



Direction Générale de la Santé

Direction des Laboratoires

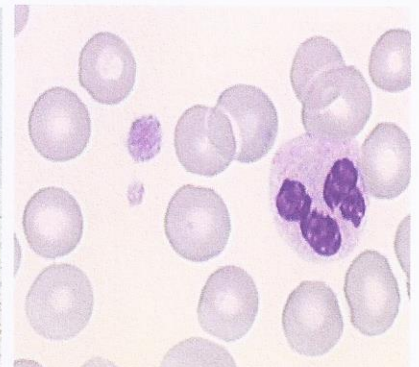
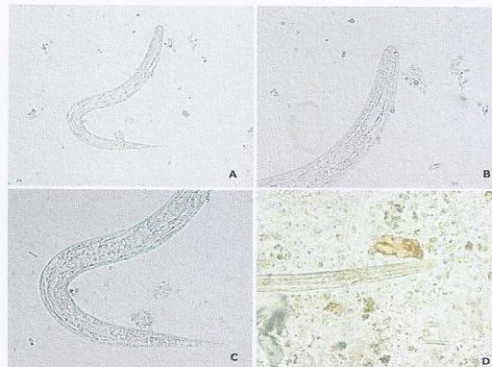
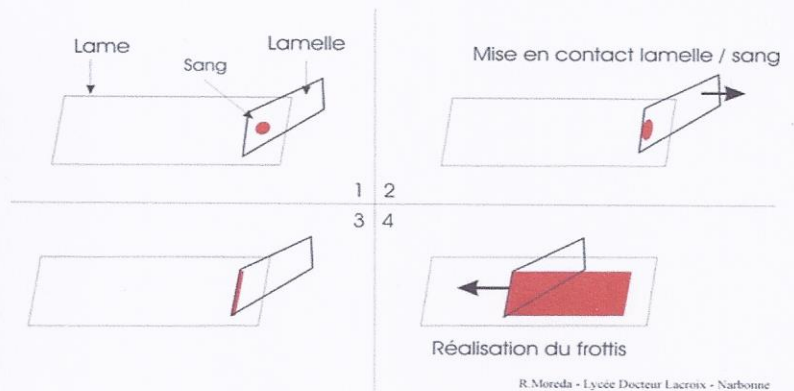
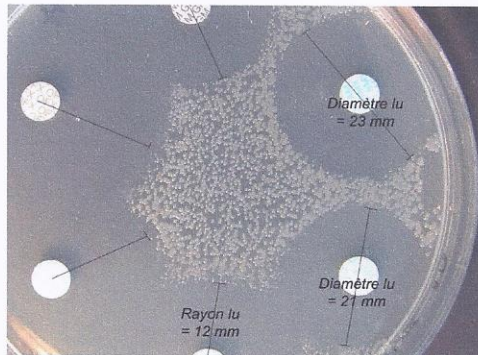


Manuel des techniques de Laboratoires

2e édition

A l'usage des personnels de laboratoire

Avril 2015





Direction Générale de la Santé

Direction des Laboratoires



Manuel des techniques de Laboratoires

2e édition

A l'usage des personnels de laboratoire

Avril 2015

SOMMAIRE

Rubriques	Pages	Rubriques	Pages
Préface	P. 2		
		Biochimie	P. 45
Paquet d'équipements	P. 3		
		Bactériologie	P. 84
Hématologie	P. 5		
		Antibiogramme	P. 116
Parasitologie	P. 34		

PREFACE

Professeur Ahmad Iyane Sow
Directeur des Laboratoires

Le manuel des procédures techniques a été élaboré pour aider le personnel des laboratoires dans la pratique des analyses. Il se veut un document de chevet pour le personnel à la paillasse.

Il comprend :

- la liste minimale des analyses que chaque laboratoire doit être en mesure de réaliser dans les normes selon son niveau : c'est le paquet minimum d'activités.
- la liste des équipements permettant de réaliser ces analyses,
- le descriptif des examens de laboratoires par discipline.

Cette nouvelle version, outre le changement de présentation, est marquée par :

- . le changement de titre qui devient : "Manuel des Techniques de Laboratoire", pour éviter toute confusion liée à la dénomination de procédures,
- . la description des analyses de Biochimie qui ont manqué à la première version,
- . la mise à jour de techniques comme l'antibiogramme, calquées sur les normes internationales.

C'est pour moi l'occasion de remercier tous les collègues qui ont participé à la relecture, la correction, et le complément de l'ancienne version dans les domaines de la Parasitologie, de la Bactériologie et de l'Hématologie.

Remerciements aussi aux collègues de Biochimie qui ont permis une amélioration notable de la compétence de cet ouvrage.

PAQUET MINIMUM D'EQUIPEMENT

Pour les Laboratoires de niveau périphérique

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
Minuterie	2
Réfrigérateur avec congélateur	1
Spectrophotomètre UV-VIS	1

Pour les Laboratoires de niveau intermédiaire

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/H	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
Étuves bactériologiques	2
Glacière et accumulateurs de froid	4
Micropipettes à volume variable 0 à 1000 µl	2
Microscopes optiques	3
Minuterie	2
Réfrigérateur avec congélateur	3
Rotateur	1
Spectrophotomètre UV-VIS	2

Pour les Laboratoires de niveau national

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
Microscopes optiques	3
Minuterie	2
Réfrigérateur avec congélateur	3
Rotateur	1
Spectrophotomètre	1
Spectrophotomètre UV-VIS	2

ANALYSES D'HEMATOLOGIE

Paquet Minimum d'activités en Hématologie

Pour les Laboratoires de niveau périphérique

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

Pour les Laboratoires de niveau intermédiaire

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

Pour les Laboratoires de niveau national

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. 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*).

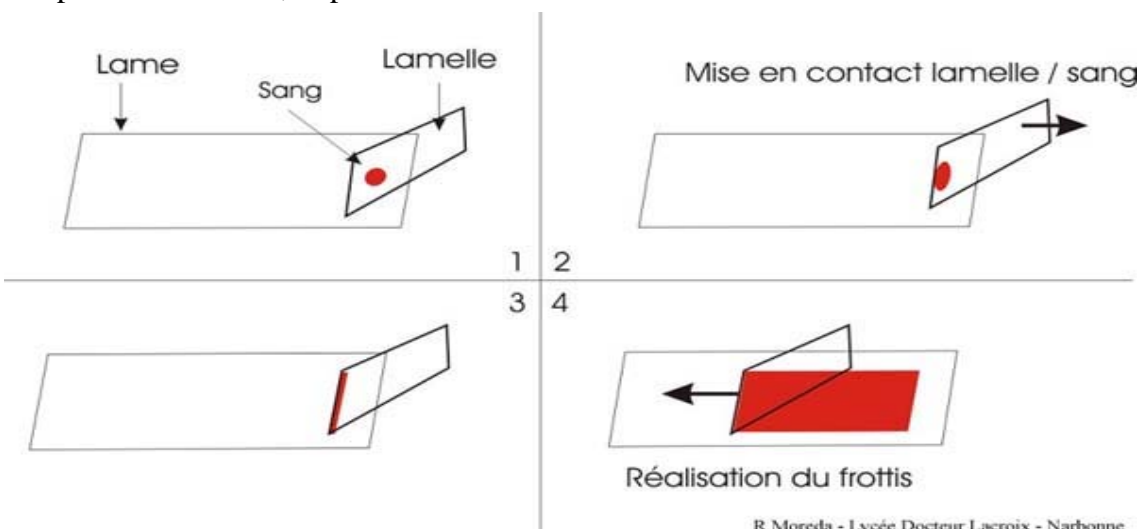
Il doit comporter :

- ◆ 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 (μ^3)
 - Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH)
 $TCMH = Hb / \text{nombre de GR (en millions)} \times 10$
Il est exprimé en picogramme (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



R. Moreda - Lycée Docteur Lacroix - Narbonne

✚ **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)

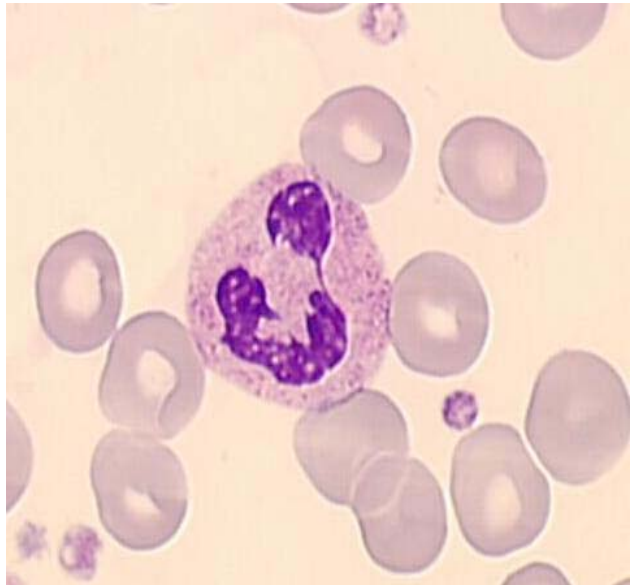
▪ *Coloration au Giemsa*

- 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*

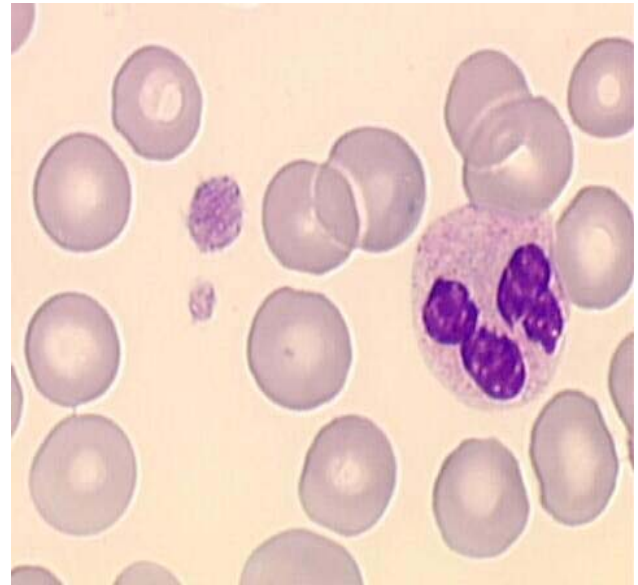
- Laisser sécher la lame à l'air, en position inclinée, après avoir essuyé la face inférieure de la lame avec une compresse.
- Attendre au moins 5 minutes avant l'examen microscopique du frottis.

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

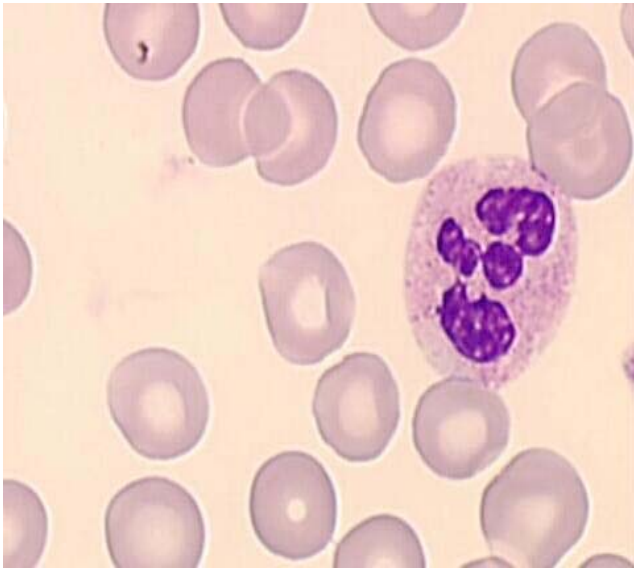


Polynucléaire neutrophile :

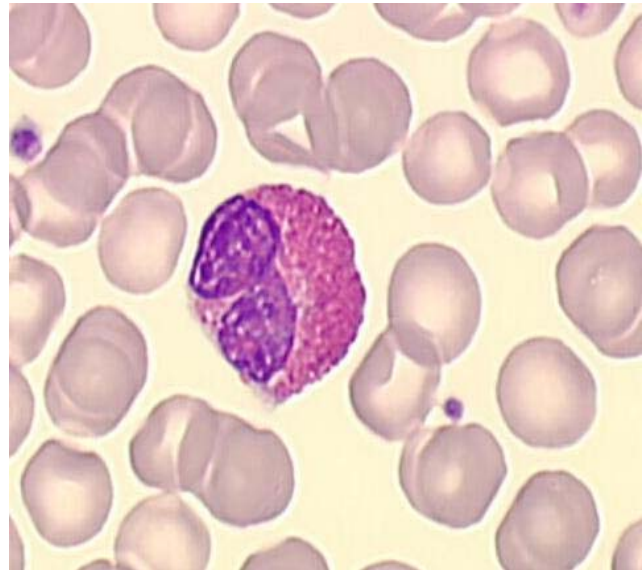
- Taille: 12 à 14 μ m, arrondi
- Noyau : 3 à 5 lobes
- Cytoplasme : acidophile, petites granulations marron clair (granulations neutrophiles)



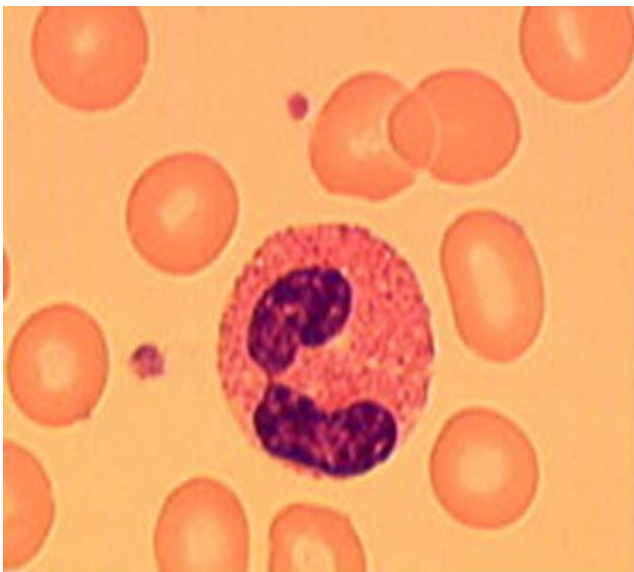
Polynucléaire neutrophile : La chromatine du noyau forme des mottes denses avec de petits espaces clairs. Deux plaquettes sont visibles à gauche de l'image.



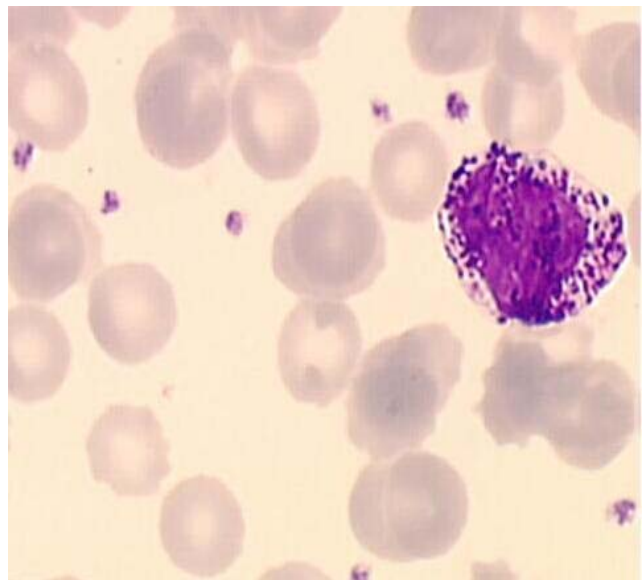
Polynucléaire neutrophile : Le noyau est formé ici de 5 lobes reliés entre eux par un fin fil de chromatine. Le cytoplasme est rosé et rempli de petites granulations



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

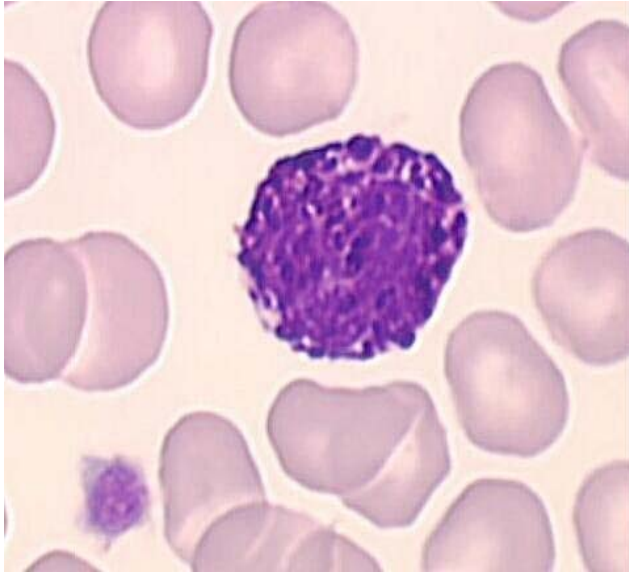


Polynucléaire éosinophile

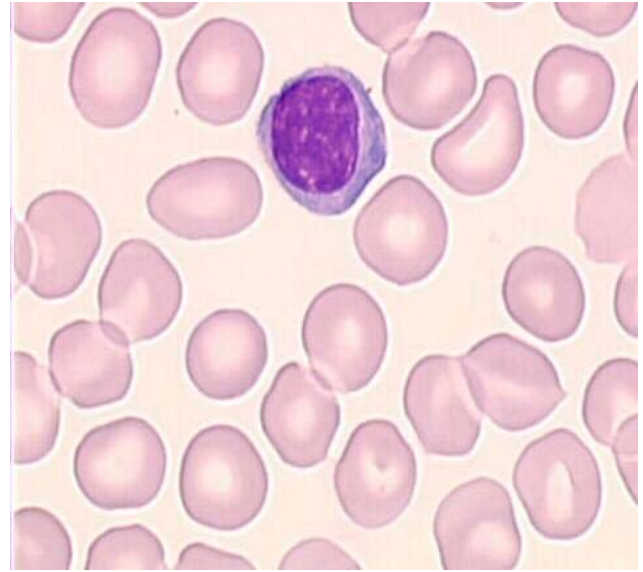


Polynucléaire basophile

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

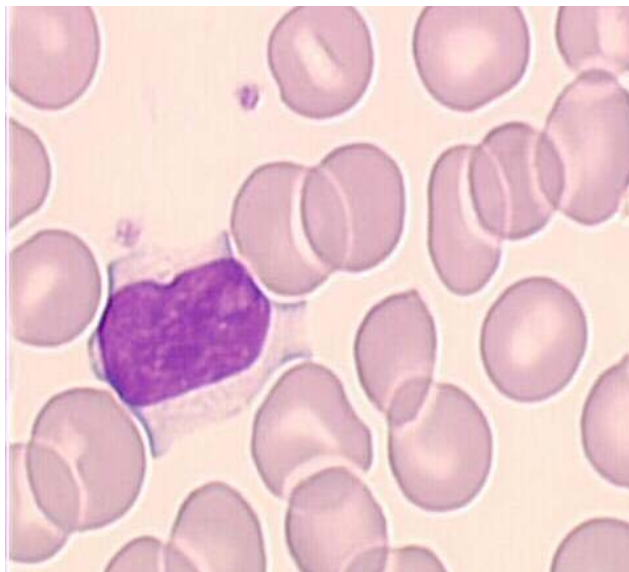


Polynucléaire basophile: les nombreuses granulations violet foncé sont le critère majeur d'identification de la cellule.



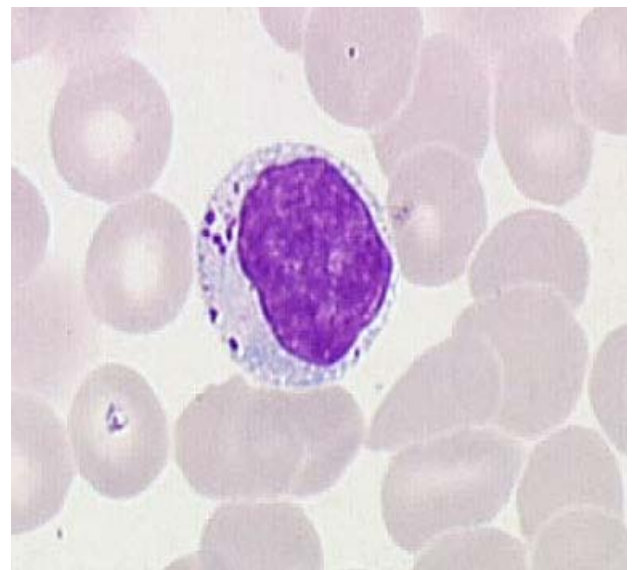
Lymphocyte (Petit) :

- Taille: 9-11 μ arrondi
- Noyau: rond et dense
- Cytoplasme: basophile clair
- Granulations: néant



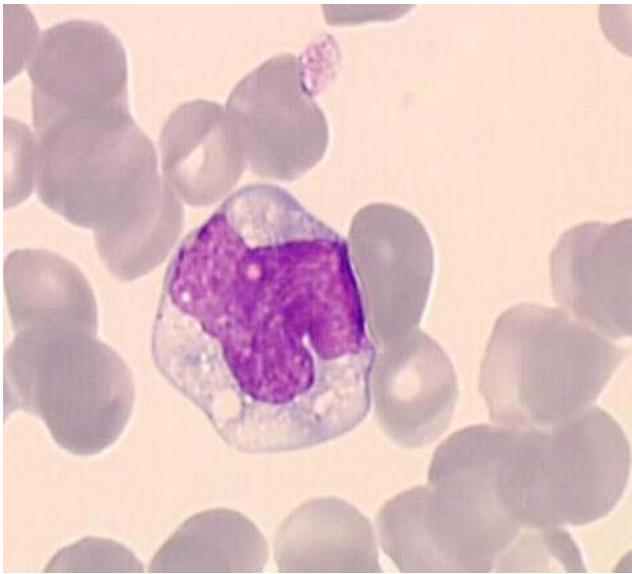
Lymphocyte (Grand) :

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



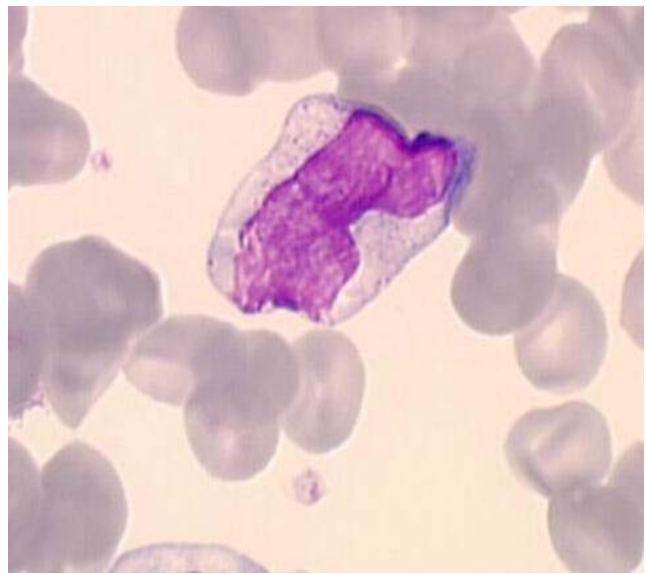
Lymphocyte (Granuleux) :

- Taille: 10-14 μ arrondi
- Noyau: rond, ovale
- Cytoplasme: bleu clair
- Quelques granulations azurophiles



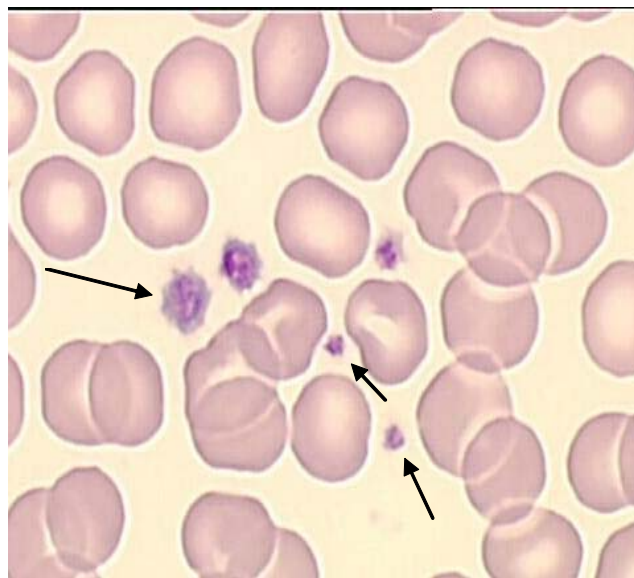
Monocyte :

- Taille: 18-20 μ 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



Plaquettes :

- 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
Hématies 10.6/μL (Tera/L)	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
Leucocytes 10 ³ /μL (Giga/L)	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
Plaquettes 10 ³ /μL (Giga/L)	150 à 400	150 à 400	150 à 400	150 à 400	150 à 400	150 à 400
Hémoglobine g/dL	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
Hématocrite %	44 à 58	38 à 44	36 à 44	36 à 44	37 à 45	H : 40 à 50 F : 37 à 47
VGM fl	100 à 120	85 à 96	70 à 86	73 à 89	77 à 91	82 à 98
TCMH pg	34 à 38	24 à 34	23 à 31	24 à 30	24 à 30	> ou = 27
CCMH g/dL	32 à 36	32 à 36	32 à 36	32 à 36	32 à 36	32 à 36

 *Formule leucocytaire*

en 10 ³ /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
 - homme adulte : 3 à 10 mm
 - femme adulte : 4 à 20 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.

c) 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*

- Méta bisulfite de sodium en poudre
- Balance de précision
- Spatule
- 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 de précision à affichage électronique
- Calibrer l'appareil
- A 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 :

- En pratique, il est possible de réduire la quantité de poudre (ex : 0,1g pour 5ml).
- 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

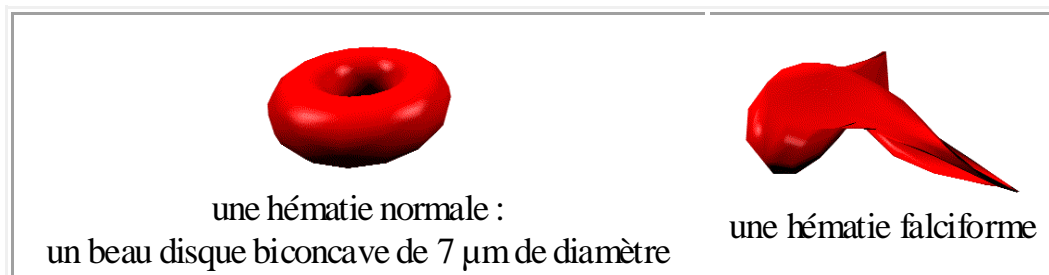
- déposer sur une lame propre une goutte de sang et une goutte de la solution de métabisulfite
- mélanger doucement
- déposer sur le mélange une lamelle en évitant les bulles d'air
- essuyer délicatement l'excès du mélange avec du papier buvard (à défaut utiliser une compresse)
- sceller les bords de 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*

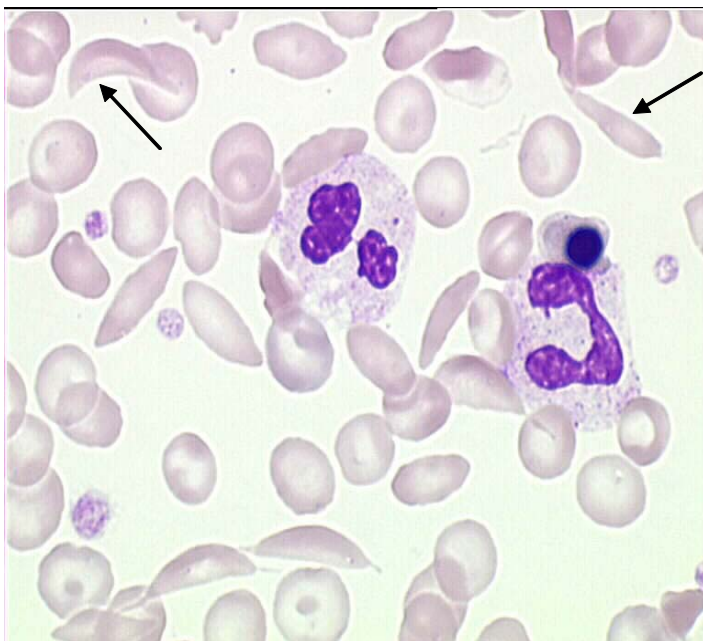
Elle se fait au bout de 15 à 30 mn au microscope à un grossissement 40.

