b>
<b>L</b>	<b>15</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>21</b>	<b>17</b>
<b>P</b>	<b>15</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>19</b>	<b>-</b>
<b>SXT</b>	<b>1,25/23,75</b>	<b>2/38</b>	<b>8/152</b>	<b>16</b>	<b>10</b>
<b>CIP</b>	<b>5</b>	<b>0,12</b>	<b>2</b>	<b>30</b>	<b>19</b>
<b>VAN</b>	<b>30</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>17</b>	<b>-</b>

❖ *Streptococcus* spp. (autres que *S. pneumoniae*)

<b>Pénicilline G</b> <b>Ampicilline ou amoxicilline</b> <b>Oxacilline</b> <b>Gentamicine</b> <b>Kanamycine</b> <b>Tétracycline</b> <b>Erythromycine</b>	<b>Lincomycine</b> <b>Pristinamycine</b> <b>Chloramphénicol</b> <b>Cotrimoxazole</b> <b>Fluoroquinolones</b> <b>Vancomycine</b>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**- Concentrations critiques, diamètres critiques et lecture interprétative**

Antibiotique	Charge disque	Concentration critique mg/ml		Diamètre critique mm	
		S	R	S	R
<b>OX</b>	<b>5</b>			<b>26</b>	<b>-</b>
<b>K</b>	<b>1000</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>14</b>	<b>10</b>
<b>GM</b>	<b>500</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>17</b>	<b>11</b>
<b>C</b>	<b>30</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>23</b>	<b>19</b>
<b>TE</b>	<b>30 UI</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>19</b>	<b>17</b>
<b>E</b>	<b>15 UI</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>22</b>	<b>17</b>
<b>L</b>	<b>15</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>21</b>	<b>17</b>
<b>P</b>	<b>15</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>19</b>	<b>-</b>
<b>SXT</b>	<b>1,25/23,75</b>	<b>2/38</b>	<b>8/152</b>	<b>16</b>	<b>10</b>
<b>CIP</b>	<b>5</b>	<b>0,12</b>	<b>2</b>	<b>30</b>	<b>19</b>
<b>VAN</b>	<b>30</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>17</b>	<b>-</b>

### 3.5.3 - *Haemophilus influenzae*

#### - Inoculum

A partir d'une culture de 18-24 h sur gélose chocolat PolyViteX®, préparer une suspension en bouillon Mueller-Hinton ou en solution saline (0,9 % NaCl) équivalente au standard McFarland 0,5 (~ 10<sup>7</sup> UFC/ml).

#### - Milieu

Gélose chocolat PolyViteX® ou Milieu HTM (Mueller-Hinton + NAD 15 mg/l + hémine 15 mg/l + extrait de levure 5 g/l).

#### - Ensemencement

Diluer au 1/10 la suspension inoculum (~10<sup>6</sup> UFC/ml) et ensemercer par écouvillonnage ou par inondation en respectant les mesures de sécurité nécessaires.

#### - Lecture

Après 18-24 h d'incubation à 35-37° C.

#### - Antibiotiques à étudier

<b>Ampicilline</b>	<b>Chloramphénicol</b>
<b>Amoxicilline/ac. clavulanique</b>	<b>Kanamycine</b>
<b>Céfalotine</b>	<b>Gentamicine</b>
<b>Céftriaxone</b>	<b>Fluoroquinolones</b>
<b>Tétracycline</b>	<b>Cotrimoxazole</b>

#### - Concentrations critiques, diamètres critiques et lecture interprétative

Antibiotique	Charge disque	Concentration critique mg/ml		Diamètre critique mm	
		S	R	S	R
AM	2	-	1	-	20
CF	30		8		17
AMC	20/10	2/1		21	
TE	30 UI	2	4	23	18
SXT	1,25/23,75	0,5/9,5	1/19	24	-
C	30	2	4	28	24
RIF	30	2	4	24	20
K	30 UI	8	16	18	15
GM	15	2	4	15	14
NA	30				21

### 3.5.4 - *Neisseria meningitidis*

#### - Inoculum

A partir d'une culture de 18-24 h sur gélose chocolat PolyViteX®, préparer une suspension en tampon phosphate M/15 pH 7,2 équivalente au standard McFarland 0,5 (~ 10<sup>6</sup> UFC/ml).

#### - Milieu

Gélose Mueller-Hinton additionnée de 5% de sang de mouton.

#### - Ensemencement

Ensemencer la suspension inoculum par écouvillonnage ou par inondation en respectant les mesures de sécurité nécessaires. Disposer les disques à une distance de 60 mm, centre à centre, afin d'éviter le chevauchement des zones d'inhibition.

#### - Lecture

Après 18 à 20 h d'incubation à 35-37° C en atmosphère contenant 5 % de CO<sub>2</sub>.