▪ *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

d) 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 vitales utilisant le bleu de crétyl ou le bleu de méthylène : 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 de transfert
- Lame

▪ *Technique*

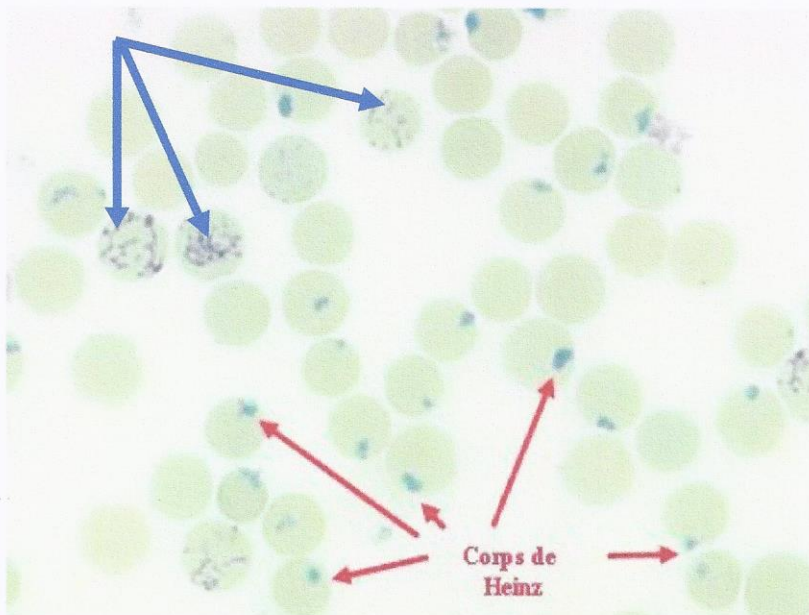
- Dans un tube à hémolyse, déposer 1 goutte de sang et 1 goutte de bleu de crétyl (si le taux d'Hb est inférieur à 11 g/dL, mettre 2 gouttes de sang et 1 goutte de bleu de crétyl)
- Incuber au bain marie à 37°C pendant 20 mn
- Puis confectionner un frottis et lire au microscope au grossissement 100 avec 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*

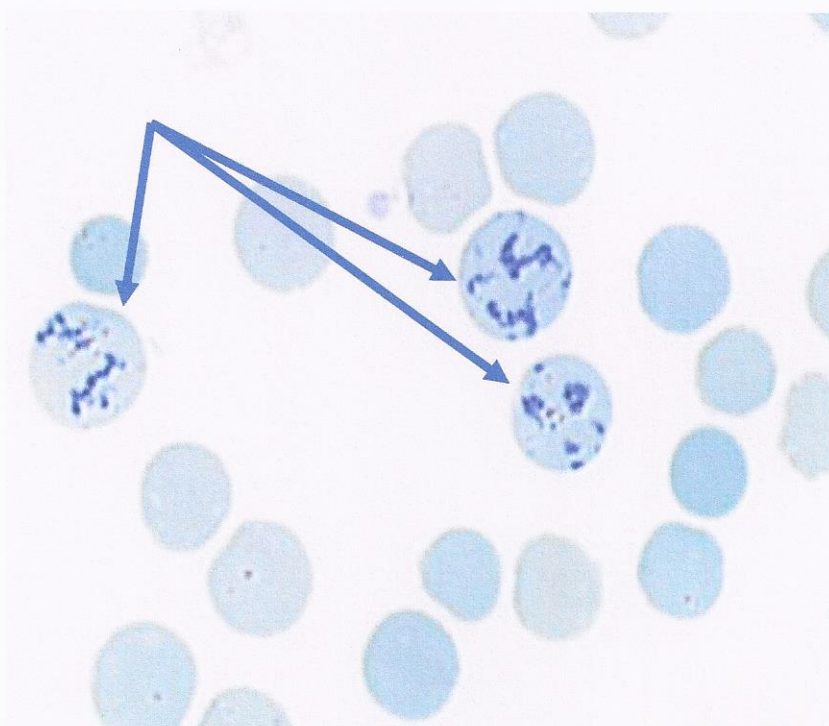
Le résultat est exprimé en pourcentage et surtout en valeur absolue de réticulocytes par mm³ de sang. Le taux normal est de :

- 0,2 à 2% chez l'adulte (généralement 0,5 à 1,5%) soit 80 000 – 120 000 / mm³

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



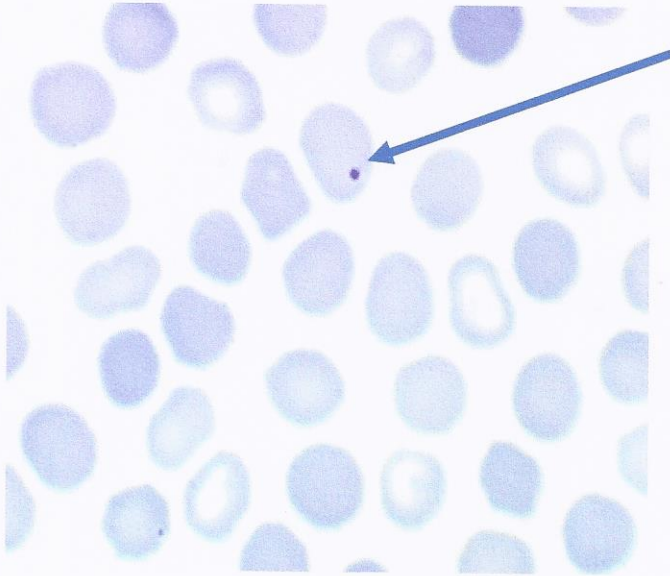
Réticulocytes avec
flèches bleues



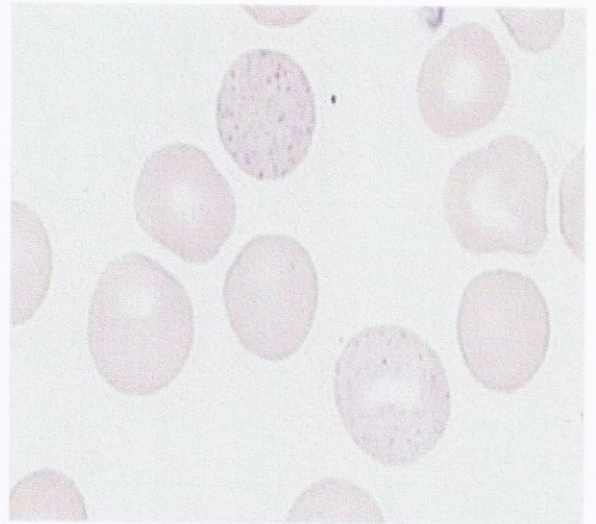
**Frottis avec présence de
réticulocytes (3 réticulocytes
sont visibles sur chaque
frottis)**

▪ *Causes d'erreurs*

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



Corps de Jolly



Hématies à ponctuations basophiles

e) 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*

1°) La peau non anesthésiée et désinfectée est étirée à l'endroit où se situe le ganglion à ponctionner;

2°) Etapes

- Tenir le ganglion entre le pouce et l'index afin de bien l'immobiliser
- Introduire l'aiguille dans le ganglion à ponctionner
- Changer l'aiguille de direction sans la retirer tout en massant le ganglion maintenu entre le pouce et l'index
- Ne pas aspirer, laisser le suc ganglionnaire fuser par capillarité dans l'aiguille ;
- Retirer l'aiguille, mettre le vide dans la seringue ;
- Adapter la seringue à l'aiguille et chasser le contenu sur une lame et faire des frottis qui seront colorés au May Grünwald Giemsa.

f) Myélogramme

▪ Principe

C'est l'étude cytologique quantitative et qualitative 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 des frottis médullaires réalisés de la même façon qu'un frottis sanguin.

- *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.

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.

La centrifugation doit se faire à 3000 tours/mn pendant 15mn.

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 dans les conditions normalisées.

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

- *Matériel*

- tensiomètre
- vaccino style stérile
- papier buvard
- éther
- chronomètre
- compresse

- *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 8mn.

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 calcium et 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
- 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
- incubé 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 après 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.

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

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, recalcifié 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 CaCl₂

▪ *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 CaCl₂

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
- incubé 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 thrombine du plasma témoin est considéré comme significatif.

e) Dosage du fibrinogène par méthode chromométrique (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

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

- ajouter à coté de chaque dépôt, une goutte de suspension de latex homogénéisée
- 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 ½ en ½ 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 500ng/ml, une agglutination indique une concentration de D-Dimères égale ou supérieure à 500ng/ml 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), immunoenzymologie (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) Dosage des anticorps anti phospholipides

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

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 complémentaires et réalisées simultanément avec deux lots de réactifs et deux techniciens différents, 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			Aucun	
Antigène	Antigène A	Antigène B	Antigène A et B	Pas d'antigène

Les différents groupes sanguins

groupe ABO de l'individu testé	A. Beth-Vincent sang de l'individu mis au contact de sérums :			B. Simonin sérum de l'individu mis au contact d'hématies :		
	serum anti-B	serum anti-A	serum anti-AB	hématies A	hématies B	hématies O
A						
B						
AB						
O						

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 polyagglutinabilité

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.

b) Groupage sanguin dans le système 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

▪ *Mode opératoire*

NB : si le Rhésus est négatif, chauffer le mélange (globules rouges + sérum-test anti D) au rhéuscope car l'optimum thermique de l'Ag D est de 37°C; si le résultat négatif persiste, il faudra rechercher l'Ag D faible.

c) 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 rhéuscope 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 45 mn
- * 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 3fois
 - 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.

d) 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

e) 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+ (5 à 10 gouttes)
- Diluer le pannel à 5% (1goutte de culot globulaire + 19 gouttes d'eau physiologique)
- Mettre dans un tube à hémolyse 1goutte 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

f) 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.

- *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 du pannel 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 ».

g) 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.

ANALYSES DE PARASITOLOGIE

Paquet Minimum d'activités en Parasitologie

Dans les Laboratoires de niveau périphérique :

* 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
- Recherche de Trypanosome

Dans les Laboratoires de niveau intermédiaire :

* 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 *Tænia* par le scotch-test

* Dans le LCR :

- Recherche de cryptocoque à l'encre de chine
- Recherche de Trypanosome.

Dans les Laboratoires de niveau National :

* 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 oocystes de *Cryptosporidium sp.*
- Recherche des Microsporidies
- Recherche des oocystes d'*Isospora belli* et de *Cyclospora*

*** Dans le LCR :**

- Recherche de cryptocoque à l'encre de chine.
- Recherche de Trypanosome

*** Prélèvements divers**

- Recherche de parasites.
- Recherche de champignon par examen direct, culture et antifongogramme.
- Recherche de *Pneumocystis jiroveci*

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 oeufs et larves d'Helminthes intestinaux.

d) Examen microscopique après coloration

La coloration au lugol ou au 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 intracytoplasmiques.

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 modifiée :

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.

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. Défibriner 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 cm).

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% (1ml 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. Recherche des œufs 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

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

Déshémoglobiner 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.

5. Recherche des oocystes de *Cryptosporidium sp.* par la technique de coloration de Ziehl Neelsen modifiée

Elle s'effectue à partir de selles formolées et du culot de concentration des selles par la technique de Ritchie modifiée :

- Sur une lame porte-objet propre effectuer un étalement mince de selles
- Sécher à l'air libre ou sous un séchoir
- Fixer au méthanol pendant 1 minute
- Sécher à l'air libre
- Recouvrir la lame de solution de Fuschine phéniquée de Ziehl pendant 1 heure
- Laver à l'eau de robinet
- Décolorer dans une solution d'acide sulfurique à 2% pendant 2 secondes
- Contre-colorer en recouvrant la lame d'une solution de Vert de malachite à 5% pendant 5 minutes
- Laver à l'eau de robinet
- Sécher à l'air libre
- Examiner au microscope à l'objectif x 40 puis x 100

Les oocystes de *Cryptosporidium sp.* apparaissent comme des éléments arrondis ou ovoïdes de 2,5 à 4µm de diamètre à cytoplasme finement granuleux renfermant 4 sporozoïtes. Ils sont colorés en rouge dans le fond vert de la préparation microscopique.

6. Recherche de cryptocoque dans le liquide céphalorachidien (LCR)

- Centrifuger le LCR à 1500 tours / mn pendant 5 minutes.
- Sur une lame porte-objet propre déposer 1 goutte du culot de centrifugation
- Ajouter 1 goutte d'encre de Chine diluée au 1/5
- Mélanger avec le coin d'une lamelle
- Recouvrir avec la lamelle
- Examiner au microscope optique à l'objectif x 10 puis x 40

Les cryptocoques apparaissent sous forme de levures parfois bourgeonnantes entourées d'un halo clair (correspondant à leur capsule) dans le fond noir de la préparation microscopique.

7. Recherche de Trypanosome dans le liquide céphalorachidien (LCR)

a) Examen à l'état frais

Dans un tube à hémolyse centrifuger 2 à 4ml de LCR pendant 10minutes à 2000 tours/mn.

Examiner le culot de centrifugation entre lame et lamelle à l'objectif 40 : les trypanosomes se repèrent par leurs mouvements dans le liquide .

b) Examen après coloration au Giemsa

- A partir du culot de concentration ou après avoir retiré la lamelle ayant servi à l'examen à l'état frais, réaliser un étalement,

- Sécher à l'air libre

- Fixer au méthanol pendant 3minutes

- Recouvrir d'une solution de Giemsa à 10% pendant 20 minutes

- Rejeter le colorant

- Laver sous un fin filet d'eau

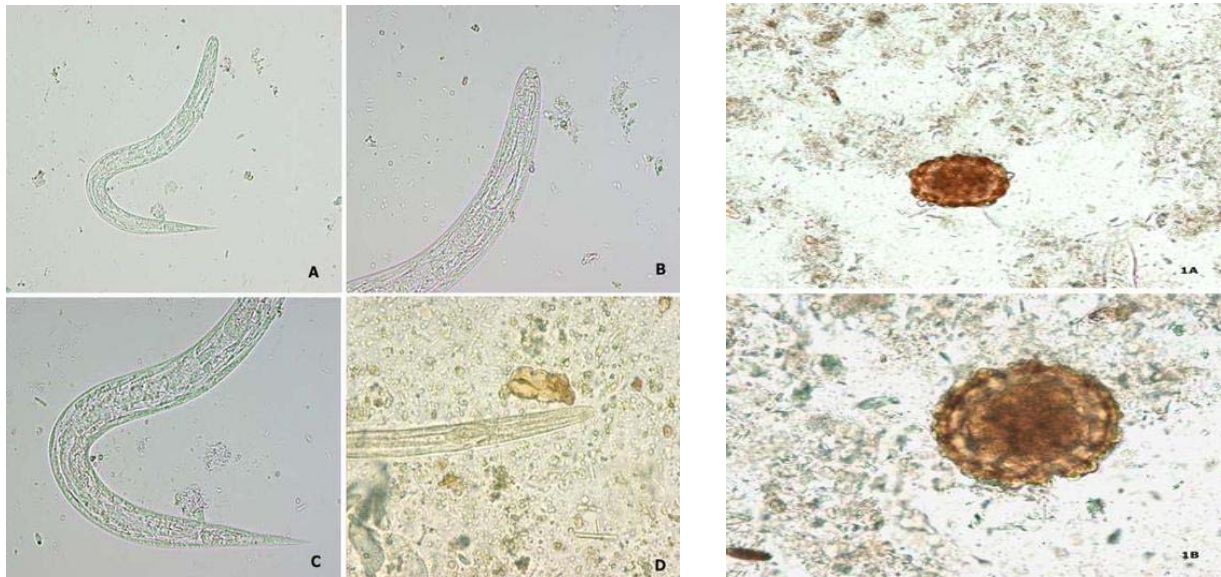
- Sécher à l'air libre

- Examiner au microscope à l'objectif 100 : les trypanosomes se présentent comme des éléments fusiformes de 20 à 40 µm de long, avec un noyau central coloré en rouge, un blépharoplaste situé à la partie postérieure apparaissant sous forme d'un point rouge d'où part une membrane ondulante longeant le corps et se prolongeant à la partie antérieure de la cellule en un flagelle antérieur libre.

8. Assurance qualité et système de référence :

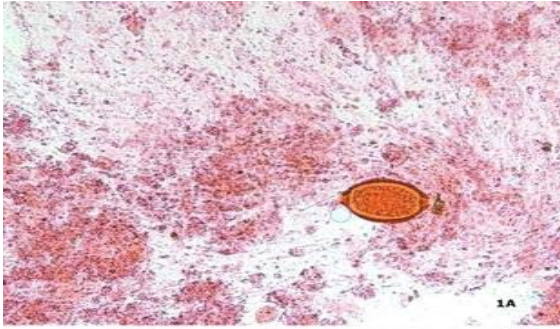
Deux personnes effectuent les lectures microscopiques. Il doit y avoir une corrélation des résultats.

ALBUM D'IMAGES

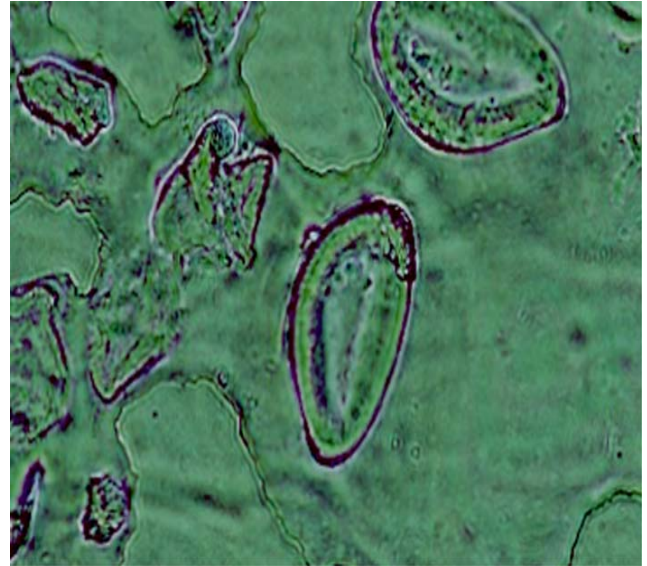


Larves d'Anguillules

Œufs d'Ascaris



Œufs de trichuris trichiura (trichocéphale)