#### - Antibiotiques à étudier

<b>Pénicilline G</b>	<b>Chloramphénicol</b>
<b>Oxacilline</b>	<b>Spiramycine</b>
<b>Amoxicilline</b>	<b>Ciprofloxacine</b>
<b>Céfotaxime ou ceftriaxone</b>	<b>Cotrimoxazole</b>
<b>Gentamicine</b>	<b>Erythromycine</b>

#### - Concentrations critiques, diamètres critiques et lecture interprétative

Antibiotique	Charge disque	Concentration critique mg/ml		Diamètre critique mm	
		S	R	S	R
<b>OX</b>	<b>5</b>			<b>18</b>	<b>-</b>
<b>OX</b>	<b>1</b>			<b>11</b>	<b>-</b>
<b>C</b>	<b>30</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>30</b>	<b>-</b>
<b>RIF</b>	<b>30</b>	<b>0,25</b>	<b>-</b>	<b>30</b>	<b>-</b>

### 3.5.5 - *Neisseria gonorrhoeae*

#### - Inoculum

A partir d'une culture de 18-24 h sur gélose chocolat PolyViteX®, préparer une suspension en tampon phosphate M/15 pH 7,2 équivalente au standard McFarland 1 (~10<sup>8</sup> UFC/ml).

#### - Milieu

Gélose chocolat PolyViteX®

#### - Ensemencement

Ensemencer la suspension inoculum diluée au 1/100 ou ajustée au standard McFarland 0.5 (~10<sup>6</sup> UFC/ml) par écouvillonnage ou par inondation en respectant les mesures de sécurité nécessaires. Disposer les disques à une distance de 60 mm, centre à centre, afin d'éviter le chevauchement des zones d'inhibition.

#### - Lecture

Après 18-24 h d'incubation à 35-37° C en atmosphère contenant 5 % de CO<sub>2</sub>, et, si la croissance est insuffisante, après 36-40 h.

#### - Antibiotiques à étudier

<b>Pénicilline G ou amoxicilline</b>	<b>Chloramphénicol</b>
<b>Ceftriaxone</b>	<b>Erythromycine</b>
<b>Spectinomycine</b>	<b>Acide nalidixique</b>
<b>Tétracycline</b>	<b>Ciprofloxacine ou ofloxacine</b>

#### - Concentrations critiques, diamètres critiques et lecture interprétative

Antibiotique	Charge disque	Concentration critique mg/ml		Diamètre critique mm	
		S	R	S	R
SPT	100	64	64	20	20
TE	30 UI	1	4	-	19
NA	30				25

#### CONTROLE DE QUALITE INTERNE

Un contrôle de qualité interne doit être organisé pour s'assurer de la validité des résultats obtenus. Les souches de référence recommandées sont les suivantes :

*Escherichia coli* CIP 7624 (ATCC 25922),

*Pseudomonas aeruginosa* CIP 76110 (ATCC 27853),

*Staphylococcus aureus* CIP 7625 (ATCC 25923),

*Providencia stuartii* CIP 107808,

*Streptococcus pneumoniae* CIP 104485

## 3.6. ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES

### 3.6.1. Types de prélèvement

#### ❖ *Frottis cervico-vaginal de dépistage :*

Parmi les actes médicaux nécessaires au dépistage et au diagnostic des lésions précancéreuses et cancéreuses du col utérin, le frottis cervico-vaginal de dépistage (Papanicolaou) doit rester l'examen de première intention, qui est facile à pratiquer, indolore et fiable.

Cet examen permet aussi d'apprécier l'imprégnation hormonale du tractus génital de la femme et accessoirement de faire le diagnostic d'infections génitales.

#### ❖ *Liquides biologiques :*

Urines, expectorations, lavages broncho-alvéolaires, brossages des muqueuses, épanchements des séreuses (plèvre, péricarde, péritoine), de la synoviale articulaire et du liquide céphalo-rachidien (LCR), écoulements mamelonnaires spontanés ou provoqués. Le volume de prélèvement souhaité est de 5 à 10 ml.

#### ❖ *Ponction à l'aiguille fine de masses palpables :*

Les masses solides ou kystiques accessibles à la vue ou à l'Echographie peuvent faire l'objet d'une ponction à l'aide d'une aiguille fine et le produit de ponction étalé sur lames ; on réalisera aussi des frottis d'ulcérations du mamelon ou des lésions eczématiformes après grattage.

Le matériel recueilli lors de la ponction est étalé sur des lames de verre en couches minces, puis fixés à la laque ou à l'air ambiant (préciser sur la demande d'examen le mode de fixation). Il faut un lot de lames suffisant.

Lorsqu'on retire du liquide, celui-ci doit être adressé rapidement au laboratoire pour une centrifugation ou une cytocentrifugation. En cas de délai, la préfixation est indispensable et une conservation à + 4°C.