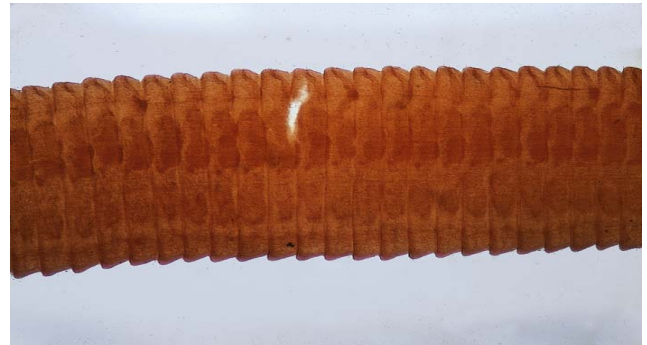


Œufs d'oxyures au scotch test anal

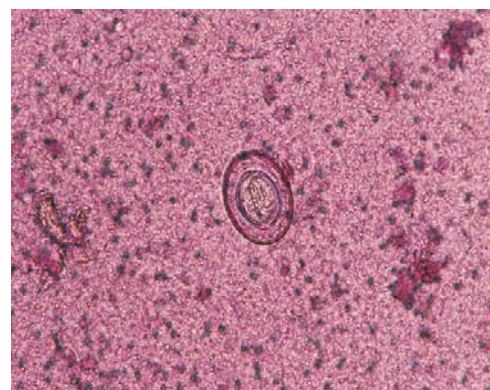


Œufs d'Ankylostomes

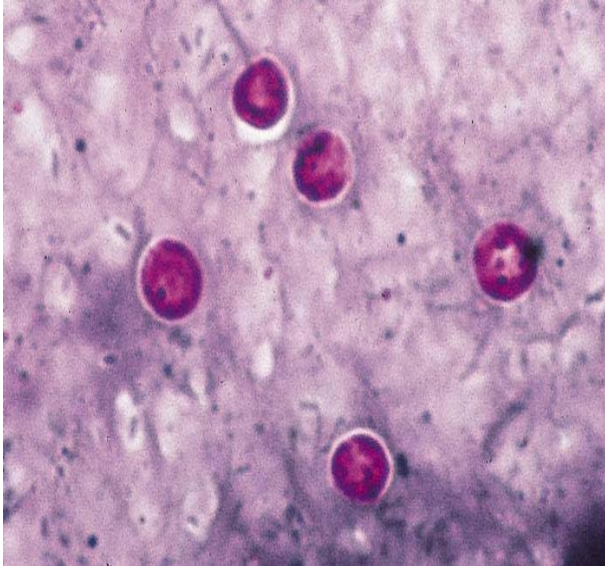
Hyménolépis nana : anneaux et œufs



Anneaux



Oeufs

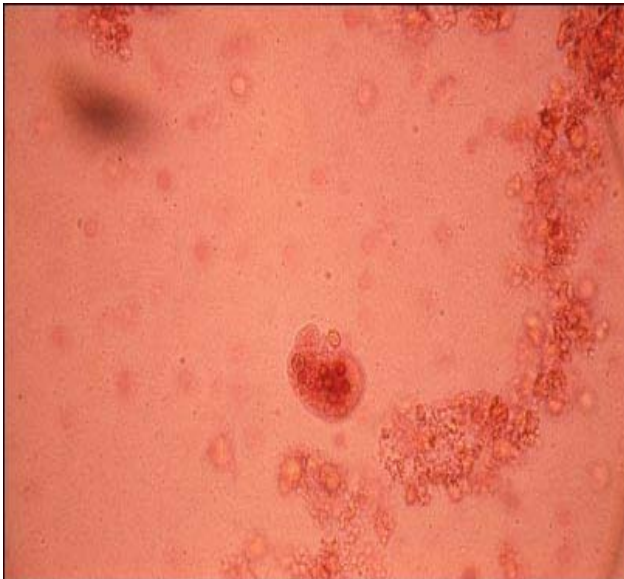


*Oocystes de cryptosporidium
après coloration de Ziehl Nielsen*

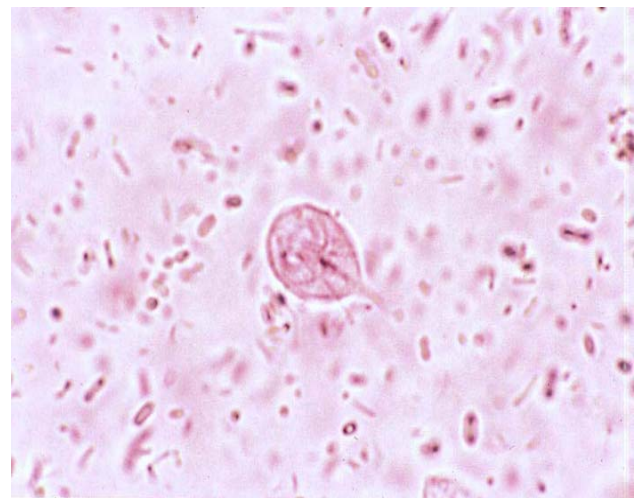


Œufs de Fasciola Hepatica

Forme végétative et kyste de Giardia intestinalis



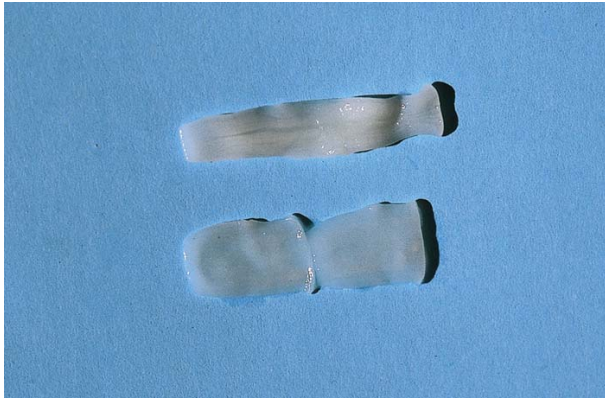
Amibe Entamoeba histolytica histolytica



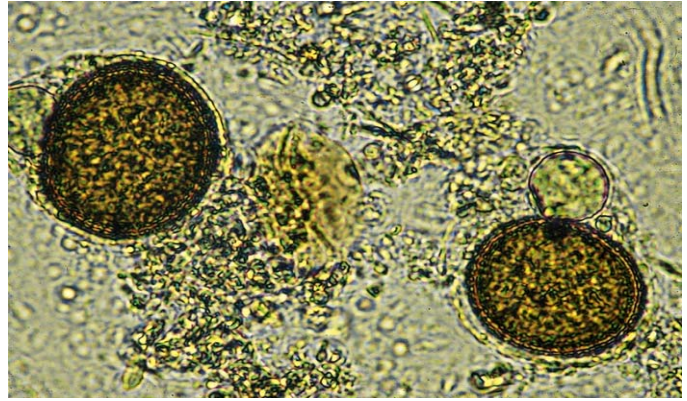
Trophozoïte : Forme végétative

kyste

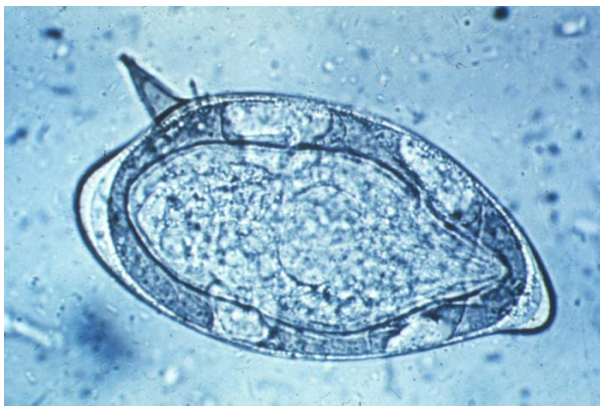




Anneaux de *tænia saginata*

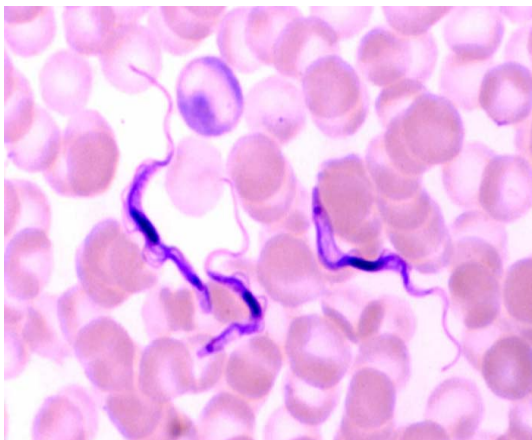


Oeufs de *tænia*

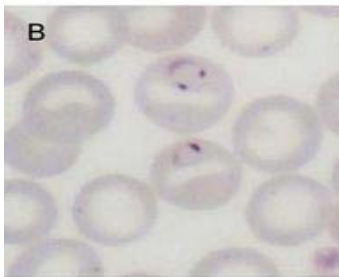
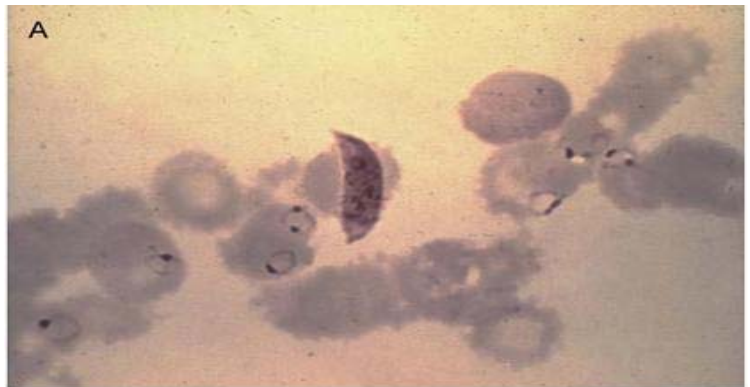


Oeuf de *Schistosoma mansoni* : éperon latéral

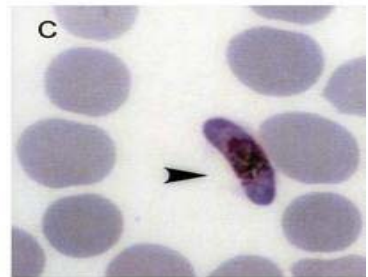
Plasmodium



Trypanosomes



Trophozoïtes de *P. falciparum*



Gamétocytes de *P. falciparum*

ANALYSES DE BIOCHIMIE

Paquet Minimum d'activités en Biochimie

Pour les Laboratoires de niveau périphérique

* 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

Pour les Laboratoires de niveau intermédiaire

* 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

Pour les Laboratoires de niveau national

* Dans le sang :

- Glycémie
- Azotémie
- Créatininémie
- Cholestérol total
- Cholestérol HDL
- Triglycérides
- Ionogramme (Na, K, Cl)
- Gaz du sang (pH, PaCO₂, PaO₂, HCO₃)
- 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

SUBSTRATS - ELECTROLYTES

1- GLUCOSE

1.1. Objet :

Il s'agit de la détermination du taux de glucose dans le plasma, le sérum, les urines, le LCR ou dans les autres liquides biologiques

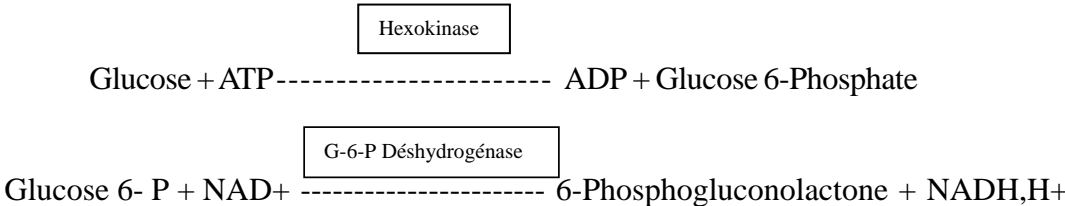
1.2. Conditions de prélèvement

- ❖ Sang : Le prélèvement se fait après un jeûn de 12 heures sur tube contenant du fluorure oxalate. Il faut éviter toute activité physique et toutes situations de stress.
- ❖ Urines : les urines doivent être collectées dans un récipient propre pendant 24H, on peut aussi utiliser des urines fraîchement émises.
- ❖ LCR et autres liquides biologiques : Les prélèvements sont effectués au niveau des services cliniques

1.3. Méthodes de détermination :

❖ Hexokinase

L'hexokinase catalyse la phosphorylation du glucose par l'ATP pour donner de l'ADP et du glucose-6-phosphate. Ce dernier est oxydé en 6 phosphogluconate avec la réduction NAD⁺ en NADH₂ par glucose -6 phospho déshydrogénase.

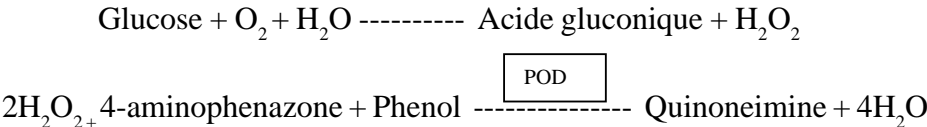


La quantité de NADH, H⁺ formée est proportionnelle à la concentration du glucose de l'échantillon et peut être mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 340 nm.

❖ Complexe glucose oxydase-peroxydase

Le dosage enzymatique à la glucose oxydase (GOD) est de loin la méthode la plus utilisée. Sous l'action de la glucose-oxydase, le glucose est transformé en gluconate et en H₂O₂ qui réagit avec un chromogène en présence de peroxydase (POD) pour former un complexe coloré (rose).

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration du glucose. Le produit coloré est mesuré au spectrophotomètre à 500 nm.



1.4. Performances :

La méthode est linéaire jusqu'à une concentration en glucose de 5,4 g/l

Le seuil de détection est de 0,59 mg/dl avec un coefficient de variation de 1,7 %

1.5. Mode opératoire :

La même procédure est utilisée pour le dosage du glucose dans tous les liquides biologiques

- Placer les réactifs conservés à 2-8 °C à la température ambiante
- Pipeter dans les tubes :
 - . 10 µl d'eau distillée, d'étalon, de sérum contrôle et d'échantillon
 - . 1 ml de réactif (Glucose oxydase)
- Homogénéiser et incubé 15 mn à 25°C ou porter au bain –marie pendant 5 mn à 37° C
- Lire l'absorbance de l'étalon face au blanc à 500 nm

1.6. Valeurs usuelles :

- ❖ Sang : Adulte : 0,70 – 1,10 g/l
Enfant : 0,30- 0,8 g/l
- ❖ Urines : 0
- ❖ LCR : 0,45-0,65g/l

1.7. Interférences

La morphine et ses dérivés, les produits pour anesthésie tel que l'éther et le chloroforme peuvent entraîner des erreurs par excès.

L'acide ascorbique abaisse la glycémie

1.8. Variations physiopathologiques

- ❖ Sang :

Les émotions, le froid, l'altitude, le changement de climat, l'exercice musculaire tendent à augmenter le taux de glucose

- **Augmentation** : diabète sucré, pancréatite aiguë
- **Diminution** : en cas de jeûne prolongé, grossesse, méningite bactérienne
- ❖ Urines : on note une augmentation dans : diabète sucré, diabète rénal
- ❖ LCR :
 - **Augmentation** dans le diabète sucré et la Syphilis tertiaire
 - **Diminution** dans la méningite, tuberculeuse

2- UREE

2.1. Objet :

Il s'agit de la détermination de l'urée qui est un produit du catabolisme des protéines

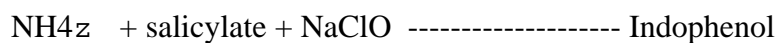
2.2. Conditions de prélèvement

- ❖ Sang : Le prélèvement se fait après un jeûne d'au moins 12 heures sur un tube sans anticoagulant ou un tube contenant de l'héparinate de lithium ou de l'EDTA
- ❖ Urines : Elles sont collectées pendant 24 heures dans un bocal propre

2.3. Méthodes de détermination :

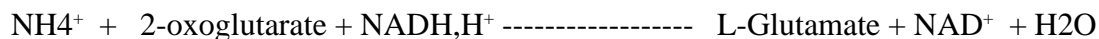
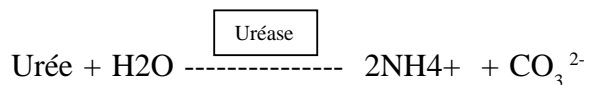
❖ La méthode de Berthelot

L'urée présente dans l'échantillon en présence d'uréase donne de l'indophénol quantifiable au spectrophotomètre à 600 nm.



❖ La méthode cinétique utilisant l'uréase et la glutamate déshydrogénase

Sous l'action de l'uréase, l'urée est hydrolysée en ammoniac et carbonate. Lors d'une seconde réaction, le 2-oxoglutarate réagit avec l'ammoniac en présence de glutamate déshydrogénase (GLDH) et du coenzyme NADH pour former du L-glutamate et du NAD⁺.



La vitesse de diminution du NADH est directement proportionnelle à la concentration en urée de l'échantillon. Elle est déterminée en mesurant l'absorbance à 340 nm.

2.4. Performances :

La méthode est linéaire jusqu'à 3g/l. La limite inférieure de détection est de 0,05g/l avec un coefficient de variation de 1,3%.

2.5. Mode opératoire

La procédure est la même pour tous les liquides biologiques

- Placer les réactifs à température ambiante
- Pipeter dans les tubes
 - . 10 µl d'eau distillée, d'étalon, de sérum contrôle et d'échantillon dans les tubes correspondants
 - . et 1ml de réactif contenant l'uréase
- Bien agiter et incuber les tubes pendant 10 mn à température ambiante ou pendant 5 mn à 37°C
- Ajouter le réactif contenant l'hypochlorite de Na
- Bien agiter et incuber les tubes pendant 10 mn à 25°C ou 5 mn à 37°C
- Lire l'absorbance (A) de l'étalon et de l'échantillon face au blanc 600 nm.

2.6. Valeurs usuelles

- ❖ Sang :
 - Adulte : 0,15- 0,50 g/l
 - Enfant de moins de 5 ans: 0,10- 0,20 g/l
- ❖ Urines de 24 H : 20-35g/24H

2.7. Interférences

Les sels d'ammonium ou le fluorure utilisé comme anticoagulant peuvent entraîner des erreurs par excès.

2.8. Variations physiopathologiques

La grossesse peut entraîner un taux d'urée abaissé dans le sang

Un régime riche en protéines peut augmenter le taux d'urée dans le sang

- **Augmentation** dans les atteintes rénales, hypercatabolisme protéique, insuffisance cardiaque, obstructions des voies urinaires.
- **Diminution** dans les tumeurs hépatiques

3- CREATININE ET CLAIRANCE DE LA CREATININE

3.1. Créatinine

➤ *Objet :*

Il s'agit du dosage de la créatinine qui est un catabolite de la créatine musculaire,

➤ *Conditions de prélèvement :*

Le sang est prélevé sur tube sans anticoagulant ou contenant de l'héparine comme anticoagulant, le prélèvement doit être fait en dehors de toute activité physique et à jeun.

Les urines peuvent être des urines fraîches ou des urines collectées pendant 24 heures en utilisant comme conservateur le thymol ou le toluène.

➤ **Méthodes de détermination :**

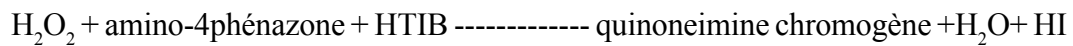
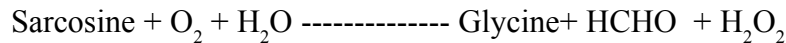
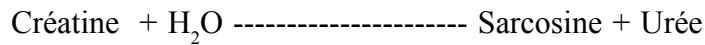
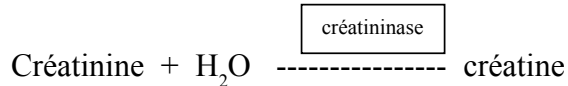
❖ **Méthode de Jaffé :**

La créatinine présente dans l'échantillon réagit avec le picrate en milieu alcalin, pour donner un complexe coloré. L'absorbance de ce complexe est proportionnelle à la concentration de créatinine.

Créatinine + acide picrique ----- complexe créatinine-picrate (complexe jaune orangé)

❖ **Méthode enzymatique colorimétrique :**

Elle est basée sur la détermination de l'eau oxygénée après transformation de la créatinine à l'aide de créatininase, créatinase et sarcosine-oxydase (SOD). L'eau oxygénée libérée réagit avec l' amino -4 Phénazone et l'HTIB pour former une quinoneimine chromogène



HTIB = acide 2,4,6-triiodo-3-hydroxybenzoïque

L'intensité de la coloration développée est directement proportionnelle à l'activité de la créatinine et est mesurée par photométrie. Elle est suivie par l'augmentation de l'absorbance à 552 nm

➤ **Performances :**

La limite de linéarité est de 367mg/l et le seuil de détection 3mg/l avec un coefficient de variation de 1,4%

➤ **Mode opératoire :**

- Préchauffer le réactif de travail, l'échantillon et l'étalon pendant quelques minutes.

- Pipeter dans une cuvette

. 100 µl d'étalon, de contrôle et d'échantillon dans les tubes correspondants

. et 1ml de réactif de travail

- Lire l'absorbance à 500 nm après 30 secondes A1 et après 90 secondes (A2).

La concentration de créatinine de l'échantillon est calculée selon la formule suivante :

$$(A2 - A1) \text{ Echantillon} / (A2 - A1) \text{ Etalon} \times C \text{ Etalon} = C \text{ échantillon}$$

➤ **Valeurs usuelles :**

❖ Sang : Homme : 9- 13 mg /l

Femme : 6 – 11 mg/l

Enfant : < 5ans 2,5- 4,5mg/l

- ❖ Urines : Urines fraîches :
 - Femme : 29-226 mg/l
 - Homme : 40-278mg/dl
 - Urines de 24H : Femme : 720-1510mg/24H
 - Homme : 980-2200mg/24H

➤ **Interférences :**

Les triglycérides peuvent interférer si le taux est supérieur à 2g /L.

Certains médicaments tels les contraceptifs peuvent entraîner une augmentation du taux de la créatininémie.

Par contre les anti-épileptiques et les anti inflammatoires peuvent entraîner une diminution du taux de créatinine.

➤ **Variations physiopathologiques :**

La créatininémie varie avec la masse musculaire du sujet.

Lors de la grossesse, en raison de l'élévation physiologique du débit sanguin rénal, la créatinine plasmatique s'abaisse.

L'exercice musculaire tend à augmenter le taux de créatinine.

On note une augmentation dans les pathologies telles que l'insuffisance rénale, l'insuffisance cardiaque, l'hypertension artérielle.

3.2. Clairance de la créatinine

La détermination de la clairance de la créatinine repose sur le dosage de la créatininémie et de la créatininurie sur les urines de 24 heures.

- Collecte des urines : les urines de 24H sont recueillies dans un récipient contenant un antiseptique
- Clairance de la créatinine : UV / P

U = créatininurie

P = créatininémie

V = diurèse de 24H

La valeur de référence de la clairance de la créatinine est 80- 120 ml/ min.

Toute diminution de la clairance peut traduire une altération de la fonction rénale

4. ACIDE URIQUE

4.1. Objet :

Il s'agit de la détermination du taux d'acide urique dans le plasma ou le sérum.

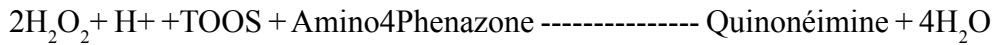
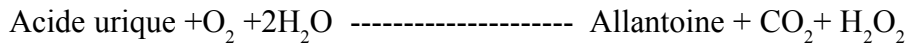
4.2. Conditions de prélèvement

❖ Sang : Le prélèvement se fait à jeun dans un tube contenant un anticoagulant comme l'héparine ou dans un tube sec. L'oxalate et le fluorure sont à proscrire car ils inhibent l'uricase.

❖ Urines : elles doivent être collectées dans un récipient contenant un antiseptique

4.3. Méthodes de détermination

❖ **La technique enzymatique** : elle utilise l'uricase qui décompose l'acide urique en allantoïne de carbone avec production concomitante de peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène libéré est dosé par une réaction mettant en jeu une peroxydase en présence d'un accepteur d'électrons (amino-4-antipyrine) et d'un chromophore dont le couplage fournit le produit final de la réaction, une quinonéine colorée ; mesurée à 560nm.



TOOS= acide hydroxy-2 [N-éthylN-(m-tolyl)-amino]-3propanesulfonique-1

4.4. Performances :

La limite de linéarité est de 250mg/l, le seuil de détection est de 2mg/l et le coefficient de variation 1%.

4.5. Mode opératoire

Dans les tubes, pipeter :

1ml de réactif et 25 µl pour l'eau distillée, l'étalon et l'échantillon.

- Incuber à 37 °C pendant 5 mn
- lire au spectrophotomètre à 560 nm contre le blanc.

4.6. Valeurs usuelles

- ❖ Sang : Homme : 40 - 75 mg/L - Femme 30 - 60 mg/l
- ❖ Urines : Urines fraîches du matin : 370- 920mg/l
Urines de 24 Heures : 200-1000mg/24h

4.7. Interférences :

L'Hémoglobine, la bilirubine et l'acide ascorbique interfèrent sur les résultats.

Les médicaments notamment l'allopurinol, les anti vitamines K, le phénylbutazone, peuvent diminuer le taux d'acide urique.

Les diurétiques et les salicylates peuvent augmenter le taux d'acide urique.

4.8. Variations physiopathologiques :

L'uricémie est variable selon le sexe (plus élevée chez l'homme que chez la femme).

En outre la suralimentation et l'obésité stimulent la purinosynthèse et par conséquent l'augmentation de l'acide urique. Il en est de même des exercices physiques intenses.

- **Augmentation** : en cas de goutte, dans l'insuffisance rénale chronique, dans le diabète insipide.
- **Diminution**: dans l'insuffisance hépatique sévère.

5- CHOLESTEROL TOTAL

5.1. Objet :

Il s'agit de la détermination du taux de cholestérol dans le plasma ou le sérum.

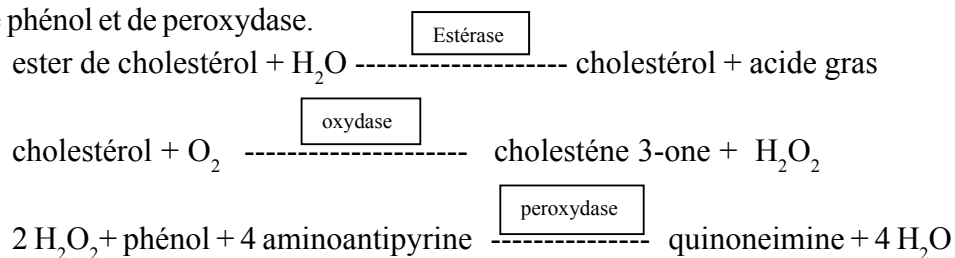
5.2. Conditions de prélèvement :

Le prélèvement se fait de préférence après un jeûne de 12 heures dans un tube contenant un anticoagulant comme l'héparine ou dans un tube sec.

5.3. Méthodes de détermination :

❖ **Méthode enzymatique :** Le cholestérol est déterminé après hydrolyse enzymatique par une hydrolyse de ses esters par une estérase suivie d'une oxydation.

L'indicateur coloré qu'est la quinone imine est formé à partir du peroxyde d'hydrogène et de la 4-aminoantipyrine en présence de phénol et de peroxydase.



5.4. Performances:

La limite de linéarité est de 8g/l, la limite de détection est de 0,001g/l, le coefficient de variation 0,5%.

5.5. Mode opératoire :

- Dans les tubes, pipeter 10 µl d'eau distillée, d'étalon, de sérum de contrôle et d'échantillon dans les tubes correspondant et 1ml de réactif dans les différents types
- Homogénéiser
- Incuber 10 mn à température ambiante
- Lire au spectrophotomètre à 500 nm contre le blanc réactif.

5.6. Valeurs usuelles :

Homme : 1,30-2,60 g/l

Femme : 1,40- 2,65g/l

5.7. Interférences :

Les produits tels que la vitamine C, thyroxine et méthyl dopa peuvent diminuer le taux de cholestérol. L'aspirine, les diurétiques, et certains anti inflammatoires peuvent augmenter le taux de cholestérol.

5.8. Variations physiopathologiques :

- **Augmentation** : dans les pathologies infectieuses (tuberculose grave) ou cancéreuses, les insuffisances hépatiques, les carences (malnutrition), l'hyperthyroïdie
- **Diminution** : dans le syndrome néphrotique, les pancréatites les myélomes mais également au cours de la grossesse

6- CHOLESTEROL HDL

6.1. Objet :

Il s'agit de la détermination du taux de cholestérol HDL dans le plasma ou le sérum.

6.2. Conditions de prélèvement :

Le prélèvement se fait à jeun, dans un tube sec ou dans un tube contenant un anticoagulant comme l'héparine.

6.3. Méthodes de détermination :

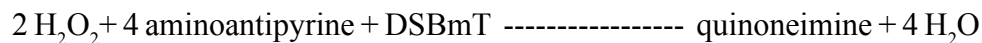
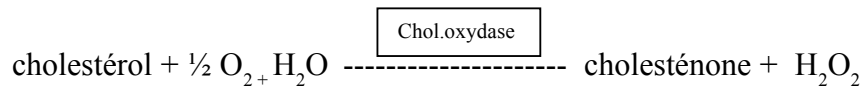
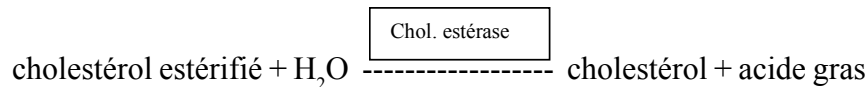
❖ Méthode après précipitation :

Le cholestérol HDL est déterminé après hydrolyse enzymatique et oxydation

Après précipitation du LDL par l'acide phosphotungstique. Le dosage est effectué suivant le même principe que le dosage du cholestérol total, en utilisant comme échantillon le surnageant obtenu après précipitation.

❖ Méthode directe automatisée :

Le cholestérol LDL, le cholestérol VLDL et les chylomicrons sont hydrolysés par le cholestérol oxydase au moyen d'une réaction enzymatique. Le détergent présent dans un des réactifs solubilise le cholestérol HDL de l'échantillon. Le cholestérol HDL est quantifié spectrophotométriquement suivant les réactions ci-dessous :



DSBmT = N-N-bis(4-sulfobutil)-m- toluidine

6.4. Performance des méthodes :

La limite de linéarité est de 2 g/l, la limite de détection est de 0,015 g/l, le coefficient de variation 0,75%.

6.5. Mode opératoire :

- Dans les tubes, pipeter 50 µl d'eau distillée, d'étalon, de surnageant du sérum de contrôle et des échantillons dans les tubes correspondants, et 500 µl de réactif dans les différents tubes.
- Homogénéiser
- Incuber 10 mn à température ambiante
- Lire au spectrophotomètre à 500 nm contre le blanc réactif

6.6. Valeurs usuelles :

Homme : 0,35-0,55 g/l

Femme : 0,45-0,65 g/l

6.7. Interférences :

Des taux élevés d'acides gras libres, de lipoprotéines dénaturées ou des taux élevés d'immunoglobulines peuvent conduire à l'obtention de taux de cholestérol HDL faussement élevé.

6.8. Variations physiopathologiques :

- **Augmentation** dans les hyperalipoprotéïnémies familiales, l'HTA, le diabète
- **Diminution** dans les cardiopathies ischémiques.

7- CHOLESTEROL LDL :

7.1. Objet :

Il s'agit de la détermination du cholestérol LDL dans le plasma ou le sérum.

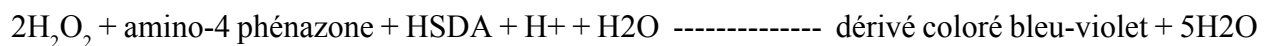
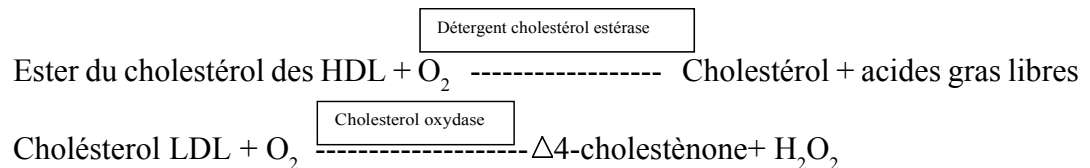
7.2. Conditions de prélèvement :

Le prélèvement doit se faire loin des repas dans un tube contenant un anticoagulant comme l'héparine ou dans un tube sec.

7.3. Méthodes de détermination :

❖ Méthode de dosage directe :

La méthode fait appel à la solubilisation sélective du cholestérol LDL à l'aide d'un détergent non ionique et à l'interaction d'un dérivé glucidique et de lipoprotéines.



L'intensité de la coloration développée est directement proportionnelle à la concentration en cholestérol LDL elle est mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 583 nm.

❖ **Méthode de calcul :**

Le taux de cholestérol LDL peut être déterminé suivant la formule de Friedwald

Elle permet de calculer le taux de LDL à partir du cholestérol total, du cholestérol HDL et des triglycérides.

Elle n'est applicable que si les TG < 4 g/l

Formule : Les résultats exprimés en g/l : LDL Chol = Chol total - HDL Chol - TG/5

7.4. Performances :

La limite de linéarité est de 5,5 g/l, la limite de détection est de 0,03 g/l et le coefficient de variation est de 1,5 g/l.

7.5. Mode opératoire :

Se référer au manuel de l'automate utilisé.

7.6. Valeurs usuelles :

Homme : 1.10 - 1.60 g/l

Femme : 1.00 - 1.50 g/l

7.7. Interférences :

L'aspect du prélèvement peut interférer sur les résultats.

8.8. Variations physiopathologiques :

On note une augmentation dans les maladies athéromateuses et les hyperlipoprotéïnémies de type IIa, IIb et III.

8- TRIGLYCERIDES

8.1. Objet :

Il s'agit de la détermination du taux de triglycérides dans le plasma ou le sérum.

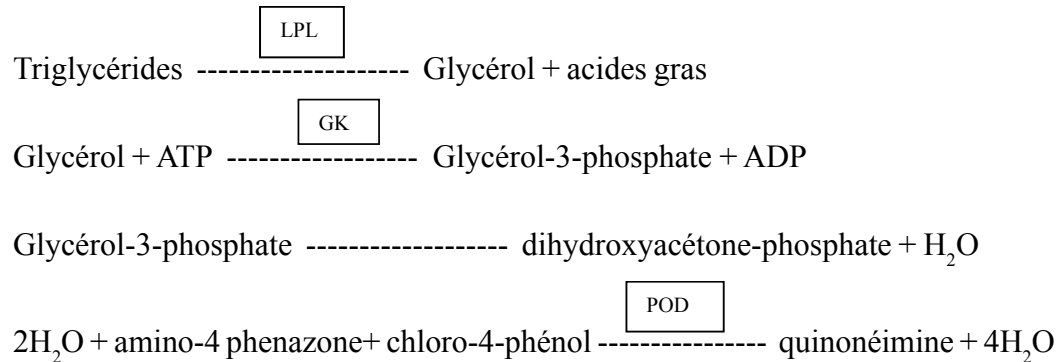
8.2. Conditions de prélèvement :

Le prélèvement se fait à jeun, loin des repas dans un tube contenant un anticoagulant comme l'héparine ou dans un tube sec.

8.3. Méthodes de détermination :

Les triglycérides présents dans l'échantillon sont hydrolysés par une enzyme, la lipoprotéine lipase (LPL) en acides gras et glycérol. Le glycérol est ensuite phosphorylé par l'ATP en glycérol 3. Phosphate (G₃P) en présence de glycérol-Kinase (GK). Le glycérol 3 phosphate oxydé en présence de Glycérol 3 phosphate Oxydase (G₃P0) donne un dihydroxyacétone phosphate et un peroxyde d'hydrogène.

Ce dernier réagit avec le 4- chlorophénol et le 4 -aminoantipyrine en présence de peroxydase (POD) pour donner un complexe coloré. L'absorbance de ce dernier à 500-520 nm est directement proportionnelle au taux de triglycérides dans l'échantillon.



L'intensité de la coloration due a la quinonéimine est mesurée à 512nm. L'augmentation d'absorbance est directement proportionnelle à la concentration de triglycérides dans l'échantillon.

8.4. Performances :

La limite de linéarité est de 8,85g/l, le seuil de détection est de 0,035 g/l et le coefficient de variation est de 1,6%.

8.5. Mode opératoire :

- Dans les tubes pipeter 10 µl d'eau distillée, d'étalon, de contrôle et d'échantillon, et 1ml de réactif
- Incuber pendant 5 mn à 37 ° C
- Lire les absorbances de l'étalon, du contrôle, des dosages contre le blanc entre 500 et 520 nm.

8.6. Valeurs usuelles :

Homme : 0,45-1,75g/l
 Femme : 0,35-1,40g/l

8.7. Interférences :

Des taux élevés de vitamine C, d'hémoglobine et de bilirubine peuvent interférer sur le taux de triglycérides en entrainant une sous estimation.

8.8. Variations physiopathologiques :

La triglycéridémie varie en fonction de l'âge, du sexe et également du régime alimentaire. Des taux élevés de triglycérides sont observés dans les hypertriglycéridémies, le diabète, les pancréatites.

9- BILIRUBINE

9.1. Objet :

Cette procédure décrit les modalités techniques du dosage de la bilirubine totale et de la bilirubine conjuguée (directe) au niveau du sang.

9.2. Conditions de prélèvement :

La bilirubine est dosée chez un sujet à jeun depuis 10 heures environ. Le prélèvement se fait sur le sérum ou le plasma recueilli sur héparinate de lithium. Les spécimens peuvent être congelés à moins 20°C pendant 3 mois. Il est conseillé d'éviter de traiter les échantillons hémolysés, contaminés ou ayant subi plus d'une décongélation. Il faut séparer le plus rapidement possible le sérum ou le plasma du culot globulaire (dans les 2 heures qui suivent le prélèvement). Le prélèvement doit être protégé de la lumière. Il peut être conservé 8 heures à l'abri de la lumière à température ambiante.

9.3. Méthodes de détermination :

❖ Méthode spectrophotométrique directe :

L'absorbance du plasma, dilué ou non dans un tampon phosphate est lue respectivement à 416 nm (pic d'absorption de la bilirubine) et à 551 nm (où l'absorption due à la turbidimétrie de l'hémoglobine est à la même qu'à 416 nm).

Par différence, on obtient l'absorbance de la bilirubine et connaissant la dilution du plasma et le coefficient d'absorbance molaire de la bilirubine, on en déduit la bilirubinémie.

❖ Méthode utilisant une diazoreaction :

La bilirubine totale est dosée en présence de caféine selon une réaction de diazotation avec l'acide sulfanilique, composé diazoté. Ce dernier réagit avec la molécule de bilirubine pour donner deux fragments azodipyrroliques. Cette réaction produit une azobilirubine bleue à pH alcalin et rouge à pH neutre ou acide. Elle est instantanée avec la bilirubine dite directe, soluble dans l'eau. Le dosage de la bilirubine non conjuguée nécessite à l'aide de substances solubilisantes telles que la caféine et le benzoate de sodium.

9.4. Performances :

La méthode est linéaire jusqu'à 200 mg/l. Si la concentration en bilirubine est supérieure à cette valeur, il faut recommencer le dosage sur l'échantillon dilué au 1/2 avec une solution de NaCl à 9g/l; en n'oubliant pas de tenir compte de cette dilution avant de rendre le résultat qui sera multiplié par 2.

• Stabilité de la coloration : 60 minutes à 20°C-25°C.

Cv 5 %

9.5. Mode opératoire :

Il faut s'assurer avant emploi que les réactifs et les échantillons sont à la température ambiante pendant 10 à 20 minutes.

- Longueurs d'ondes : 600 nm (Bilirubine totale), 530 nm (Bilirubine directe)
- Zéro de l'appareil : blanc échantillon

Réactifs

Ce sont des coffrets commercialisés dont il faut suivre le protocole fixé par le fabricant. Ils contiennent en général les réactifs suivants :

- Réactif 1 : Acide sulfanilique (5 g/1)
- Réactif 2 : Nitrite de sodium (1 g/1)
- Réactif révélateur 3 :
 - Caféine 50 g/1
 - Acétate de sodium 125 g/1
 - Benzoate de sodium 75 g/1
- Réactif 4 : Tartrate de sodium et de potassium 175 g/1
- Etalon (Eta) : titre donné par le fabricant $n = X \times \text{mg/1}$

L'étalon doit être conservé à l'abri de la lumière après avoir été reconstitué.

Dosage de la bilirubine totale

—	Blanc Ech	Ech	Blanc Eta	Eta
Etalon	—	—	200µl	—
Ech	200µl	200µl	—	—
Réactif 1	300µl	300µl	300µl	300µl
Réactif 2	—	50µl	—	50µl

- Homogénéiser, puis ajouter les réactifs suivants

- Réactif révélateur 3 : 1ml 1ml 1ml 1ml

- Homogénéiser et laisser à température ambiante pendant 5 minutes. Ajouter le réactif 4.

- Réactif 4 : 1ml 1ml 1ml 1ml

- Mélanger et lire les densités optiques (DO) des spécimens à 600 nm.

Calcul : Bilirubine totale (mg/1) = $\frac{\text{DO échantillon} - \text{DO blanc échantillon} \times n}{\text{DO étalon} - \text{DO blanc étalon}}$

n = Concentration de l'étalon bilirubine en mg/1.

La concentration de bilirubine totale = (concentration de bilirubine directe ou conjuguée + concentration de bilirubine indirecte ou libre)

Dosage de la bilirubine directe

—	BEch	Ech	BEt	Et
Réactif 1	300µl	300µl	300µl	300µl
Réactif 2	—	50µl	—	50µl
Réactif 3	—	—	2 ml	2ml

- Homogénéiser, puis ajouter les réactifs suivants:

NaCl à 9g/l : 2ml 2ml 2ml 2ml

- Homogénéiser et introduire:

Etalon :	—	—	200µl	200µl
Echantillon :	200µl	200µl	—	—

- Mélanger et attendre exactement 5 minutes, puis lire les densités optiques (DO) des spécimens à 530 nm.

Calcul : Bilirubine directe (mg/l) = DO échantillon- DO blanc échantillon x n/ DO étalon- DO blanc étalon
n = Concentration de l'étalon bilirubine en mg/l.

9.6. Valeurs usuelles :

Bilirubine totale : 3 à 10 mg/l (5 à 17 µmol)

Bilirubine directe : < 3 mg/l (< 5 µmol)

9.7. Interférences :

L'hémoglobine, les caroténoïdes, la lipémie et les protéines sont susceptibles d'interférer lors du dosage.

9.8. Variations physiopathologiques :

- **Augmentation :**

Ictère à bilirubine libre : Ictère hémolytique, Anémie hémolytique héréditaire, Anémie hémolytique acquise, Ictère par déficit de glycuco-conjugaison, Maladie de Gilbert, Maladie de Crigler -Najjar, Inhibition enzymatique médicamenteuse.

Ictère à bilirubine conjuguée : Ictère par obstruction biliaire, Ictère par déficit enzymatique de l'excrétion

Ictère à bilirubine mixte (ictère hépatocellulaire) : Hépatites virales, Cirrhose.

10- PROTEINES

10.1. Objet :

Cette procédure décrit les modalités techniques du dosage des protéines totales dans le sang, les urines et le liquide céphalorachidien

10.2. Conditions de prélèvement :

- ❖ **Sang**

Les protéines totales sont dosées chez un sujet à jeun depuis 10 heures environ. Le prélèvement se fait sur le sérum ou le plasma recueilli sur héparinate de lithium. Les spécimens peuvent être congelés à moins 20°C pendant 3 mois. Il est conseillé d'éviter de traiter les échantillons hémolysés, contaminés ou ayant subi plus d'une décongélation. Il est recommandé de séparer le plus rapidement possible le sérum ou le plasma du culot globulaire (dans les 2 heures qui suivent le prélèvement). Il faut éviter toute stase sanguine (garrot) qui risque de donner des erreurs par excès.

- ❖ **Urines**

. Utiliser de préférence le récipient fourni par le laboratoire ou à défaut un sceau neuf. Au réveil (par exemple 8 heures) vider la totalité de la vessie dans les toilettes et noter sur le sceau la date et l'heure de début du recueil.

. Recueillir dans le sceau toutes les urines de la journée, de la nuit et les premières urines du lendemain au réveil.

. Conserver les urines dans un endroit frais, au mieux dans un réfrigérateur.

. Acheminer rapidement les urines recueillies au laboratoire.

Au niveau des services cliniques, un échantillon des urines de 24 heures peut être prélevé et envoyé au laboratoire. Ce prélèvement doit être fait chez un patient au repos, en dehors d'un effort important les jours précédents. Chez la femme, la protéinurie des 24 heures se mesurera en dehors de la période menstruelle (risque de contamination des urines).

- ❖ **LCR**

Le prélèvement du LCR est un acte médical. Il est réalisé par ponction lombaire après examen du fond d'œil (pour écarter une hypertension intracrânienne, contre indication formelle à la PL). Le LCR ne nécessite un traitement préalable qu'en cas de prélèvement hémorragique. La valeur de la protéinorrhachie est dans ce cas faussée par la présence d'hémoglobine et de protéines plasmatiques.

10.3. Méthodes de détermination :

❖ Méthode de Biuret :

Les protéines sériques forment un complexe coloré en présence des sels de cuivre en milieu alcalin selon la réaction de biuret. L'intensité de la coloration violette obtenue (longueur d'onde de 550 nm) est proportionnelle à la concentration en protéines.

❖ Méthode de LOWRY :

Le réactif phospho-tungsto-molybdique (réactif de Folin et Ciocalteu) donne avec la plupart des protéines une coloration bleue. L'addition d'une certaine quantité de sulfate de cuivre augmente la sensibilité de la réaction. L'intensité de la coloration bleue obtenue est quantifiée à 600 nm.

❖ Méthode au rouge de Pyrogallol :

Le rouge de pyrogallol combiné au molybdate de sodium forme un complexe coloré en rouge qui absorbe à 460 nm. En milieu acide, la fixation de ce complexe sur les groupements aminés des protéines déplace le pic d'absorption à 600 nm. L'intensité de la coloration mesurée à 600 nm (578-612 nm) est proportionnelle à la concentration en protéines dans le spécimen.

❖ Méthode par opacimétrie :

Les protéines sont précipitées à froid par l'acide sulfosalicylique en donnant un trouble approximativement proportionnel (longueur d'onde 660 nm) à leur concentration dans l'échantillon à doser. Cette technique est rapide, facile mais de sensibilité et de spécificité moyennes.

10.4. Performances :

❖ Méthode de Biuret :

La stabilité de la coloration : 30 mn à 20°C, 25°C ou 10 mn à 37°C. La méthode est linéaire jusqu'à 150g/l. Si la concentration des protéines est supérieure à cette valeur, il faut recommencer le dosage sur l'échantillon dilué au 1/2 avec une solution de NaCl à 9g/l, en n'oubliant pas de tenir compte de cette dilution avant de rendre le résultat qui sera multiplié par 2. Cette méthode s'applique difficilement à des solutions diluées de protéines (LCR, urines et liquides de ponction) et reste peu sensible lorsque la concentration en protéines est inférieure à 6g/l. Le CV est de 1,5 %.

❖ Méthode au rouge de pyrogallol :

La méthode est linéaire jusqu'à 6 g/l. Si la concentration des protéines est supérieure à cette valeur, il faut recommencer le dosage sur l'échantillon dilué au 1/2 avec une solution de NaCl à 9g/l en n'oubliant pas de tenir compte de cette dilution avant de rendre le résultat qui sera multiplié par 2. La limite de détection est d'environ 0,05 g/l et le cv de 4 %.

10.5. Mode opératoire :

❖ Méthode de Biuret :

Il faut s'assurer avant emploi que les réactifs et les échantillons sont à la température ambiante pendant 10 à 20 minutes.

	Blanc réactif	Etalon	Echantillon
Echantillon	—	—	20µl
Etalon	—	20µl	—
Réactif	1ml	1ml	1ml

Mélanger et lire les densités optiques des spécimens à 550 nm après 10 minutes d'incubation à 20°C – 25°C.

Zéro de l'appareil : blanc réactif

Calcul : protéines totales (g/l) = DO échantillon/DO étalon * n

n = concentration de l'étalon protéines en g/l.

❖ Méthode par opacimétrie :

Cette technique est adaptée au dosage des protéines dans les urines de 24h, le liquide céphalo-rachidien et les liquides d'épanchement. Avant le dosage, les liquides d'épanchement ou de ponction seront dilués au 1/50 dans NaCl à 0,9%. Il est souhaitable de faire le dosage sur des échantillons frais non décongelés.

	Blanc réactif	Etalon	Echantillon
Solution de NaCl	100 µl	—	—
Echantillon	—	—	100 µl
Etalon	—	100 µl	—
Réactif de travail	500µl	500µl	500µl

Mélanger et lire les densités optiques des spécimens après 10 minutes d'incubation à 20°C – 25°C. Il faut s'assurer avant emploi que les réactifs et les échantillons sont à la température ambiante pendant 10 à 20 minutes.

longueur d'onde : 660 nm. Zéro de l'appareil : blanc réactif

Calcul : protéines totales (g/l) = DO échantillon/DO étalon * n

n = concentration de l'étalon protéines en g/l.

❖ Méthode au rouge de pyrogallol

Blanc réactif	Etalon	Echantillon	
Solution de NaCl	20 µl	—	—
Echantillon	—	—	20µl
Etalon	—	20µl	—
Réactif de travail	1ml	1ml	1ml

10.6. Valeurs normales

❖ Sérum :

Prématuré	40à 60 g/l
Nouveau-né	50à 70 g/l
Adulte	65 à 80 g/l

- ❖ **Urines:** < 150 mg/24 h
- ❖ **LCR:** 0,15 - 0,30 g/L

10.7. Interférences :

❖ **Méthode de Biuret :**

Les spécimens lipémiques ou hémolysés peuvent conduire à des résultats surévalués.

❖ **Méthode au rouge de pyrogallol :**

L'hémoglobine et les solutés de remplissage à base de gélatine entraînent une interférence positive fréquente chez les patients en réanimation.

10.8. Variations physiopathologiques :

❖ **Sérum ou Plasma**

- **Augmentation :** Déshydratation, myélome, infections
- **Diminution par :**

- **Défaut d'apport ou de synthèse :** Atteinte hépatique grave, mal absorption intestinale, malnutrition protéino-calorique

- **Fuite normale de protéines :** Brûlures, syndrome néphrotique, néphropathies

❖ **Urines :**

Chez le sujet normal il existe une protéinurie physiologique inférieure à 0,15g/ 24 heures.

- **Augmentation :** Protéinurie orthostatique, néphrites, amylose rénale, syndrome néphrotique

Une protéinurie importante > 2g/j se rencontre dans les glomérulonéphrites aiguës, les syndromes néphrotiques (diabète, amylose, glomérulonéphrites chroniques), le myélome (protéinurie de Bence Jones).

Une protéinurie modérée < 2g/j se rencontre après effort, dans la protéinurie orthostatique (apparaît en position debout, disparaît après une nuit en position couchée)

- ❖ **LCR :** Méningites, syndrome de guillain-barré, compression médullaire, mal de Pott, poliomyélite aiguë
- ❖ **Liquide d'épanchement :** Inflammation, Tuberculose

11- ALBUMINE

11.1. Objet :

Cette procédure décrit les modalités techniques du dosage de l'albumine dans le sang.

11.2. Conditions de prélèvement :

❖ **Sang :**

L'albumine sérique est dosée chez un sujet à jeun depuis 10 heures environ. Le prélèvement se fait sur le sérum ou le plasma recueilli sur héparinate de lithium. Les spécimens peuvent être congelés à moins 20°C pendant 3 mois. Il est conseillé d'éviter de traiter les échantillons hémolysés, contaminés ou ayant subi plus d'une décongélation. Il est recommandé de séparer le plus rapidement possible le sérum ou le plasma du culot globulaire (dans les 2 heures qui suivent le prélèvement).

11.3. Méthodes de détermination :

En milieu tamponné à pH 4.2, le vert de bromocrésol se combine à l'albumine pour former un complexe coloré. L'intensité de la coloration mesurée à 630 nm (620-640 nm) est proportionnelle à la concentration en albumine dans le spécimen.

11.4. Performances

La méthode est linéaire jusqu'à 100 g/l. La limite de détection est d'environ 3 g/l et le CV est de 2,5 %.

11.5. Mode opératoire

Il faut s'assurer avant emploi que les réactifs et les échantillons sont à la température ambiante pendant 10 à 20 minutes.

	Blanc réactif	Etalon	Echantillon
Echantillon	—	—	5µl
Etalon	—	5µl	—
Réactif	2,5ml	2,5ml	2,5ml

Mélanger et lire les densités optiques des spécimens à 630 nm dans les 3 min

Calcul : albumine (g/l) = DO échantillon/DO étalon * n

N = concentration de l'étalon albumine en g/l.

11.6. Valeurs normales :

- ❖ **Sérum** : 38- 48 g/l

11.7. Interférences :

Les plasmas recueillis sur héparinate de lithium donnent des résultats supérieurs à ceux obtenus sur sérum. Des médicaments comme les fibrates (clofibrate) donnent une interférence négative.

11.8. Variations physiopathologiques :

- **Augmentation**

Dans les déshydratations, le Diabète insipide, les pertes rénales, les pertes digestives et les pertes cutanées (hypersudation)

- **Diminution**

Dans les Hyperhydratations, les hémodilutions

Diminutions de synthèse de l'albumine : dans les maladies du foie (cirrhoses, hépatites aiguës), les syndromes inflammatoires importants, en cas de dénutrition importante

Dans les pertes d'albumine : maladies rénales (glomérulonéphrite, syndrome néphrotique), digestives (entéropathies exsudatives, malabsorptions), cutanées (brûlures, dermatites exfoliantes)

12- FER SERIQUE

12.1. Objet :

Cette procédure décrit les modalités techniques du dosage du fer sérique

12.2. Conditions de prélèvement

Le dosage du fer sérique est réalisé chez un sujet à jeun depuis 10 heures environ, sur le sérum en évitant toute hémolyse. Le prélèvement doit être fait toujours à la même heure pour le suivi des malades car le taux de fer sérique subit des variations nyctémérales. Le garrot doit être peu serré. Le prélèvement reste stable pendant 3 jours à +4°C.

L'utilisation de matériel plastique en chlorure de polyvinyle (PVC) est conseillé sinon le matériel en verre sera traité par l'acide chlorhydrique 2N puis rincé avec de l'eau distillée.

12.3. Méthodes de détermination :

❖ Méthode au bathophénantroline :

Après rupture de la liaison fer-transferrine et déprotéinisation par l'acide chlorhydrique et l'acide trichloracétique, le fer ferrique (Fe^{2+}) est réduit par l'acide thioglycolique en fer ferreux (Fe^{3+}). Les ions Fe^{2+} forment ensuite un complexe coloré avec la bathophénantroline disulfonnée. La coloration mesurée à 535 nm (520-550) est directement proportionnelle à la concentration en fer dans le milieu réactionnel.

❖ Méthode directe au Férène :

Après rupture de la liaison fer-transferrine, le fer ferrique (Fe^{2+}) est réduit par l'acide ascorbique en fer ferreux (Fe^{3+}). Les ions Fe^{2+} forment ensuite un complexe coloré avec le 3-(2-pyridyl)-5,6 difuryl-1,-2,-4 triazine-disulfonate (Férène). La coloration mesurée à 600 nm (580-6200) est directement proportionnelle à la concentration en fer dans le milieu réactionnel. La thiourée contenue dans le réactif permet de prévenir l'interférence due au cuivre.

12.4. Performances :

❖ Méthode au bathophénantroline :

La méthode est linéaire jusqu'à 10 mg/l (179 μ mol/l). La limite de détection est 0,1 mg/l (1,79 μ mol/L). Cv 3%

❖ Méthode Directe au Férène :

La méthode est linéaire jusqu'à 15 mg/l (268 μ mol/l). La limite de détection est 0,11 mg/l (1,79 μ mol/L). Cv 1,5 %.

12.5. Mode opératoire :

Ce sont des coffrets commercialisés dont il faut suivre le protocole fixé par le fabricant.

12.6. Valeurs usuelles :

Homme : 0,7 à 1,6 mg/l

Femme : 0,6 à 1,4 mg/l

Nourrisson : 1,6 à 2 mg/l

12.7. Interférences :

L'hémoglobine entraîne une interférence positive, l'EDTA, les oxalates et les citrates une interférence négative. Il est recommandé d'utiliser un matériel lavé soigneusement à l'HCL 0,1 N et bien rincer à l'eau déminéralisée. Toute médication à base de fer peut conduire à une augmentation de fer sérique jusqu'à 2 à 4 semaines après administration.

12.8. Variations physiopathologiques :

- **Augmentation** : Transfusions répétées, hémochromatose, anémies hémolytiques, hépatites, anémie sidéroblastique.
- **Diminution** : Grossesse, anémie ferriprive (manque d'apport, malabsorption, déperdition)

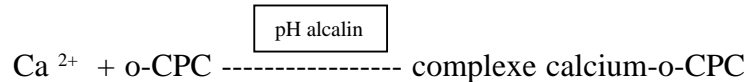
13 - CALCEMIE :

13.1. Objet :

Il s'agit de la détermination du taux de calcium dans le plasma, le sérum et les urines.

13.2. Conditions de prélèvement :

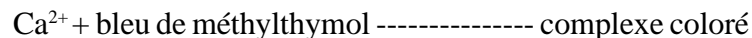
- ❖ Sang : Le prélèvement se fait à jeun dans un tube contenant un anticoagulant comme l'héparine ou un tube sec.
- ❖ Urines : elles doivent être collectées dans un récipient propre décalcifié



L'intensité de la coloration développée est directement proportionnelle à la concentration en calcium. Elle est déterminée par l'augmentation de l'absorbance à 552 nm.