#### ❖ *Biopsies et pièces opératoires* (si le Centre de santé est doté d'un bloc opératoire)

Les échantillons de petite taille (biopsies endoscopiques, biopsies à la pince, biopsie partielle cutanée ou biopsie exérèse, etc.) peuvent être fixés dans du liquide de Bouin (éviter alors les contenants en plastique), ou dans du formol à 10%.

Les échantillons de grande taille en l'occurrence les pièces opératoires peuvent être adressés au laboratoire après fixation dans du formol à 10% dans un récipient de grande taille pouvant contenir 5 à 10 fois le volume de la pièce en fixateur et à ouverture large. Il est recommandé de ne pas sectionner la pièce pour permettre au Pathologiste d'en faire un examen macroscopique correct et des prélèvements de bonne qualité.

### 3.6.2. Matériel de laboratoire nécessaire

#### ❖ *Frottis cervico-vaginal de dépistage*

Spéculums, Spatules d'Ayre, brosses endocervicales, laque cytofixante ou mélange alcool-ether, lames porte-objet propres, lamelles, milieu de montage, colorants et solvants

#### ❖ *Liquides biologiques*

Flacons propres, alcool 50°, EDTA, lames porte-objet propres, lamelles, milieu de montage, colorants et solvants

❖ ***Biopsies et pièces opératoires***

Récipients propres, formol dilué à 10% tamponné

Les échantillons de petite taille (biopsies endoscopiques, biopsies à la pince, biopsie partielle cutanée ou biopsie exérèse, etc.) peuvent être fixés dans du liquide de Bouin (éviter alors les contenants en plastique), ou dans du formol à 10%.

Les échantillons de grande taille en l'occurrence les pièces opératoires peuvent être adressés au laboratoire après fixation dans du formol à 10% dans un récipient de grande taille pouvant contenir 5 à 10 fois le volume de la pièce en fixateur et à ouverture large. Il est recommandé de ne pas sectionner la pièce pour permettre au Pathologiste d'en faire un examen macroscopique correct et des prélèvements de bonne qualité.

### **3.6.3. Modes de prélèvement**

❖ ***Frottis cervico-vaginal de dépistage***

Les conditions de prélèvements sont une abstinence d'au moins 48 heures, une absence de menstrues et de traitement local par des ovules au moment du prélèvement.

Commencer par moucher le col afin de diminuer les sécrétions. A l'aide de la spatule réaliser un frottis à partir des sécrétions vaginales, d'un prélèvement exocervical et grâce à la brosse endocervicale faire un prélèvement endocervical et l'étaler sur une lame.

❖ ***Liquides biologiques***

Le seul impératif est que le prélèvement soit fait dans des conditions d'asepsie et que l'échantillon soit mis dans un récipient propre.

❖ ***Biopsies et pièces opératoires***

Les modes de prélèvements sont variables. Il faut éviter de prélever des zones de nécrose, des caillots sanguins, ou des foyers de calcifications pathologiques. Autant que possible, le prélèvement en cas de biopsie sous contrôle de la vue se fera à cheval entre la zone saine et la zone pathologique.

*Tous ces échantillons seront accompagnés d'une fiche d'examen anatomo-pathologique sur laquelle seront mentionnés les données personnelles du patient, un résumé clinique et paraclinique et des hypothèses diagnostiques.*

### **3.6.4. Procédures de conservation**

❖ ***Frottis cervico-vaginal de dépistage***

Fixation immédiate des frottis à l'aide de la laque cytofixiante ou immersion des lames fraîches dans un volume alcool-ether pendant 4-5 min

❖ ***Liquides biologiques***

Mélange à volume égal du liquide prélevé avec de l'alcool à 50° dans un récipient propre.

Si le liquide est hémorragique, il faut le mettre dans un tube à EDTA.

❖ ***Biopsies et pièces opératoires***

Immersion dans 5 à 10 fois le volume de l'échantillon avec du formol tamponné à 10%



### **3.6.5. Procédures d'acheminement**

*Tous ces échantillons doivent être acheminés au laboratoire dans des délais raisonnables.*

#### **❖ Frottis cervico-vaginal de dépistage**

Mettre les lames qui auront été préalablement identifiées pour chaque patient dans des boîtes de transport de lames

#### **❖ Liquides biologiques**

Chaque flacon devra porter le nom et le prénom du patient, son âge, son sexe et le service de provenance. Eviter d'écrire sur les couvercles des récipients et utiliser des récipients qui ferment hermétiquement.

#### **❖ Biopsies et pièces opératoires**

Chaque flacon devra porter le nom et le prénom du patient, son âge, son sexe et le service de provenance. Eviter d'écrire sur les couvercles des récipients et utiliser des récipients qui ferment hermétiquement.