13.3. Méthode avec le bleu de méthylthymol :

Le calcium dans l'échantillon réagit avec le bleu de méthylthymol en milieu alcalin, pour donner un complexe coloré, mesuré au spectrophotomètre.



13.4. Performances :

La limite de linéarité est de 200 mg/l, la limite de détection est de 0,4 mg/l et le coefficient de variation 0,99%.

13.5. Mode opératoire :

- Les réactifs sont à température ambiante
- Pipeter dans les tubes : 10 µl d'étalon, de contrôle et d'échantillon dans les tubes correspondants et 1 ml de réactif de travail
- Bien agiter et incubé 5 à 50 mn à 20-25°C ou 37°C
- Lire l'absorbance de l'étalon face au blanc à 610 nm

13.6. Valeurs de références :

- ❖ Plasma, sérum : 90 à 105 mg/l
- ❖ Urines : 100 à 300 mg/24h

13.7. Interférences :

Des taux élevés de bilirubine, d'hémoglobine et de triglycérides peuvent interférer sur le dosage.

13.8. Variations physiopathologiques :

La calcémie varie en fonction de l'âge, de la masse musculaire et du régime alimentaire.

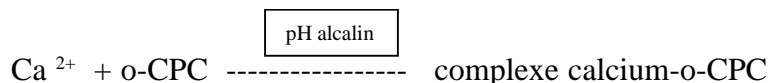
- **Augmentation sanguine** avec des pathologies comme les cancers, l'hyperparathyroïdie, l'hypervitaminose D
- Des taux élevés de calciurie sont notés dans l'insuffisance rénale, l'hyperabsorption intestinale et dans l'hypercalcémie.
- **Diminution sanguine** au niveau des carences parathyroïdiennes, au cours de l'insuffisance rénale, en cas carence en vitamine D
- **Une diminution urinaire** dans l'insuffisance rénale évoluée et en cas de rachitisme

13.3. Méthodes de détermination :

❖ Méthode avec l'o-crésolphtaléine-complexon :

Les ions calcium réagissent avec (o-cpc) en milieu alcalin pour former un complexe coloré en violet.

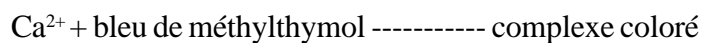
L'addition de 8-hydroxyquinoléine permet d'éviter les interférences du magnésium et du fer.



L'intensité de la coloration développée est directement proportionnelle à la concentration en calcium. Elle est déterminée par l'augmentation de l'absorbance à 552nm.

❖ Méthode avec le bleu de méthylthymol :

Le calcium dans l'échantillon réagit avec le bleu de méthylthymol en milieu alcalin, pour donner un complexe coloré, mesuré au spectrophotomètre.



13.4. Performances :

La limite de linéarité est de 200 mg/l, la limite de détection est de 0,4 mg/l et le coefficient de variation 0,99%.

13.5. Mode opératoire :

- Les réactifs sont à température ambiante
- Pipeter dans les tubes 10 µl d'étalon, de contrôle et d'échantillon dans les tubes correspondants et 1ml de réactif de travail
- Bien agiter et incuber 5 à 50 mn à 20-25°C ou 37°C
- Lire l'absorbance de l'étalon face au blanc à 610 nm

13.6. Valeurs de références :

- ❖ Plasma, sérum : 90 à 105 mg/l
- ❖ Urines : 100 à 300 mg/24h

13.7. Interférences :

Des taux de bilirubine élevés, d'hémoglobine et de triglycérides peuvent interférer sur le dosage.

13.8. Variations physiopathologiques :

La calcémie varie en fonction de l'âge, de la masse musculaire et du régime alimentaire.

- **Augmentation sanguine** avec des pathologies comme les cancers, l'hyperparathyroïdie, l'hypervitaminose D
- Des taux élevés de calciurie sont notés dans l'insuffisance rénale, l'hyperabsorption intestinale et dans l'hypercalcémie.
- **Diminution sanguine** au niveau des carences parathyroïdiennes, au cours de l'insuffisance rénale, en cas de carence en vitamine D
- **Une diminution urinaire** dans l'insuffisance rénale évoluée et en cas de rachitisme

14 - MAGNESEMIE

14.1. Objet :

Il s'agit de la détermination du taux de magnésium dans le plasma, le sérum et dans les urines.

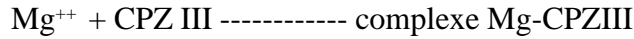
14.2. Conditions de prélèvement :

- ❖ Sang : le prélèvement se fait à jeun dans un tube contenant un anticoagulant comme l'héparine ou dans un tube sec.
- ❖ Urines : elles doivent être collectées dans un récipient propre.

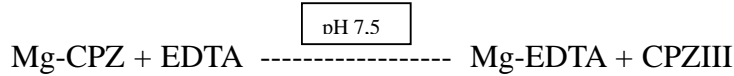
14.3. Méthodes de détermination :

❖ Méthode colorimétrique avec le chlorophosphonazo III (CPZ III) :

Le CPZIII se lie au magnésium et entraîne une augmentation de l'absorbance à 659 nm. L'acide éthylène-di(oxy-éthylènenitrilo) tétracétique sert à inhiber la fixation du calcium sur le CPZ III.



Les interférences d'absorbance non spécifique sont réduites par l'addition d'EDTA qui élimine le magnésium du complexe magnésium-CPZ III et permet une détermination exacte du blanc échantillon.



La différence d'absorbance entre le complexe magnésium-CPZIII et le complexe traité par l'EDTA correspond à l'absorbance due au magnésium seul.

❖ Méthode colorimétrique avec le calmagite :

Les ions magnésium réagissent en milieu alcalin avec le calmagite pour donner un complexe coloré qui absorbe à 520 nm.

14.4. Performances :

La limite de linéarité est de 12,5mmol/l, la limite de détection est de 0,095mmol/l, et le coefficient de variation est 5,2%.

14.5. Mode opératoire :

- Laisser reposer à température ambiante les réactifs pendant au moins 30 minutes.
- Pipeter dans les tubes : 10 µl d'étalon, de contrôle et d'échantillon dans les tubes correspondants et 1 ml de réactif de travail (calmagite + diéthylamine) dans les différents tubes
- Bien agiter et incuber 2 mn à température ambiante
- Lire l'absorbance de l'étalon face au blanc à 520nm

14.6 .Valeurs usuelles :

- ❖ Sérum, plasma : 18 - 21mg/l
- ❖ Urines : 24 - 240mg/24H

14.7. Interférences :

Les anticoagulants comme l'EDTA, le citrate ou l'oxalate de même que l'hémolyse peuvent interférer sur le dosage du magnésium.

14.8. Variations physiopathologiques :

L'effort physique peut faire varier le taux de magnésium dans le sang.

- **Augmentation** dans l'insuffisance rénale et l'hypoparathyroïdie
- **Diminution** en cas de spasmophilie et de malabsorption digestive

15- PHOSPHOREMIE :

15.1. Objet :

Il s'agit de la détermination du taux de phosphore dans le plasma, le sérum ou les urines.

15.2. Conditions de prélèvement :

- ❖ Sang : Le prélèvement se fait à jeun dans un tube un tube sec.
- ❖ Urines : elles doivent être collectées dans un récipient propre

15.3. Méthodes de détermination :

Les ions phosphore contenus dans l'échantillon réagissent avec le molybdate en milieu acide pour donner un complexe coloré, mesuré au spectrophotométrie à 340 nm.



15.4. Performances:

La limite de linéarité est de 150 mg/l, la limite de détection est de 5 mg/l et le coefficient de variation est de 1,2%.

15.5. Mode opératoire :

- Les réactifs sont à température ambiante
- Pipeter dans les tubes : 10 µl d'étalon, de contrôle et d'échantillon dans les tubes correspondants et 1ml de réactif de travail (blanc réactif + molybdate) dans les tubes
- Bien agiter et incuber 10 mn à 20-25°C ou 5 mn à 37°C
- Lire l'absorbance de l'étalon face au blanc à 340 nm

15.6. Valeurs usuelles :

- ❖ Sérum : Adulte : 25 à 50 mg/l Nourrisson : 50 à 70 mg/l
- ❖ Urines : 650-1400 mg/24H

15.7. Interférences :

La présence des composés tels que les lipides, la bilirubine et l'hémoglobine (hémolyse) peuvent interférer sur le dosage.

15.8. Variations physiopathologiques :

- **Augmentation** dans les pathologies telles que l'insuffisance rénale, l'hypoparathyroïdie.
- **Diminution** en cas hyperparathyroïdie de chimiothérapie.

16- SODIUM, POTASSIUM, CHLORE

16.1. Objet :

Il s'agit de la détermination des ions Sodium, Potassium et Chlorure dans le plasma ou le sérum.

16.2. Conditions de prélèvement :

- ❖ Sang : Le prélèvement se fait après un jeûne de 12 heures sur tube sec ou éventuellement sur tube contenant comme anticoagulant de l'héparinate de lithium. Le garrot est utilisé de façon exceptionnelle.
- ❖ Urines de 24H : collectées dans un bocal propre

16.3. Méthodes de détermination :

❖ La photométrie de flamme :

Sous l'action de la flamme, une partie des ions passe dans un état excité, le retour à l'état fondamental des électrons de la couche externe s'effectue avec émission caractéristique de l'ion en présence.

La photométrie de flamme repose sur le fait que l'intensité de l'émission est proportionnelle aux nombres d'atomes retrouvés à l'état initial.

La lumière émise est donc proportionnelle à la concentration de l'échantillon.

❖ La méthode potentiométrique :

Elle est basée sur l'utilisation d'électrodes sélectives aux différents ions à l'aide d'échantillons dilués ou non. On mesure la ddp créée par la présence des ions dans la solution.

La mesure peut être réalisée soit directement sur l'échantillon non dilué (potentiométrie directe), soit après dilution de l'échantillon (potentiométrie indirecte)

Le dispositif de la potentiométrie se comporte comme une pile :

- L'électrode de référence donne un potentiel stable
 - L'électrode de mesure est une électrode dont le potentiel va changer en fonction de l'activité de l'ion à doser.
- La mesure se fait comparativement à une solution étalon (standard). La ddp mesurée aux bornes du système est fonction de l'activité de l'ion à mesurer.

16.4. Performances:

La limite de linéarité pour le sodium, le potassium et le chlore sont respectivement de 250,30 et 250 mmol/l. Les limites de détection sont de 20, 0,2 et 20 mmol/l. Les coefficients de variation sont 0,26%, 0,44% et 1,2%.

16.5. Mode opératoire :

- Faire les dilutions nécessaires pour tous les échantillons
- Allumer l'appareil
- Suivre le protocole d'utilisation du photomètre
- Calibrer l'appareil
- Utiliser un sérum de contrôle en début de série
- Passer les échantillons un à un

Pour la méthode potentiométrique les échantillons sont utilisés soit dilués ou non, ce sont des modules intégrés le plus souvent au niveau des automates.

16.6. Valeurs usuelles :

❖ Sang : **Na** : 135 à 145 mEq/L

K : 3.8 à 4.9 mEq/L

Cl : 98 – 106 mEq/L

❖ Urines : **Na** : 50- 220 mEq/24H

K : 25- 130 mEq/ 24H

Cl : 50-220 mEq/24H

16.7. Interférences :

Na : L'hydrazine, les diurétiques et la méthyl dopa peuvent interférer sur le taux de Na

K : Certains antihypertenseurs: diurétiques (surtout thiazidiques), bloquants

Amphotéricine B, méthicilline, pénicilline G, tétracyclines, corticoïdes

Glucose, insuline ou potassium en perfusion peuvent interférer

16.8. Variations physiopathologiques :

Le stress et l'émotion peuvent influencer le taux des ions

- Hyponatrémies : $\text{Na} < 135 \text{ mEq/L}$

- Déshydratation extracellulaire : vomissements, diarrhées, brûlures étendues

- Rétention d'eau, oedèmes

- Surdosage en diurétiques

- Insuffisance rénale importante

- Hyperprotidémie, hyperlipidémie, ou hyperglycémie

- Hypernatrémies : $\text{Na} > 145 \text{ mEq/L}$

Souvent liée à une diminution de la quantité d'eau dans l'organisme entraînant la sensation de soif :

- Déficit hydrique par diarrhées, vomissements, sudation, pertes respiratoires

- Diurèse osmotique, diabète insipide, coma hyperosmolaire du diabétique

- Hypokaliémies : $K < 3,5 \text{ mEq/l}$:
 - Diarrhée
 - Apports insuffisants : anorexie, alcoolisme
 - Troubles de l'équilibre acido-basique
 - Traitement prolongé par les diurétiques
 - Néphropathie interstitielle
 - Hyperkaliémies : $K > 5,2 \text{ mEq/l}$:
 - Insuffisance rénale
 - Diurétiques hyperkaliémiants
 - Insuffisance cortico-surrénale, maladie d'Addison, hypoaldostéronisme
 - Apports excessifs de potassium en perfusion
 - Acidocétose diabétique
 - Hypochlorémie :
 - Pertes digestives, rénales.
 - Insuffisance cardiaque, rénale, hépatique; œdèmes.
 - Hyperchlorémie :
 - Déshydratation (pertes digestives), perte d'eau importante, sudation.

ENZYMES

A. LES TRANSAMINASES

1. Objet :

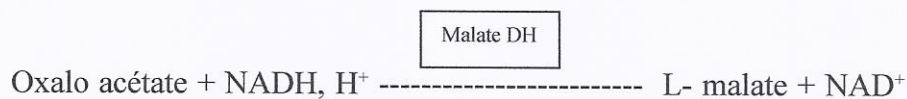
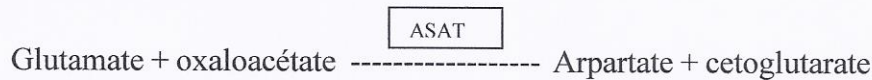
Il s'agit de la détermination de l'aspartate amino transférase (ASAT) et de l'alanine aminotransférase (ALAT).

2. Conditions de prélèvement :

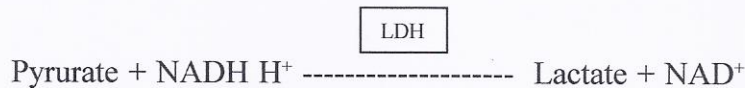
Le prélèvement se fait préférentiellement sur tube sec chez un sujet à jeun.

3. Méthodes de détermination :

❖ ASAT



❖ ALAT



La vitesse initiale de formation du NAD⁺ est directement proportionnelle à l'activité catalytique de l'ASAT ou de l'ALAT. Elle est mesurée par la diminution de l'absorbance à 340nm.

4. Performances:

- ❖ ASAT : La limite de linéarité est de 700UI/l, la limite de détection est de 1,5UI/L et le coefficient de variation 1,4%
- ❖ ALAT : La limite de linéarité est de 700UI/l, la limite de détection est de 1,5UI/l, le coefficient de variation 1%

5. Mode opératoire :

Il faut s'assurer avant emploi que les réactifs et les échantillons sont à la température ambiante pendant 10 à 20 minutes. Mélanger 100 µl d'échantillon et 1ml de réactif, lire les absorbances à 405 nm (400 nm-420 nm) toutes les minutes pendant 3 minutes

Activité (U/L) = Facteur * ΔDO/mn

Le facteur est donné par le fabricant

6. Valeurs usuelles :

TGO <30 UI/l à 37°C

TGP > 45 UI/l à 37°C

7. Interférences :

Les anticonvulsivants, les médicaments toxiques pour le foie peuvent interférer sur le dosage des transaminases.

8. Variations physiopathologiques :

ASAT est augmenté dans les lésions hépatiques, musculaires et cardiaques

ALAT > 45 UI/l est témoin d'une atteinte du foie.

B- PHOSPHATASE ALCALINES

1. Objet :

Cette procédure décrit les modalités techniques de la détermination des activités enzymatiques des phosphatases alcalines.

2. Conditions de Prélèvement :

Le prélèvement se fait chez un sujet à jeun depuis 10 heures environ. Le dosage peut être fait sur du sérum ou du plasma recueilli dans un tube contenant de l'héparinate de lithium. Les échantillons peuvent être congelés à moins 20°C pendant 3 mois. Il est conseillé de ne pas traiter les échantillons hémolysés, contaminés ou ayant subi plus d'une décongélation. Il faut éviter les anticoagulants comme l'oxalate, le citrate ou l'EDTA. Il est recommandé de séparer le plus rapidement possible le sérum ou le plasma du culot globulaire (dans les 2 heures qui suivent le prélèvement). Le sérum ou le plasma peuvent être conservés 3 jours à +4°C dans un tube bouché.

3. Méthodes de détermination :

En milieu alcalin, les PAL catalysent l'hydrolyse du p-nitrophénylphosphate en p nitrophénol et phosphate. La vitesse d'apparition du p-nitrophénol, suivie par la variation d'absorbance à 405 nm est proportionnelle à l'activité des PAL dans le spécimen.

4. Performances :

La méthode est linéaire jusqu'à 1200 UI/l. La limite de détection est 30 UI/l, le coefficient de variation 1,5%.

5. Mode opératoire :

Il faut s'assurer avant emploi que les réactifs et les échantillons sont à la température ambiante pendant 10 à 20 minutes. Introduire dans une cuve thermostatée de 1 cm de trajet optique, 1 ml de réactif, laisser la température s'équilibrer à 37 °C puis ajouter 10 µl de spécimen. Mélanger et après 1 minute, lire les absorbances à 405 nm (400 nm - 420 nm) toutes les minutes pendant 3 minutes

Echantillon 20µl

Solution de travail 1ml

Calcul : activité PAL (U/L)=Facteur * ΔDO/mn

Le facteur est donné par le fabricant

6. Valeurs usuelles :

PAL	25°c	30°c	37°c
Enfant :	< 400U/L	< 500U/L	< 650U/L
Adulte :	< 190U/L	< 230U/L	< 300U/L

7. Interférences :

Les triglycérides (>10 g/l), l'hémoglobine (>16g/l) et la bilirubine (150 mg/l) peuvent interférer lors de la détermination de l'activité.

8. Variations physiopathologiques :

- **Augmentation :**

Affections hépatobiliaires : Obstruction biliaires, calcul du cholédoque, cancer de la tête du pancréas

Affections osseuses : Rachitisme, Ostéomalacie, Maladie de Paget

Affection néoplasiques.

C- GAMMA GLUTAMYL TRANSPEPTIDASE (GGT)

1. Objet :

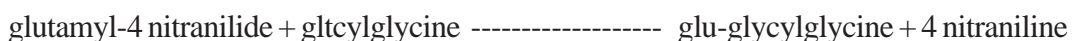
Cette procédure décrit les modalités techniques de la détermination des activités enzymatiques de la αGT.

2. Conditions de prélèvement :

Le prélèvement se fait chez un sujet à jeun depuis 10 heures environ. Il peut être constitué de sérum ou de plasma recueilli sur héparinate de lithium. Les échantillons peuvent être congelés à moins 20°C pendant 3 mois. Il est conseillé de ne pas traiter les échantillons hémolysés, contaminés ou ayant subi plus d'une décongélation. Il est recommandé de séparer le plus rapidement possible le sérum ou le plasma du culot globulaire (dans les 2 heures qui suivent le prélèvement). Le sérum ou le plasma peuvent être conservés 3 jours à +4°C dans un tube bouché.

3. Méthodes de détermination :

Méthode utilisant le L α-glutamyl-4 nitranilide : la détermination de la αGT est réalisée en mode cinétique colorimétrique utilisant le α-glutamyl-4 nitranilide. La αGT catalyse la réaction suivante :



La vitesse de formation de la 4 nitraniline qui correspond à l'activité de la αGT est déterminée en mesurant l'augmentation d'absorbance à 405 nm.

4. Performances :

La méthode est linéaire jusqu'à 320 UI/l, la limite de détection est 4 UI/L, le coefficient de variation 5%.

5. Mode opératoire :

Il faut s'assurer avant emploi que les réactifs et les échantillons sont à la température ambiante pendant 10 à 20 minutes.

- Introduire dans une cuve thermostatée de 1 cm de trajet optique, 1 ml de réactif
- Laisser la température s'équilibrer à 37 °C puis ajouter 50 µl de spécimen.
- Mélanger et après 1 minute, lire les absorbances à 405 nm (400 nm-420 nm) toutes les minutes pendant 3 minutes

Echantillon 50µl

Solution de travail 1ml

Calcul : activité PAL (U/L)=Facteur * ΔDO/mn. Le facteur est donné par le fabricant.

6. Valeurs usuelles

Hommes : 15 - 80 UI/L

Femmes : 10 - 50 UI/L

7. Interférences

L'acide ascorbique, l'hémoglobine et la bilirubine (150 mg/l) peuvent interférer lors de la détermination de l'activité.

8. Variations physiopathologiques :

❖ Causes hépatiques :

Hépatites virales ou microbiennes, Hépatite toxique ou médicamenteuse, Cirrhose hépatique d'origine alcoolique ou médicamenteuse, Maladie des voies biliaires (souvent associée à une augmentation des phosphatases alcalines)

❖ Causes non hépatiques :

Alcoolisme chronique (spécificité à 80%), Infarctus du myocarde, Insuffisance cardiaque, Insuffisance rénale aiguë, Syndrome néphrotique, Accident vasculaire cérébral, Maladies neurologiques, Epilepsie, Cancer du sein, Mélanome, Obésité, Prise de médicaments (somnifères, barbituriques, antidiabétiques, pilule contraceptive, médicaments antihypertenseurs), Diabète (stéatose), Hypertriglycéridémie, Hyperthyroïdie.

5 à 10 % des personnes ont des taux élevés sans cause retrouvée.

NB : Le taux de Gamma GT (GGT) est considéré comme un marqueur fiable de l'intoxication alcoolique.

D-AMYLASEMIE

1. Objet :

Cette procédure décrit les modalités techniques de la détermination des activités enzymatiques de l'amylasémie.

2. Conditions de prélèvement :

Le prélèvement se fait chez un sujet à jeun depuis 10 heures environ. Les échantillons peuvent être constitués de sérum non hémolysé ou de plasma recueilli sur héparinate de lithium. Ces spécimens peuvent être congelés à moins 20°C pendant 3 mois. Il est recommandé de séparer le plus rapidement possible le sérum ou le plasma du culot globulaire (dans les 2 heures qui suivent le prélèvement). Le sérum ou le plasma peuvent être conservés 3 jours à +4°C dans un tube bouché.

3. Méthodes de détermination :

❖ Méthode utilisant le 2 chloro-4-nitrophényl malto trioside (CNP3) :

Le principe de cette méthode met à profit la réaction d'hydrolyse ci-dessous catalysée par l'amylase. Elle est réalisée en mode cinétique

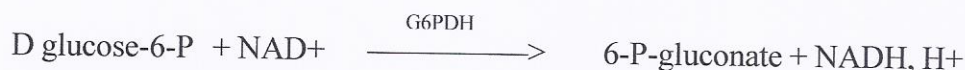
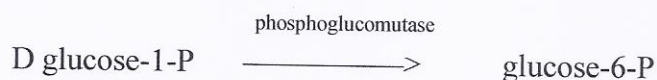
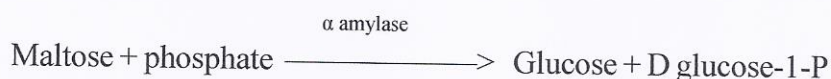
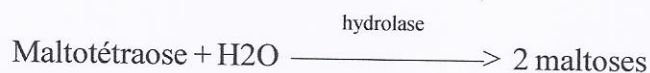


La vitesse de formation du CNP qui correspond à l'activité de l'amylase est déterminée en mesurant l'augmentation d'absorbance à 405 nm.

CNP (Chloro-nitro-phénol) ; G3 (maltotriose) ; G (glucose)

❖ Méthode utilisant le Maltotétraose (UV) :

L'activité de l'amylase peut être mesurée par une méthode UV en cinétique utilisant comme substrat le maltotétraose suivant :



La vitesse de formation du NADH est proportionnelle à l'activité catalytique de l'alpha amylase; elle est suivie à la longueur d'onde de 340 nm.

4. Performances :

La méthode CNPG3 est linéaire jusqu'à 2000 UI/l, la limite de détection est 6 UI/l, le coefficient de variation 3,5%.

5. Mode opératoire :

Il faut s'assurer avant emploi que les réactifs et les échantillons sont à la température ambiante pendant 10 à 20 minutes. Introduire dans une cuve thermostatée de 1 cm de trajet optique, 1 ml de réactif ; laisser la température s'équilibrer à 37 °C puis ajouter 25 µl de spécimen. Mélanger et après 30 secondes, lire les absorbances à 405 nm (400 nm - 420 nm) toutes les 30 s pendant 90 s.

Calcul : activité PAL (U/L)=Facteur * ΔDO/mn

Le facteur est donné par le fabricant.

6. Valeurs usuelles :

Sérum : 20 - 80 UI/L

Urines : 24 - 400 UI/24 h

7. Interférences :

Les anticoagulants comme l'oxalate, EDTA, citrate peuvent interférer

8. Variations physiopathologiques

• Augmentations

- Pancréatite aigue hémorragique
- Pancréatites chroniques et cancers du pancréas
- Parotidites
- Autres affections : perforations d'ulcères gastro-duodénaux, occlusions intestinales hautes, lithiase biliaire

ANALYSES QUALITATIVES DES URINES

1. Objet :

Cette procédure décrit les modalités techniques de la recherche de substances au niveau des urines.

2. Conditions de prélèvement :

La collecte des urines se fait le plus souvent au milieu du jet dans un récipient propre (aucune trace de détergent) et identifié au nom du patient. Il est recommandé après la miction, traiter l'urine au plus vite (dans les 2 heures). Si les urines ont été conservées au frigo, attendre la remise à température ambiante (environ 30 minutes).

3. Méthodes de détermination :

Le test se compose d'une bandelette présentant des zones réactives de chimie sèche permettant de rechercher dans l'urine la présence qualitative et/ou semi-quantitative de différents paramètres tels que le pH, les protéines (albumine), le glucose, les corps cétoniques, et le poids spécifique (densité).

La mise en évidence du pH est possible grâce à la présence de plusieurs indicateurs chromogènes avec comme valeur seuil : 5,0.

La recherche de l'albumine est basée sur la présence d'un indicateur de couleur qui vire à partir d'une valeur seuil de 60 mg/L.

Pour ce qui est du glucose, sa mise en évidence est réalisée par la méthode glucose-oxydase / peroxydase avec comme seuil de détection 0,4 g/L (2,2 mmol/L)

La détection des corps cétoniques est basée sur le principe de la réaction colorimétrique de Légal avec comme valeur seuil 0,05 g/L (0,5 mmol/L).

Enfin le poids spécifique mesure la densité par détection de la concentration des ions de l'urine avec comme valeur seuil 1,000 kg/L

4. Performances :

- PH : seuil de détection : 5
- Glucose : seuil de détection : 0,4 g/l
- Albumine : seuil de détection : 60 mg/l
- Corps cétoniques : seuil de détection : 0,05 g/l
- Densité : seuil de détection : 1 kg/l

5. Mode opératoire :

- . Vérifier la date de péremption des bandelettes réactives.
- . Procéder à un recueil aseptique des urines du patient.
- . Effectuer un lavage simple des mains ou effectuer un traitement hygiénique des mains par frictions avec une solution hydro-alcoolique
- . Mettre des gants non stériles pour se protéger d'éventuelles projections.
- . Prélever des urines avec la seringue stérile.
- . Déposer quelques gouttes d'urines sur chaque réactif de la bandelette.
- . Tamponner le rebord de la bandelette sur la compresse pour éliminer l'excès d'urine.
- . Maintenir la bandelette horizontalement pour éviter le mélange des réactifs. Attendre 1 minute.
- . Comparer les résultats obtenus avec la réglette comparative.
- . Conserver les urines au frais si elles ne sont pas utilisées dans l'immédiat
- . Jeter le matériel et les gants.
- . Transmission : heure d'analyse, aspect et odeur des urines, résultats obtenus.

6. Valeurs usuelles :

Il s'agit de recherche qualitative. Chez le sujet sain, ces substances peuvent être présentes mais à des concentrations inférieures aux valeurs seuils.

7. Interférences :

Les oxydants forts (eau de javel, liqueur de Dakin), les salicylés (Vitamine C) peuvent interférer sur la détermination de la glycosurie.

L'acide phényl pyruvique, l'alpha méthyl dopa peuvent interférer dans la détermination des corps cétoniques.

8. Variations physiopathologiques :

- **pH** : en complément d'autres paramètres.

- **Densité** : symptôme d'infection urinaire.

- **Glucose** : dépistage et contrôle du diabète sucré ou d'une hyperglycémie.

- **Corps cétoniques** : anomalies du métabolisme, danger de céto-acidose, témoin d'une hyperglycémie.

- **Albumine** : symptôme d'une maladie des reins et des voies urinaires, évaluation de la fonction rénale : insuffisance rénale.

ANALYSES DE BACTERIOLOGIE

Paquet Minimum d'activités en Bactériologie

Pour les Laboratoires de niveau périphérique

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)

2. Autres recherches 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

Pour les Laboratoires de niveau intermédiaire

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

2. Autres recherches 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)

Pour les Laboratoires de niveau national**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

2. Pour les autres recherches 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)

1. Diagnostic des maladies à potentiel épidémique

1.1. Choléra

❖ *Prélèvement*

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

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



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.

❖ **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 ou présentant d'autres aspects.

❖ **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 X40) pour rechercher essentiellement une mobilité suspecte des bactéries, à savoir des bacilles très mobiles grâce à une ciliature polaire, comparables à des étoiles filantes.

Après coloration de Gram, les vibrions se présentent sous forme de bacilles à Gram négatif droits ou incurvés (en virgule).



Aspect en virgule des vibrions après coloration de Gram

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

- rendre les résultats obtenus après examens macroscopique et microscopique ;
- ensemercer un milieu de transport (Cary Blair) et l'envoyer au laboratoire régional ou national le plus proche.

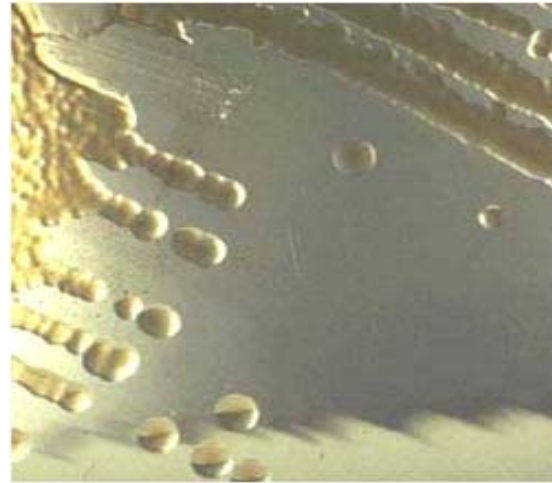


Milieu de Cary Blair (gélose semi solide)

❖ Isolement

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

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

❖ Identification

Elle est réalisée sur les colonies suspectes après vérification de la morphologie et de la mobilité à l'examen microscopique (bacilles très mobiles par ciliature polaire, à Gram négatif incurvés).

Elle est réalisée en deux étapes :

- **Identification biochimique**
 - test à l'oxydase (qui doit être positif)
 - ensemencement d'une galerie d'identification minimale :
 - ✓ Kligler-Hajna ;
 - ✓ Mannitol-Mobilité ;
 - ✓ Citrate de Simmons ;
 - ✓ Urée-Indole ;
 - ✓ Eau peptonée sans indole ;
 - ✓ Eau peptonée nitrée.

Les principaux caractères biochimiques de *Vibrio cholerae* sont:

- ✓ 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*

L'agglutination sur lame à l'aide d'un test au latex **permet de** déterminer le séro groupe et le sérotype :

- ✓ les sérogroupes O1 et O139 sont responsables d'épidémies ;
- ✓ le séro groupe O1 compte trois sérotypes : Ogawa, Inaba et Hikojima.



*Agglutination sur lame
(sérogroupage)*

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

❖ **Enrichissement**

Après les examens macroscopique et microscopique, un milieu d'enrichissement est ensemencé **sur tube** et incubé pendant 3 heures.

- A partir du 1^{er} tube:
 - repiquer un 2^e tube contenant de l'EPHA ;
 - réisoler parallèlement sur milieux d'isolement (GNA, TCBS).
- Au bout de trois heures supplémentaires, répéter la même opération à partir du 2^e tube d'EPHA.
- Après 16 à 18 heures, réaliser sur les colonies suspectes isolées sur GNA
 - un examen microscopique ;
 - un test à l'oxydase ;
 - les tests d'agglutinations.

NB : - à défaut de GNA, la gélose Mueller Hinton peut être utilisée.

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

❖ **Antibiogramme**

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

Les antibiotiques suivants doivent être testés pour la surveillance et pour des besoins thérapeutiques: amoxicilline, tétracycline, doxycycline, chloramphénicol, cotrimoxazole, furazolidone, érythromycine, norfloxacine.

❖ **Acheminement des souches au laboratoire national de référence**

Les souches identifiées et isolées en culture pure seront acheminées au Laboratoire National de Référence sur milieu de conservation approprié, conformément aux règles d'expédition des échantillons infectieux.

1.2. Diagnostic des méningites bactériennes

❖ Prélèvement

Le liquide céphalorachidien (LCR) est prélevé par ponction lombaire (acte médical à réaliser par un médecin). Le prélèvement est recueilli dans trois tubes stériles dont un est destiné à l'examen bactériologique.

❖ Transport

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

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

❖ Examen macroscopique :

L'aspect du LCR est noté dès l'arrivée de l'échantillon.

Il peut être clair, louche, trouble, purulent, hématisé, xanthochromique.

Un LCR clair n'exclut pas une méningite :

- cas des méningites purulentes au début ;
- cas des méningites décapitées par une antibiothérapie préalable ;
- cas des méningites tuberculeuses, virales, parasitaires ...

❖ Examen microscopique

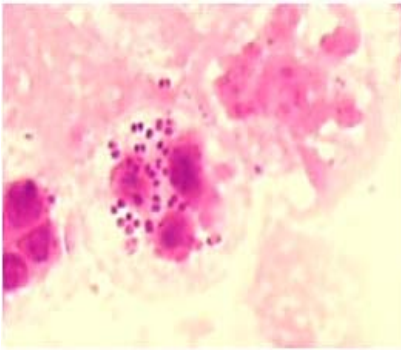
Il permet une étude cytologique et bactériologique :

- La cytologie quantitative est effectuée sur le LCR total par dénombrement sur cellule de Malassez ou de Kova qui permet de déterminer le nombre de cellule par millimètre cube de LCR. Ce nombre est égal à 1 à 3 / mm³ 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 :
 - diplocoques à Gram négatif en « grain de café » ;
 - diplocoques à Gram positif lancéolés, encapsulés ;
 - bacilles à Gram négatif polymorphes, ...

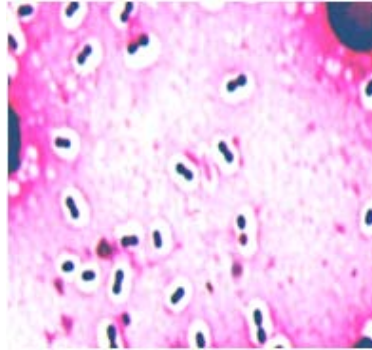
❖ Recherche d'antigènes solubles (*agglutination au latex*) :

Elle permet un diagnostic rapide de la méningite grâce à un test d'agglutination effectué sur le surnageant de centrifugation, suivant les directives formulées par le fabricant de la trousse utilisée.

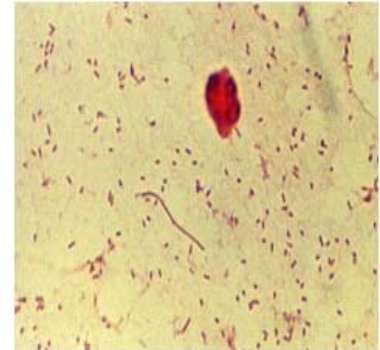
NB : les résultats obtenus par les laboratoires qui ne réalisent pas la culture, sont rendus après examens macroscopique et microscopique, cytologie quantitative et qualitative et test d'agglutination. Le reste de l'échantillon de LCR est mis dans un milieu de transport tel que le Trans-Isolate (TI) puis acheminé au Laboratoire Régional ou National le plus proche.



Méningocoque



Pneumocoque



Haemophilus influenzae

Aspect microscopique de bactéries pouvant être retrouvées dans le LCR



Milieu de transport diphasique :

Trans-Isolate

❖ **Culture et identification de *Neisseria meningitidis***

Le LCR est ensemencé sur milieux enrichis, puis incubés sous atmosphère enrichie en CO₂, dès l'arrivée du prélèvement.

- *Isolement de Neisseria meningitidis (agent de méningite épidémique) :*

Inoculation du LCR total sur des milieux riches (Mueller Hinton et Gélase au Sang Cuit GSC, additionnée de mélange polyvitaminique);

- *Identification de Neisseria meningitidis :*
 - Recherche d'oxydase sur les colonies suspectes ;
 - Ensemencement d'une galerie (Galerie API NH pour *Neisseria* et *Haemophilus*, Galerie *Neisseria 4 heures*).

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

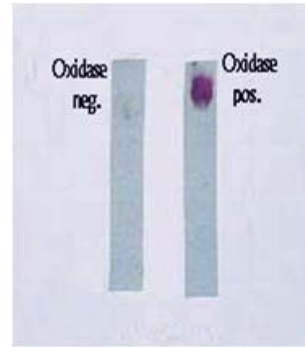
Les tests d'agglutination permettent de confirmer et de déterminer le sérotype (A, B, C, Y, W135,...)

❖ **Antibiogramme**

La sensibilité des souches aux antibiotiques suivants sera particulièrement surveillée : chloramphénicol, cotrimoxazole, aminopénicilline, céphalosporines de 3^e génération.



*Colonies de Neisseria meningitidis
sur gélose au sang cuit*



Test d'oxydase

❖ **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 approprié, conformément aux règles d'expédition des échantillons infectieux.

1.3. Diagnostic des Shigelloses

❖ **Prélèvement**

Les selles sont recueillies dans des pots propres.

❖ **Transport**

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

❖ **Examen macroscopique**

Il permet de vérifier la consistance des selles, la présence de glaire, de sang ou de mucus.



Selles sanglantes, suspectes de shigellose

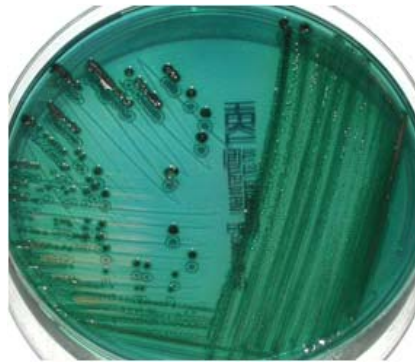
❖ Examen microscopique :

En cas de shigellose, la présence de nombreux polynucléaires est notée ainsi qu'un déséquilibre de la flore avec une prédominance de bacilles immobiles. En outre, cet examen permet d'écartier la présence d'amibe.

NB : Les laboratoires périphériques qui ne peuvent pas procéder à la culture rendent les résultats obtenus ; puis, ensemencent un milieu de transport (Cary Blair) qui sera envoyé au Laboratoire Régional ou National le plus proche.

❖ Isolement et Identification

L'ensemencement est réalisé sur milieux sélectifs (exemples : gélose Hektoen, gélose Salmonelle-Shigelle) incubés à 37°C. Au bout de 24 heures, les colonies suspectes (Lactose, SH₂-) sont ensemencées sur milieu Urée-Indole en tubes (3 à 5).



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 *Shigella dysenteriae*-1, uréase (-), fermentent le glucose sans production de gaz, H₂S (-), ne se développent pas sur milieu Citrate de Simmons.

Caractères différentiels des espèces de Shigella

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

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

❖ **Antibiogramme**

Tester les antibiotiques suivants : amoxicilline, acide nalidixique, cotrimoxazole, tétracycline.

❖ **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 (exemple le MH), conformément aux règles d'expédition des échantillons infectieux.

2. Etudes des autres produits pathologiques en Bactériologie

2.1. Examen cyto-bactériologique des urines (ECBU)

❖ **Prélèvement**

Conditions

- Recueillir de préférence, les urines du matin, avant toute miction ou prélever à défaut, 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 clampage après un nettoyage soigneux ;
- Prélever idéalement avant toute antibiothérapie ;
- Respecter une asepsie rigoureuse.

❖ **Technique**

- Chez l'adulte et le grand enfant : au cours d'une miction physiologique, il faut nettoyer le méat urinaire, rejeter les premières gouttes d'urines et recueillir le 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 correctement remplie.
- Les urines peuvent aussi être conservées à +4°C pendant 2 heures.

❖ **Examen macroscopique**

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

Urines claires



Urines troubles

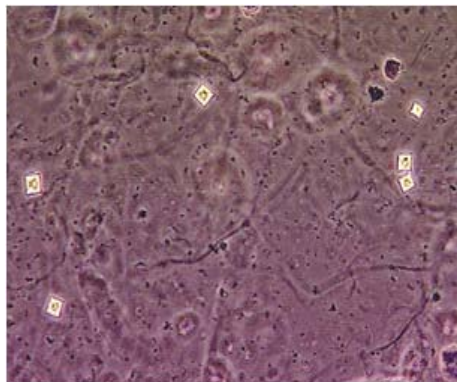


Aspect macroscopique des urines

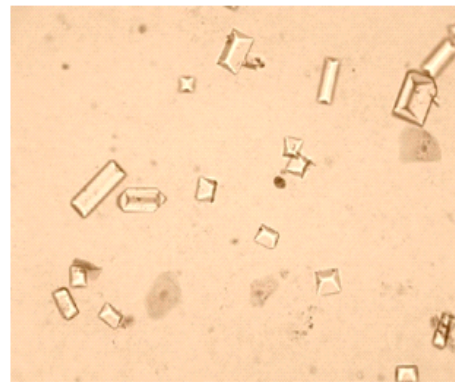
❖ **Examen microscopique**

- 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.

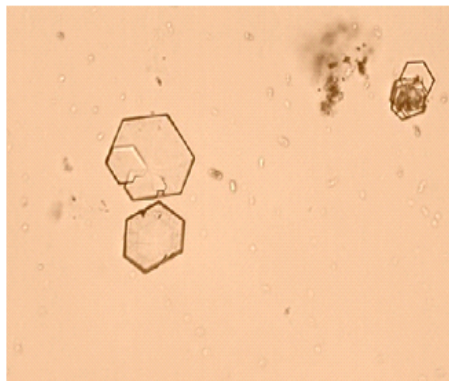
Oxalate de calcium



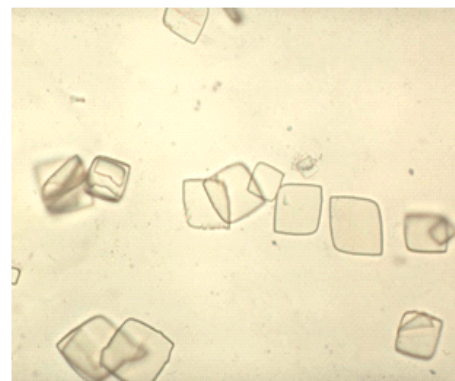
Phosphate



Cystine



Acide urique

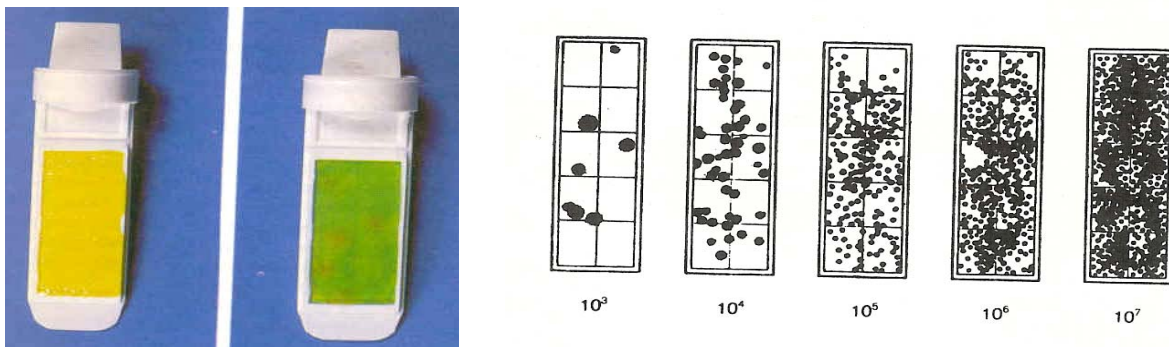


Exemples de cristaux pouvant être retrouvés dans les urines

- 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 et d'orienter le choix de milieux de culture.

❖ *Culture et 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, puis à l'incuber à 37°C pendant 24 heures. La lecture consistera à comparer la densité des colonies bactériennes obtenue aux modèles fournis dans la trousse. Une infection du tractus urinaire est retenue lorsque le DGU donne un résultat supérieur ou égal à 10^5 bactéries / ml avec l'isolement d'une souche pure et la présence de leucocyturie.



Des méthodes alternatives peuvent être utilisées, si les lames gélosées ne sont pas disponibles.

La méthode la plus couramment utilisée est celle de la dilution avec une anse calibrée de 10 µl :

- 10 µl d'urines totales sont diluées dans 1 ml d'eau physiologique, puis 10 µl de la dilution sont étalés sur une gélose CLED.
- après 24h d'incubation, le nombre de colonies présentes à la surface de la gélose est dénombré et les critères de lecture suivants sont observés :
 - absence de colonies = $DGU < 10^4$ bactéries /ml.
 - entre 1 et 9 colonies = $10^4 < DGU < 10^5$ bactéries/ml.
 - plus de 9 colonies = $DGU > 10^5$ bactéries/ml

❖ **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.

❖ *Antibiogramme*

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

2.2. Etude des Pus et liquides d'épanchement

❖ 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), furoncles, anthrax, abcès des viscères ;
- Phlegmons : inflammation localisée non collectée (prélèvement souvent impossible), adénites ;
- Foyers des séreuses :
 - Pleurésies : purulente, sérofibreuses ;
 - Péritonite purulente, ascite ;
 - Péricardite : purulente, séreuse
 - Synovite : purulente, séreuse

❖ Prélèvement

- Indications

- Seules les collections fermées sont prélevées ;
- Les pus de plaies ouvertes sont inexploitable et ne doivent pas être prélevés.

- Techniques

- Nettoyer la peau avec de l'alcool ;
- Prélever le pus à l'aide d'une seringue ;
- Inciser la collection avec un bistouri et prélever le pus avec une pipette Pasteur ou un écouvillon

- Transport et 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).

❖ Technologie au Laboratoire

- Examen macroscopique

- Noter la consistance du pus
 - ✓ Purulent ;
 - ✓ Séreux, citrin (exsudat, transsudat).

- Noter la couleur du pus
 - ✓ Bleue (faisant penser au bacille pyocyanique) ;
 - ✓ Chocolat (faisant penser au pneumocoque).
- Noter l'odeur du pus
 - ✓ Très fétide (évoquant les anaérobies).
- **Examen microscopique**
 - **Coloration de May Grunwald Giemsa**
 - ✓ Polynucléaires altérés (bactéries pyogènes) ;
 - ✓ Lymphocytes (virus, BK)
 - ✓ Absence de cellules (exsudat, transsudat).
 - **Coloration de Gram** : oriente le choix des milieux de culture
 - ✓ Noter la qualité de la flore (monomicrobienne ou polymicrobienne);
 - ✓ Noter la quantité de la flore (abondance des germes).
- **Culture**
 - Milieux
 - ✓ Gélose au sang frais ou au sang cuit ;
 - ✓ Bouillon thioglycolate ou bouillon cœur-cerveille.
 - Recherche particulière
 - ✓ Anaérobies (ensemencer le milieu de Rosenow, le milieu de Schaedler...) ;
 - ✓ BK (ensemencer la gélose de Löwenstein-Jensen).
- **Résultats et interprétation**
 - Flore monomicrobienne (c'est l'idéal) ;
 - Flore polymicrobienne (en cas de pleurésie ou de péritonite), lorsqu'il ya une association de germes anaérobies et de germes aérobies.

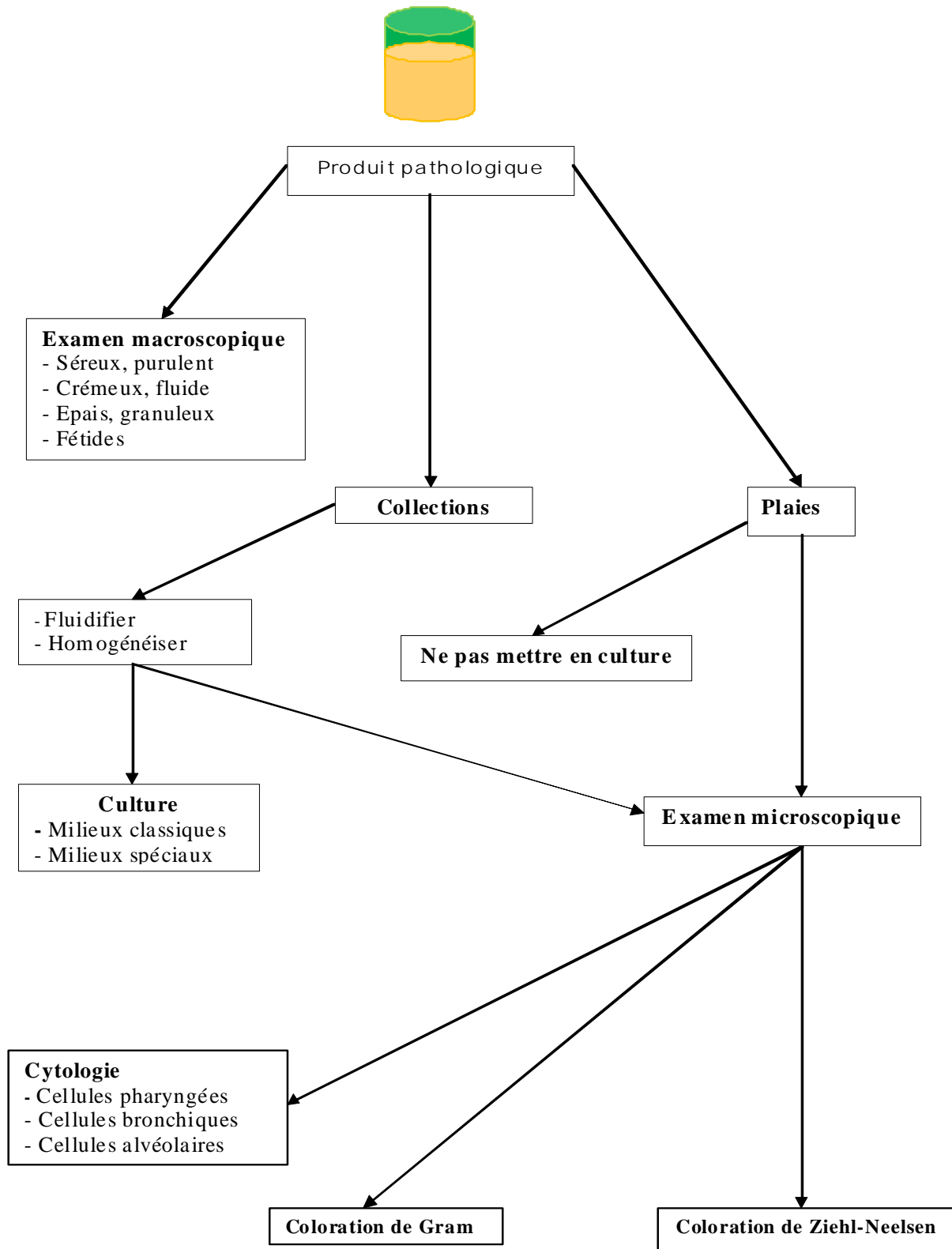
Caractéristiques des liquides pleuraux

Composition du liquide	Aspect macroscopique du liquide				
	Clair	Clair	Louche	Purulent	Hématique
Cellules/mm ³	< 500	> 500	> 500	> 2000	-
Lymphocytes	+	+++		Rares	+
Neutrophiles	+	Rares	+++	+++++	+
Germes	0	0	0	+++	+ ou 0
Culture	-	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	
Coagulation spontanée	Non	Oui	Oui	Oui
Leucocytes/mm ³	<200	50000- 200000	25000	5000-50000
Neutrophiles %	<25%	>80%	Variable	
GS/GL X 100 [♦]		<50%	<50%	
Culture	Négative	Variable	BK	Négative
Dosage des protéines : sans intérêt				

♦ Rapport glucose sanguin/glucose dans le liquide x 100



Examen cyto bactériologique des pus et liquides d'épanchement

2.3. Sécrétions broncho-pulmonaires

❖ Introduction

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

❖ Indications

Infections respiratoires inférieures.

❖ Techniques de Prélèvements

- Expectorations
 - ✓ le matin au réveil, après toilette bucco-dentaire ;
 - ✓ prélèvement physiologique après un effort de toux.
- Sécrétions prélevées avec des instruments
 - ✓ aspiration trans-trachéale
 - ✓ aspiration bronchique
 - ✓ brossage bronchique
 - ✓ lavage broncho-alvéolaire (LBA)

- Transport et conservation

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

- Prélèvements complémentaires

Hémoculture
Sérum sanguin (recherche d'antigènes solubles)

❖ Technologie au Laboratoire

▪ Examen macroscopique

Expectorations muqueuses, muco-purulentes, purulentes,
hémoptoïques etc. ;
Aspects des liquides d'aspiration

▪ Examen microscopique

Fluidifier, homogénéiser
Cytologie après 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

- **Examen bactériologique après coloration de Gram**

- flore monomorphe + PN > 25/ champ : mettre en culture
- prédominance d'un germe + PN > 25/champ : mettre en culture
- autres situations : ne pas mettre en culture.

- **Culture**

- Toujours ensemercer GSO et GSC +facteurs de croissance ;
- Utiliser d'autres milieux en fonction du Gram.
- Technique : Diluer les prélèvements au 1/1000 ;

Appliquer la méthode des cadrans.

- **Résultats**

Devant des bactéries pathogènes spécifiques

- ✓ Bronchopathies
 - *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. aureus* ;
 - *B. catarrhalis*, *N. mucosa* ;
 - Bacille pyocyanique, entérobactéries
- ✓ Pneumopathies
 - Pneumonie (*S. pneumoniae*)
 - Abscesses (*K. pneumoniae*, *S. aureus*, anaérobies)
 - Pneumopathies atypiques : *M. pneumoniae*, *Chlamydia*, *Legionella pneumophila*
- ✓ Utiliser d'autres milieux en fonction du Gram.

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.

2.4. Sécrétions ORL

❖ 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.

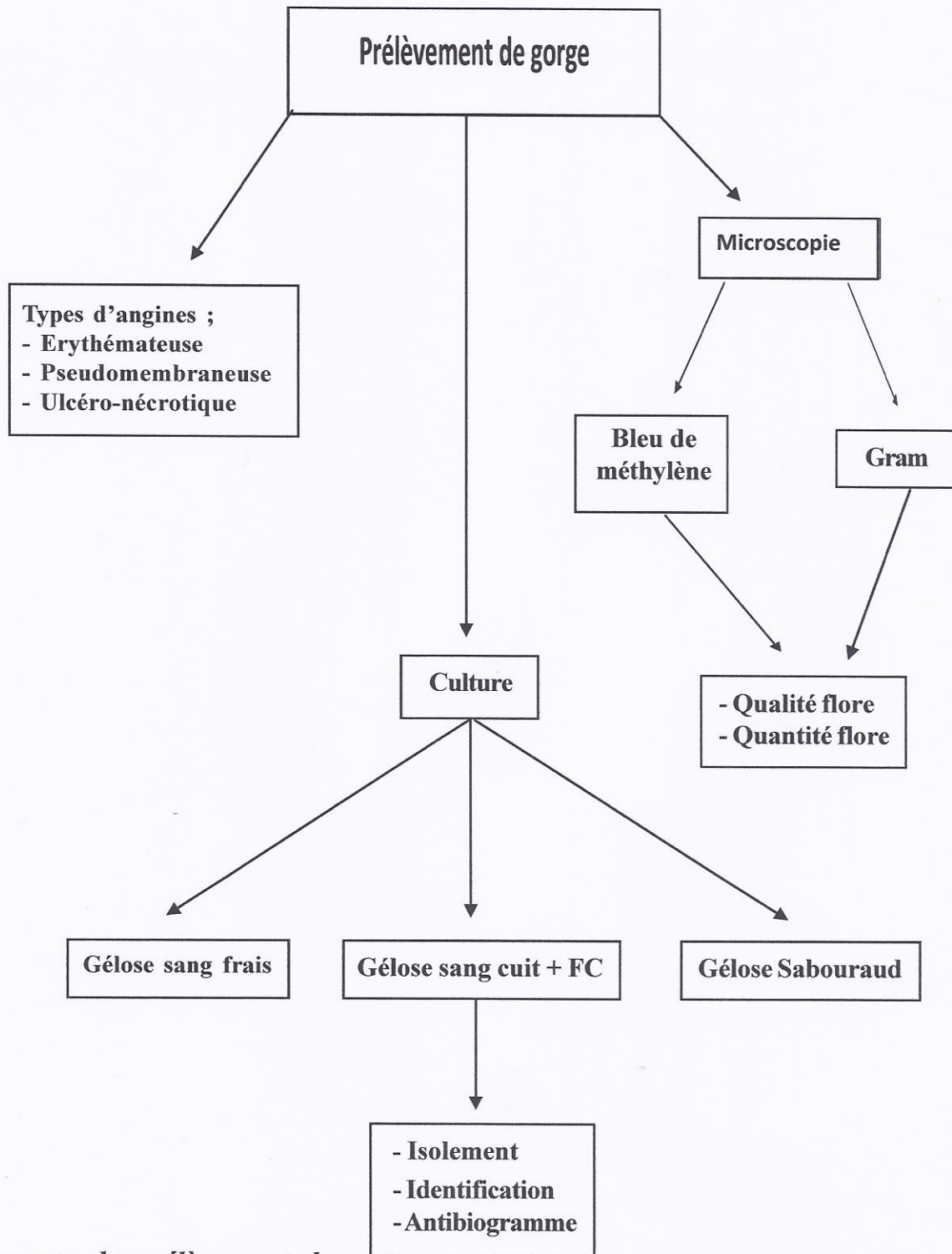
❖ Prélèvement du pharynx (gorge)

- Indications du prélèvement de gorge
 - tout épisode d'angine
 - angines à répétition chez un enfant
 - recherche de porteur sain de bactéries pathogènes spécifiques (BPS)
- Technique de prélèvement
 - Utiliser un écouvillon stérile et un abaisse-langue
 - Noter l'aspect anatomo-clinique de l'angine
 - Frotter 2 écouvillons sur les amygdales, la muqueuse du pharynx, sous les fausses membranes
- Transport et conservation
 - transport immédiat, sans délai (risque de dessèchement)
 - milieux de transport-conservation disponibles
 - humidifier les prélèvements si culture retardée

❖ Examen au laboratoire

- **Examen microscopique**
 - Coloration de Gram
 - ✓ Apprécier la qualité et l'abondance de la flore ;
 - ✓ Essayer d'isoler le germe prédominant.
 - Coloration au bleu de méthylène, pour apprécier la présence de levures, la cytologie etc.
- **Culture**
 - Choix des milieux
 - ✓ Géloses au sang frais + acide nalidixique ;
 - ✓ Gélose au sang cuit + complexe vitaminique ;
 - ✓ Bouillon d'enrichissement : streptosel, BGT

- ✓ Milieux spéciaux : au sérum de bœuf coagulé ; Hoyle
- Ensemencement par la méthode des quadrants
- **Recherches particulières**
 - *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema* ;
 - *Candida albicans* ;
 - *Herpes simplex virus*
 - ✓ Géloses au sang frais + acide nalidixique ;
 - ✓ Gélose au sang cuit + complexe vitaminique ;
 - ✓ Bouillon d'enrichissement : streptosel, BGT ;
 - ✓ Milieux spéciaux au sérum de bœuf coagulé ; Hoyle
- **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*
 - ✓ EBV (mononucléose infectieuse)
 - **Angines ulcéro-nécrotiques**
 - ✓ Angine de Vincent : association de 2 germes
 - ✓ Chancre syphilitique : *Treponema pallidum*
 - **Angines vésiculeuses d'origine virale**



Examen du prélèvement de gorge au laboratoire

❖ 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

▪ Techniques de prélèvements

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

▪ Transport et conservation

- Transport immédiat de l'échantillon au laboratoire
- transport dans un milieu de transport-conservation

▪ Examen 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

- OMA : *S. pneumoniae*, *Streptococcus spp.*, *S. aureus*, *H. influenzae*,
Entérobactéries, bacille pyocyanique
- Otite externe (furoncle) : *S. aureus*

❖ **Autres prélèvements** (ORL et oculaire)

- Ponction 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*, bactéries pathogènes strictes (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 en fonction du germe recherché ;
- Germes : *Chlamydia trachomatis*, *Moraxella*, pneumocoque, gonocoque, *Haemophilus*, *Staphylococcus aureus*...

2.5. Hémoculture

❖ 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 inexplicquée chez un cardiaque, une femme enceinte, un immunodéprimé ;
- tableau de septicémie ;
- hypothermie.

❖ Prélèvement

- Condition : avant toute antibiothérapie ;
 - Moment : aux pics fébriles, loin des repas ;
 - Rythme : hémoculture toutes les 6 heures
 - Technique
- Lieu de prélèvement : tout territoire veineux disponible ;
- Mode de prélèvement
- ✓ 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
- Mise en culture du sang (hémoculture)
 - Milieu 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 en le tenant le plus près possible de la flamme ;
 - ✓ Etiqueter 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

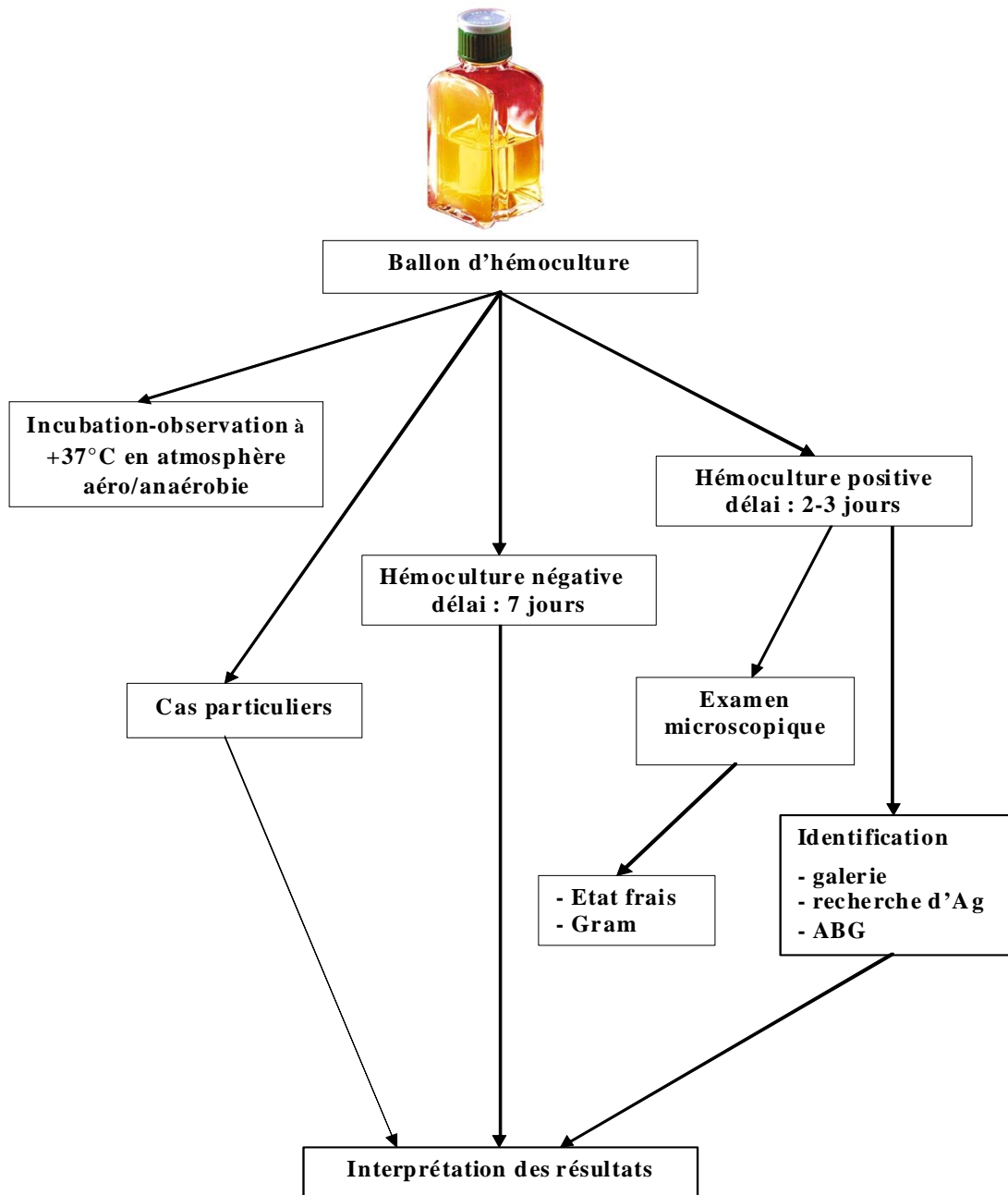
- Transport immédiat au laboratoire
- Conservation = incubation à +37°C

❖ Examen 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**
 - garder les ballons non suspects pendant 7 à 10 jours
 - repiquer systématiquement sur gélose au sang
 - si culture négative, rendre les résultats **au bout des 7 à 10 jours**
- **Recherches particulières**
 - médulloculture
 - ✓ fièvre typhoïde, brucellose
 - ✓ tuberculose miliaire
 - Utilisation de milieux spéciaux dans le diagnostic de la borreliose et de la leptospirose
- **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 va reposer sur l'isolement dans plusieurs ballons successifs :
 - ✓ si la culture est positive dans un seul ballon, la distinction sera difficile entre une souillure et une bactériémie ;
 - ✓ la présence de plusieurs germes dans un ballon signifie soit une souillure, soit une infection si le malade est cathétérisé, ou immunodéprimé.

▪ Hémoculture négative

- ✓ Absence d'infection bactérienne ;
 - ✓ Absence d'infection bactérienne du sang ;
 - ✓ Hémoculture réalisée tardivement durant l'évolution de la maladie ;
 - ✓ Malade sous antibiothérapie ;
 - ✓ Quantité de sang prélevée insuffisante ;
 - ✓ Milieux ou conditions de cultures inappropriées
- Délai d'observation trop court



2.6. Sérologies

❖ 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 jeun
- 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)

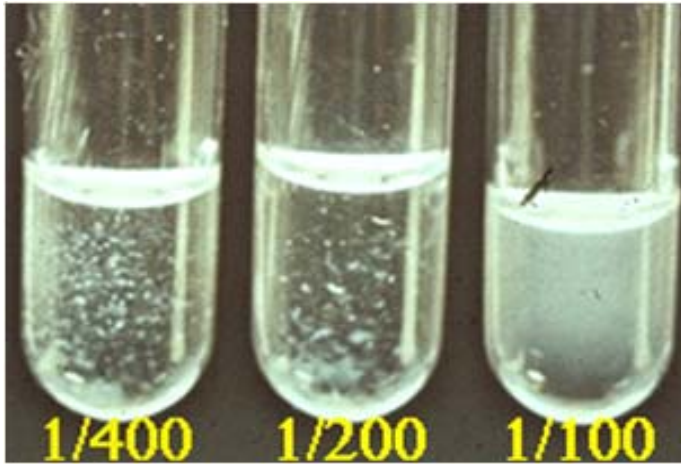
- Technique

Elle est réalisée en deux temps

- Détecter la présence des anticorps anti O, H et Vi aux dilutions 1/100^e et 1/200^e ;
 - Procéder au titrage de ces Anticorps
- Détection des anticorps
- ✓ Sérum dilué au 1/100^e + suspensions antigéniques ;
 - ✓ Sérum dilué au 1/200^e + suspensions antigéniques ;
 - ✓ Centrifugation-Chiquenaude-Lecture :
 - ▶ Dégagement de fumée = résultat négatif ;
 - Présence d'agglutinats (grains) = résultat positif

- Titrage

- ✓ Dilutions du sérum positif ;
- ✓ Dilutions croissantes de raison 2 : 1/400, 1/800, 1/1600°
- ✓ Centrifugation-Chiquenaude-Lecture :
- ✓ Titre final = inverse de la dernière dilution positive
Exemple : si dilution à 1/400° positive Titre : 400 UI/ml



Titration du sérum par dilution

- **Interprétation**

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

- Agglutinines O : apparaissent vers le 8^e 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^e et 12^e jour, atteignent rapidement le titre de 800 à 1600, mais persistent à titre faible pendant plusieurs mois voire années

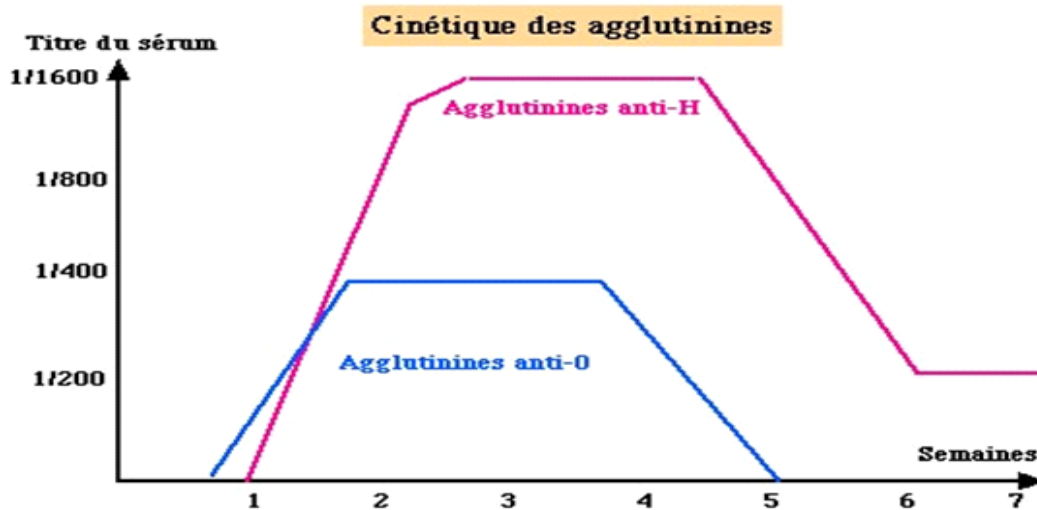
Elles sont retrouvées seules lors d'une infection ancienne ou d'une infection récente avec antibiothérapie précoce.

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 : co-agglutination
- 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.



Cinétique des anticorps durant la salmonellose

❖ 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 un antigène constitué de particules de latex polystyrène recouvertes de streptolysine O.

En présence d'anticorps anti-streptolysines O dans le sérum testé, il se forme une agglutination visible à l'œil nu.

- **Matériel nécessaire**

- Une trousse qui comprend le réactif, un contrôle positif, un contrôle négatif, des tiges, une carte d'agglutination (la trousse est conservé à +4°C) ;
- Un agitateur mécanique (non indispensable) ;

- **Mode opératoire**

- Sortir les réactifs et les laisser à la température ambiante ;
- Prélever le sang du patient, centrifuger et recueillir le sérum ;

- A l'aide d'une carte sur laquelle des cercles sont individualisés, déposer 50ul de sérum à tester dans un cercle et une goutte de chaque contrôle positif et négatif dans les autres cercles
- Agiter le réactif ASLO et ajouter une goutte sur le côté 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 manuellement un mouvement de rotation pendant 2 minutes
- Lire le résultat obtenu.

- **Lecture et Interprétation**

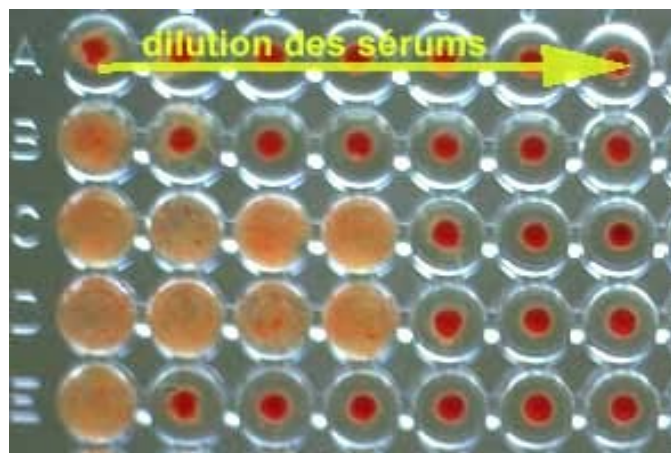
Absence d'agglutination : réaction négative = absence d'anticorps antistreptolysine O

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

- Une réaction positive traduit un taux $>$ au seuil de positivité du réactif utilisé ;
- 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 8×200 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.



Macrométhode (tubes)



Microméthode (plaque)

ANTIBIOGRAMME

1. Principe

Le principe consiste à placer une culture de bactéries en présence du ou des antibiotiques à tester et à observer les conséquences sur le développement et la survie de celle-ci.

Lorsqu'un disque d'antibiotique est déposé à la surface d'une gélose en un point donné, il diffuse en déterminant un gradient de concentrations inversement proportionnelles à la distance depuis la source. Une bactérie ensemencée à la surface de la gélose sera en contact avec les différentes concentrations d'antibiotique. Pour toute concentration supérieure à la CMI (concentration minimale inhibitrice), sa croissance sera inhibée. L'inhibition est matérialisée par une zone stérile circulaire tout autour du disque appelée zone d'inhibition. La valeur du diamètre d'inhibition lue peut être convertie en CMI en se servant des courbes de concordance.

2. Procédure

Les techniques utilisées sont réalisées dans des conditions strictement standardisées pour assurer la reproductibilité. Toutes les étapes sont d'égale importance et doivent être soigneusement réalisées. Une erreur sur l'une des étapes va influencer négativement les résultats.

2.1. Préparation du matériel et produits requis

Tous les équipements, matériels, consommables et réactifs nécessaires pour la réalisation de l'antibiogramme doivent être disponibles (voir annexe)

2.2. Milieux utilisés

Les milieux sont choisis en fonction de la famille, du genre et de l'espèce bactérienne comme indiqués sur le tableau suivant :

Germe étudié	Milieu utilisé
Entérobactéries <i>Pseudomonas</i> Bacilles à Gram négatif non fermentaires <i>Vibrio</i>	Mueller Hinton
Staphylocoques	<ul style="list-style-type: none">▶ Mueller Hinton hypersalé pour tester l'oxacilline et rechercher les SARM (incubation 37°C)▶ MH simple pour tester l'oxacilline à la température ambiante (30°C) ou la céfoxitine 30µg à 37°C.▶ MH simple pour les autres antibiotiques
Streptocoques Méningocoque	Mueller Hinton additionné de 5% de sang de mouton ou de cheval
<i>Haemophilus</i> <i>Neisseria</i>	Gélose au sang cuit supplémentée

2.3. Préparation de l'inoculum

Une culture fraîche de 24 heures bien identifiée, obtenue à partir d'une colonie typique est ensemencée la veille sur le milieu approprié.

- ☞ Prélever 1 à 2 colonies en fonction de l'espèce bactérienne à tester, à l'aide d'une anse stérile.
- ☞ Mélanger les colonies prélevées à 1,5 ml d'eau physiologique stérile à l'aide d'un agitateur type vortex ou à défaut une pipette Pasteur stérile;
- ☞ **Mesurer la turbidité de la suspension à l'aide d'un densitomètre ou un étalon Mac Farland**
- ☞ **Ajuster** la densité de la suspension en ajoutant soit un fragment de colonie, soit de l'eau physiologique
- ☞ Pour l'étalon Mac Farland :
Homogénéiser le tube étalon, au moment de le comparer à la suspension à tester.
Placer les deux tubes côte à côte et les éclairer de la même façon ;

2.4 Dilution de l'inoculum

Famille bactérienne	Densité à obtenir	Dilution	Dilution		Concentration de l'inoculum
			Suspension	Eau physiologique	
Entérobactérie	0,5 McF	1/100	1 ml	9 ml	10^8 UFC
<i>Pseudomonas</i>	0,5 McF	1/100	0,1 ml	9 ml	10^8 UFC
Staphylocoque	0,5 McF	1/100	1 ml	9 ml	10^8 UFC
Streptocoques	0,5 McF	1/10			10^7 UFC
Entérocoques	0,5 McF	1/100	0,1 ml	9 ml	10^6 UFC
Pneumocoque	0,5 McF	1/10			10^8 UFC
<i>Haemophilus</i>	0,5 McF	1/10	1 ml	9 ml	10^7 UFC
<i>Neisseria meningitidis</i>	0,5 McF	Pas de dilution	Ne pas diluer		10^6 UFC
Gonocoque	1 McF				
<i>Vibrio</i>		1/100			

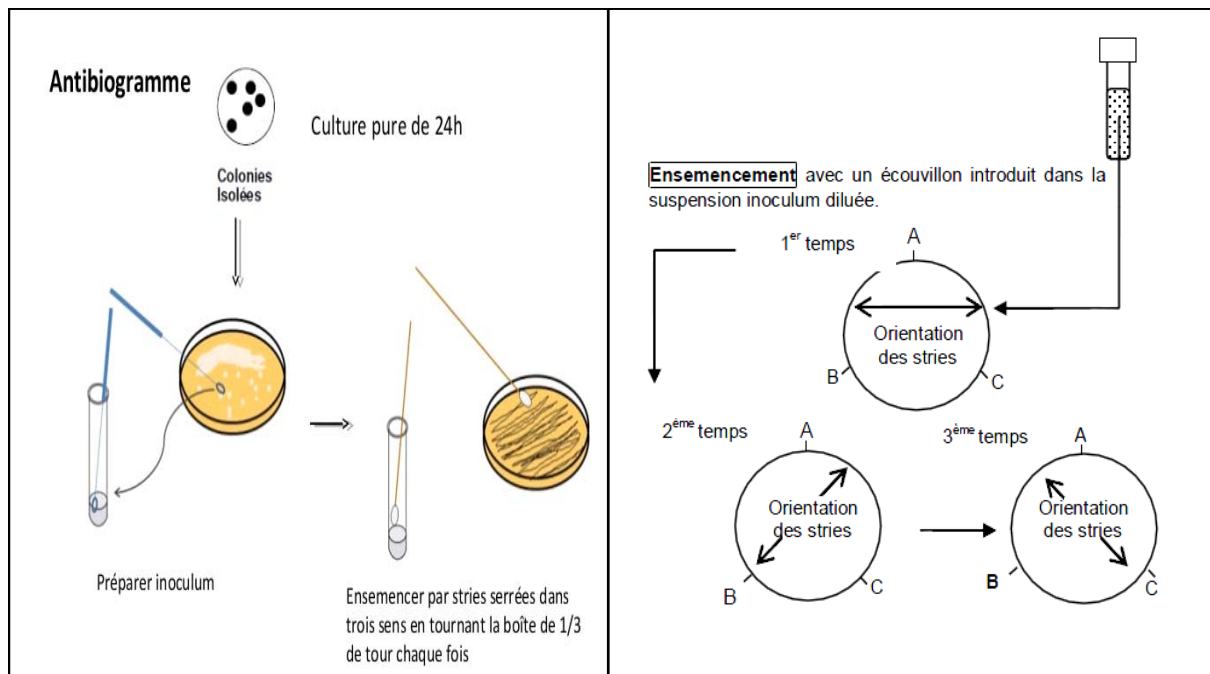
Facteurs influençant la préparation de l'inoculum

- ➡ Absence de pureté de la souche (Présence d'une souillure) ;
- ➡ Inoculum non standardisé dont la densité peut provoquer de fausses résistances.

2.5. Ensemencement des boîtes de pétri

Laisser les boîtes de pétri à la température ambiante, couvercle fermé pendant quelques minutes

- ➡ Sortir l'écouvillon stérile de son emballage juste avant son utilisation ;
- ➡ Tremper l'écouvillon stérile sec dans l'inoculum ;
- ➡ Eliminer l'excès d'inoculum en sortant l'écouvillon du tube tout en l'essortant doucement sur les parois, au dessus du niveau du liquide
- ➡ Ensemencer en stries serrées, sur toute la surface de la gélose en tournant la boîte trois fois, de 60° ;
- ➡ Passer l'écouvillon sur le bord de la gélose.



Préparation de l'inoculum et technique d'ensemencement des boîtes de Pétri

2.6. Choix des disques d'antibiotique

Le choix des disques d'ATB est fonction de la famille, du genre et de l'espèce bactérienne à étudier (voir annexe).

2.7. Application des disques d'antibiotique

Ramener les disques d'antibiotique à la température ambiante avant de les utiliser. Vérifier la charge et la date de péremption de chaque disque à utiliser. La disposition des disques d'antibiotique se fait soit avec un distributeur de disques d'antibiotique, soit à l'aide de pinces stériles.

- ☞ Disposer les disques à une distance de 30 mm l'un de l'autre et à une distance de 15 mm du bord de la boîte de pétri
 - ▶ Au maximum 6 disques dans une boîte de pétri ronde de Φ 90 mm ;
 - ▶ Au maximum 16 disques dans une boîte de pétri carré de 120 x120 mm.
- ☞ Disposer les disques selon la classification en famille des antibiotiques, pour faciliter la lecture interprétative;
- ☞ S'assurer que les disques ont bien adhéré à la gélose en appuyant doucement au dessus de chacun d'eux avec une pointe de pince stérile pour assurer un contact uniforme avec la gélose;
- ☞ Laisser pré-diffuser pendant 10 mn avant d'incuber.

NB : Ne pas déplacer un disque déjà appliqué, ni sur la gélose, ni sur une autre gélose

2.8. Incubation des boîtes de pétri

Les conditions d'incubation doivent être respectées et systématiquement contrôlées.

- ☞ Incuber les boîtes de pétri à 37°C, couvercle en bas pendant 24 à 48h
- ☞ Contrôler que l'atmosphère d'incubation ((humidité, enrichissement en CO₂), en fonction du germe étudié, est bien respecté

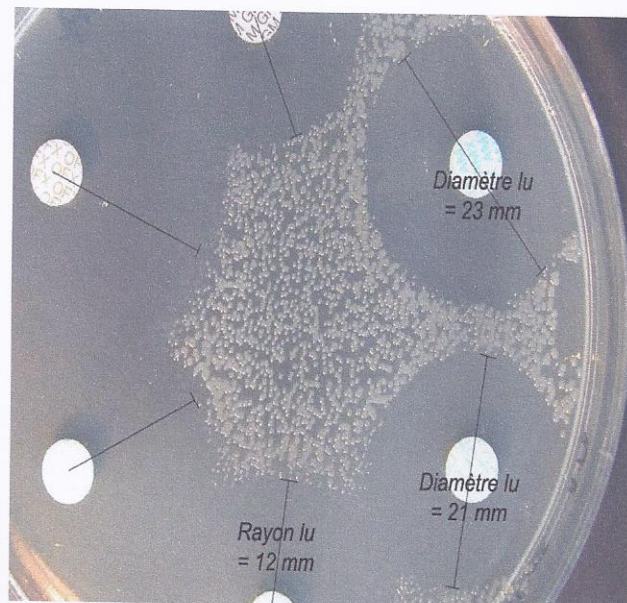
Facteurs influençant les conditions d'incubation

- ▶ Durée d'incubation trop longue.
- ▶ Température d'incubation instable (non contrôlée).
- ▶ Non respect des températures d'incubation (baisse de température consécutive à l'ouverture fréquente des étuves)
- ▶ Non respect des atmosphères particulières (humidité, CO₂...).

2.9. Mesure des diamètres d'inhibition

Les résultats sont interprétés en fonction des diamètres critiques inscrits sur les abaques.

- ➡ Préparer le matériel et les outils nécessaires à la lecture des résultats (pied à coulisse ou règle, abaque de lecture des résultats, fiches d'enregistrement des résultats ;
- ➡ Mesurer les Φ des zones d'inhibition en mm pour chaque antibiotique ;
- ➡ Reporter les diamètres d'inhibition pour chaque antibiotique, sur la fiche de réponse et les comparer aux valeurs critiques
- ➡ Comparer les valeurs des Φ mesurés à celles indiquées sur la fiche portant les Φ critiques, pour classer les bactéries en S, I ou R :
 - ▶ si $\Phi < \Phi$ concentration critique supérieure (CCs) : souche catégorisée R
 - ▶ si $\Phi \geq \Phi$ concentration critique inférieure (CCi) : souche catégorisée S
 - ▶ si $CCi < \Phi \text{ mesuré} < CCs$: souche catégorisée intermédiaire I



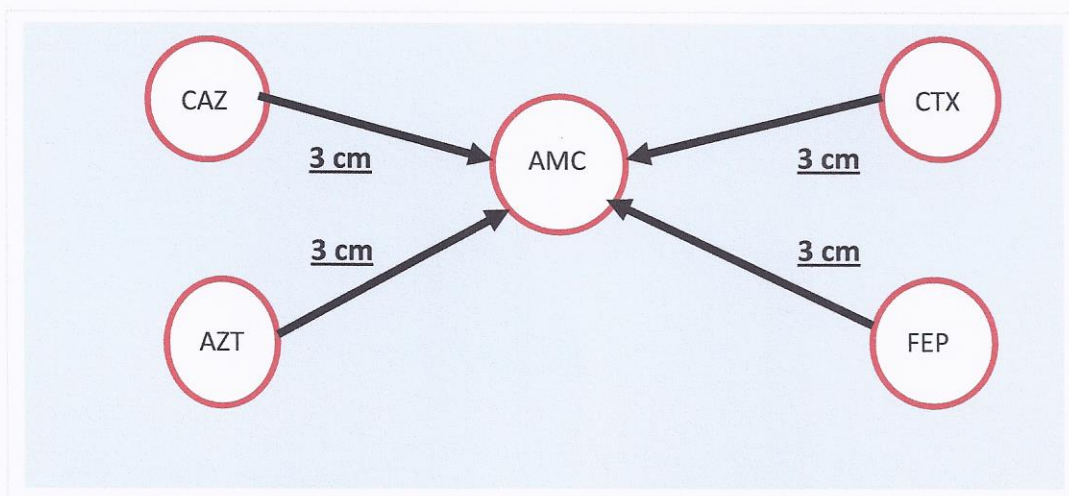
Mesure des diamètres d'inhibition (CA-SFM)

3. Mise en évidence des phénotypes de résistance acquise

3.1. Recherche de β -lactamase à spectre élargi (BLSE)

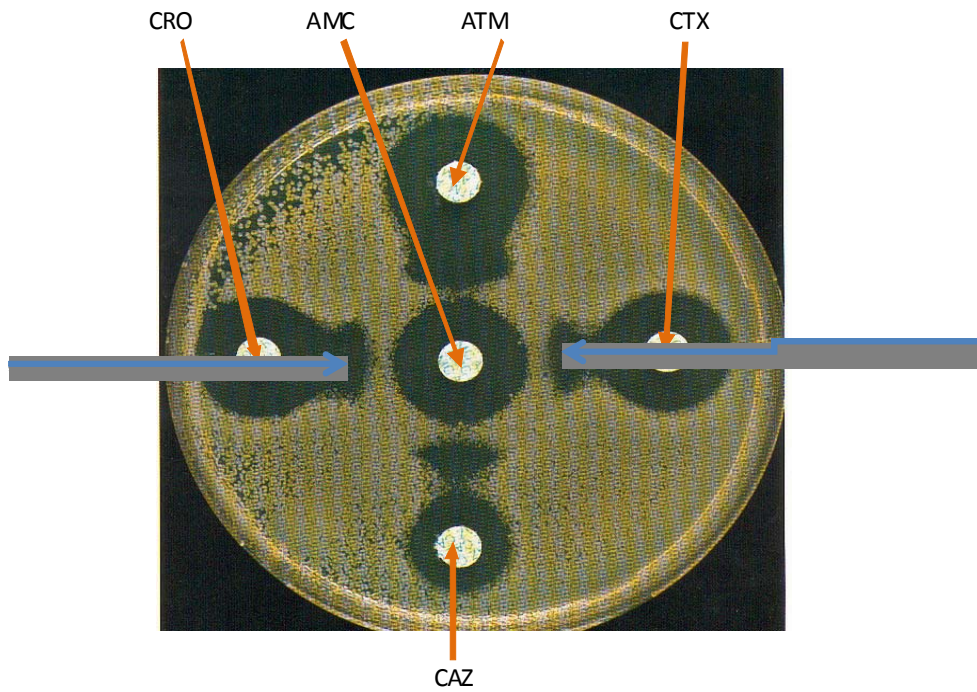
- ☞ Rechercher systématiquement une β -lactamase à spectre élargi sur toute souche d'entérobactéries :
 - ▶ déposer à la surface de la gélose, des disques de ceftazidime et/ou de céfotaxime et /ou de céfépime et/ou d'aztreonam et d'amoxicilline + Ac. clavulanique, à 3cm l'un de l'autre ;
 - ▶ Incuber à 37°C pendant 24h.
- ☞ Lecture des résultats : Rechercher une image de synergie appelée « bouchon de champagne ».

L'image n'est pas toujours présente



Disposition des disques d'antibiotique pour la recherche de BLSE

AMC : amoxicilline + acide clavulanique - CTX : céfotaxime qui peut être remplacé par ceftriaxone (CRO)
CAZ : ceftazidime - AZT : aztreonam - FEP : cefépime



Détection d'une synergie : image en "Bouchon de champagne" (flèches bleues)

3.2. Mise en évidence des staphylocoques résistant à la méticilline (SRM)

La méticillino-résistance est recherchée à l'aide d'un disque d'oxacilline 30µg ou d'un disque de céfoxitine 30µg. Elle est due à l'acquisition d'un gène chromosomique *mec A* qui code pour une modification des protéines liant la pénicilline (PLP) en PLP2a, dont l'affinité pour les β-lactamines est fortement affaiblie.

- ☞ Réaliser le test d'activité de l'oxacilline en modifiant les conditions de culture
 - ▶ gélose Mueller Hinton simple à incuber à la température ambiante (30°C) pendant 24h ;

ou

- ▶ gélose Mueller Hinton hypersalée (5%) à incuber à 37°C.

Examiner la présence ou l'absence d'une croissance dans la zone d'inhibition autour du disque d'oxacilline.

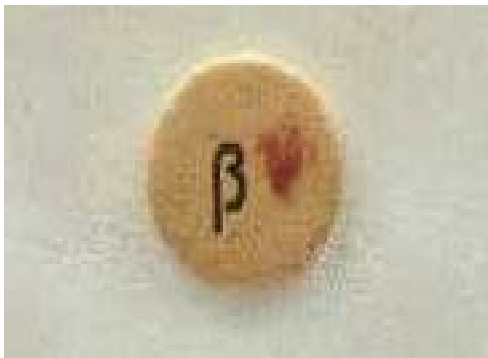
- ☞ Réaliser le test d'activité de la céfoxitine
 - ▶ déposer un disque de céfoxitine sur une gélose Mueller Hinton simple
 - ▶ incuber à 37°C pendant 24h

3.3. Mise en évidence d'une bêta-lactamase chez *Haemophilus influenzae*

Le principe repose sur l'utilisation d'une β-lactamine chromogénique qui change de coloration après hydrolyse.

- ☞ Quelques colonies de la souche à tester sont déposées sur un disque de papier imprégné de nitrocéfine (test de la céfinase) après l'avoir hydraté à l'aide d'une goutte d'eau distillée.

- ☞ Une réaction positive se manifeste en 3 minutes par virage de la couleur du disque du jaune au rouge indiquant que la souche secrète une β-lactamase.



Test à la céfinase

4. Contrôle de qualité

4.1. Contrôle des milieux de culture

Préparer les géloses selon les indications du fabricant.

L'épaisseur de la gélose doit être de $4 \text{ mm} \pm 0,5 \text{ mm}$: approximativement 25 ml pour une boîte de 90 mm de diamètre, 31 ml pour une boîte de 100 mm de diamètre, 71 ml pour une boîte de 150 mm de diamètre et 40 mL pour une boîte carrée de 100 mm de côté.

Les boîtes ne doivent pas être desséchées.

4.2. Contrôle des disques d'antibiotiques

La décharge des disques conduit à des zones d'inhibition réduites et constitue une source d'erreur habituelle. Donc il faut :

- * Commander des disques dont les charges correspondent à celles recommandées par le référentiel
- * Conserver les disques dans des conteneurs fermés avec un dessiccateur et à l'abri de la lumière (certains produits comme le métronidazole, le chloramphénicol et les fluoroquinolones sont inactivés en cas d'exposition prolongée à la lumière)
- * Conserver les cartouches en cours d'utilisation à 4°C (au réfrigérateur)
- * Conserver le stock de disques à -20°C sauf indication contraire du fabricant. Si cela n'est pas possible conserver les disques à une température inférieure à 8°C
- * Ne pas utiliser de disques périmés.
- * Pour éviter la condensation, laisser les disques revenir à la température ambiante avant d'ouvrir les cartouches.

4.3. Contrôle de la technique

Chaque semaine des souches de références doivent être testées dans les mêmes conditions que les souches isolées des échantillons biologiques.

Il existe une liste de souches de références dont le laboratoire doit disposer (voir annexe). Les profils de sensibilité de ces souches de référence sélectionnées aux différents antibiotiques sont parfaitement connus.

Les diamètres des zones d'inhibition doivent être inscrits sur des fiches de contrôle de qualité. Les mesures des diamètres d'inhibition seront soigneusement prises, et comparées aux valeurs critiques décrites.

Les antibiogrammes effectués au laboratoire sont validés si les souches de référence donnent des résultats qui correspondent aux valeurs cibles fournies.

5. Lecture interprétative des résultats

La lecture interprétative de l'antibiogramme est basée sur la connaissance des phénotypes de sensibilité naturelle et des phénotypes de résistance acquise des germes.

Utilité de la lecture interprétative de l'antibiogramme

- ☞ Vérifier la cohérence entre le germe et l'antibiogramme correspondant
- ☞ Corriger la réponse brute de l'antibiogramme par la transformation d'un résultat de catégorie « sensible » en catégorie « intermédiaire » ou « résistant », en raison d'un risque d'échec thérapeutique ;
- ☞ Mettre en évidence les résistances acquises ;
- ☞ Détecter les phénotypes de résistance impossibles ou hautement improbables ;
 - ▶ Vérifier l'identification du germe ;
 - ▶ Contrôler la pureté de l'inoculum ;
- ☞ Généraliser des résultats à des antibiotiques non testés.

5.1. Résistances naturelles

La résistance naturelle est caractéristique d'une espèce bactérienne. Elle délimite le spectre naturel de l'antibiotique et constitue une aide à l'identification. Elle se traduit habituellement par des CMI supérieures à la valeur critique basse de concentration (c) de l'antibiotique concerné.

a) Bacilles à Gram négatif non exigeants

Pénicilline G, oxacilline, macrolides, kétolides, lincosamides, streptogramines, acide fusidique, glycopeptides, oxazolidinones, lipopeptides.

Entérobactéries	AM	AMC	TIC/ PIP	CIG	FOX	MA	CXM	GM	TET	COL	FT
<i>Klebsiella</i> spp	R		R								
<i>C. koseri</i>	R		R								
<i>C. freundii</i>	R	R		R	R						
<i>E. cloacae</i>	R	R		R	R						
<i>E. aerogenes</i>	R	R		R	R						
<i>H. alvei</i>	R	R		R							
<i>S. marcescens</i>	R	R		R		R	R			R	
<i>P. mirabilis</i>									R	R	R
<i>P. vulgaris, P. penneri</i>	R			R		R	R		R	R	R
<i>M. organii</i>	R	R		R			R			R	R
<i>P. stuartii</i>	R	R		R				R	R	R	R
<i>P. rettgeri</i>	R	R	R	R	R				R	R	R
<i>Y. enterocolitica</i>	R	R		R		R	R				

R: résistance naturelle; AM: aminopénicillines; AMC: amoxicilline + acide clavulanique; TIC: ticarcilline; PIP: pipéracilline; FOX: céfoxitine; MA: céfamandole; CXM: céfuroxime; GM: gentamicine; TET: tétracyclines; COL: colistine, polymyxine B; FT: nitrofuranes; CIG: céphalosporines 1^{ère} génération

b) Autres bactéries

Espèces bactériennes	Résistances naturelles
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	aminopénicillines, céphalosporines 1 ^{ère} génération, céfotaxime, ceftriaxone, ertapénème, kanamycine, tétracyclines, chloramphénicol, triméthoprime, quinolones
<i>Haemophilus influenzae</i>	macrolides (cycle à 16 atomes : spiramycine, josamycine, midécamycine), lincosamides
<i>Staphylococcus aureus</i>	mécilline, aztreonam, quinolones, colistine
<i>Streptococcus</i> (dont <i>S. pneumoniae</i>)	aminoglycosides (bas niveau), péfloxacin
<i>Neisseria meningitidis</i>	triméthoprime, glycopeptides, lincosamides, colistine, polymyxine B

Facteurs influençant la lecture des résultats

- ▶ Lecture prématurée des résultats ;
- ▶ Erreur de mesure des diamètres d'inhibition
- ▶ Méconnaissance des phénotypes sauvages
 - Sensibilité naturelle ;
 - Résistance naturelle ;
- ▶ Méconnaissance des résistances acquises.

Phénotypes de résistance naturelle des Entérobactéries aux β -lactamines

Les entérobactéries sont naturellement résistantes aux pénicillines G et M. En fonction des résistances supplémentaires aux β -lactamines, elles sont classées en cinq groupes

Phénotypes de résistance naturelle des entérobactéries aux β -lactamines

Groupes d'Entérobactéries	Groupe I	Groupe II	Groupe III	Groupe IV	Groupe V
Principales entérobactéries rencontrés en milieu hospitalier	<i>Escherichia coli</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Salmonella enterica</i> <i>Shigella spp</i> <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>Klebsiella Spp</i> <i>Citrobacter koseri</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Morganella</i> <i>Providencia</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Proteus vulgaris</i> <i>Proteus penneri</i>
Aminopénicillines	S	R	R*	R*	R
Carboxypénicillines	S	R	S	R	R
Uréidopénicillines	S	I/R	S	I/R	S
C1G	S	S	R	R	R
C2G	S	S	R	S	R
C3G	S	S	S	S	S
Carbapénèmes	S	S	S	S	S
Mécanismes de résistance	Absence de β -lactamase	Pénicillinase à bas niveau	Céphalosporinase à bas niveau	Pénicillinase + Céphalosporinase	Céfuroximase

R* : Résistance aux aminopénicillines associées ou non aux inhibiteurs de b-lactamase

5.2. Résistances acquises

Les bactéries présentent des résistances acquises selon différents mécanismes. La lecture interprétative permet de mettre en évidence les phénotypes de résistance acquis.

a) Entérobactéries

Le mécanisme le plus fréquent est la sécrétion d'enzymes inactivatrices. Pour chaque groupe d'entérobactéries, il existe des phénotypes acquis

Phénotype de résistance du groupe I aux bêta-lactamines

Antibiotiques marqueurs	Phénotype sauvage	PBN [*]	PHN [†]	Case [‡]	TRI [§]	CHN ^{**}	BLSE ^{††}
Aminopénicillines	S	R	R	R	R	R	R
Aminopénicillines+IBL	S	S	I/R	R*	R	R*	R
Carboxypénicillines	S	R	R	S	R	R	R
Ureidopénicillines	S	I/R	I/R	S	R	S	R
C1G	S	I	I/R	R	S	R	R
C2G	S	S	S/R	S	S	R	R
C3G	S	S	S	S	S	R	R
C3G+IBL	S	S	S	S	S	R	S
C4G	S	S	S	S	S	R	R
Céphamycines	S	S	S	S/R	S	S	S
Carbapénèmes	S	S	S	S	S	S	S

¹ PBN : Pénicillinase à bas niveau

² PHN : Pénicillinase à haut niveau

³ Case : Céphalosporinase à bas niveau

⁴ TRI : Pénicillinase résistante aux inhibiteurs des β-lactamases

⁵ CHN : Céphalosporinase à haut niveau

⁶ BLSE : β-lactamase à spectre élargi

* IBL : Les inhibiteurs des β-lactamases n'inhibent pas les céphalosporinases qui sont néanmoins des β-lactamases

Phénotype de résistance du groupe II aux bêta-lactamines

Antibiotiques marqueurs	PBN Souche sauvage	PHN	BLSE
Aminopénicilline	R	R	R
Aminopénicilline+IBL	S	R	R
Carboxypénicillines	R	R	R
Ureidopénicillines	I	R	R
C1G	S	R	R
C2G	S	I/R	R
C3G	S	S	S
C3G+IBL	S	S	R
C4G	S	S	R
Céphamycines	S	S	S
Carbapénèmes	S	S	S

Phénotype de résistance du groupe III aux bêta-lactamines

Antibiotiques marqueurs	Case inductible Souche sauvage	PHN	BLSE	CHN
Aminopénicilline	R	R	R	R
Aminopénicilline+IBL	S	R	R	R
Carboxypénicillines	S	R	R	R
Ureidopénicillines	S	R	R	R
C1G	S	R	R	R
C2G	R	R	R	R
C3G	S	S	R	R
C3G+IBL	S	S	S	R
C4G	S	S	R	S/I
Céphamycines	S/R	S/R	S/R	R
Carbapénèmes	S	S	S	S

Phénotype de résistance acquise du groupe IV aux bêta-lactamines

Antibiotiques marqueurs	Phénotype sauvage	BLSE
Aminopénicilline	R	R
Aminopénicilline+IBL	R	R
Carboxypénicillines	R	R
Ureidopénicillines	I/R	R
C1G	R	R
C2G	S	R
C3G	S	R
C3G+IBL	S	S
C4G	S	S
Céphamycines	S/R	S/R
Carbapénèmes	S	S

Phénotype de résistance du groupe V aux bêta-lactamines

Antibiotiques marqueurs	Phénotype sauvage	Pase chromosomique	BLSE
Aminopénicilline	R	R	R
Aminopénicilline+IBL	S	R	R
Carboxypénicillines	R	S	R
Ureidopénicillines	S	R	R
C1G	R	R	R
C2G	R	R	R
C3G (CRO, CTX)	S	R	R
C3G (CAZ)	S	S	R
C3G (ATM)	S	R	R
Céphamycines	S	S	S
Carbapénèmes	S	S	S

Phénotypes de résistance acquise aux aminosides

Phénotype	Enzyme	Gentamicine	Tobramycine	Nétilmicine	Amikacine
G	AAC(3)-I	R	S	S	S
A	APH(3')-VI	S	S	S	R
GT	AAC(3)-VI	R	R	S	S
TA	ANT(4')-II	S	R	S	R
GTN	AAC(2')-I AAC(3')-IV	R	R	R	S
KTG	AAC(2')-I	R	R	S	S
KTAN	AAC(6')-I	S	R	R	R
KTGN	AAC(3)-II	R	R	R	S
KTGAN	Imperm. Assoc. enz	R	R	R	R

Phénotype de résistance acquise aux quinolones

Phénotype	Acide nalidixique	Norfloxacine ou péfloxacine	Ofloxacine ou ciprofloxacine
I(sauvage)	R	S	S
II	R	S	S
III	R	I/R	S
IV	R	R	R

Phénotypes de résistances aux quinolones

Le résultat obtenu avec le disque d'acide nalidixique est valable pour toutes les quinolones de première génération. La réponse va croissante des quinolones de première génération aux fluoroquinolones les plus récentes.

Si une souche est sensible au norfloxacine, elle est sensible à l'ensemble des fluoroquinolones

Si la souche est résistante au norfloxacine, les autres fluoroquinolones doivent être testées

b) *Staphylococcus aureus*

Interprétation des phénotypes pour les Staphylocoques

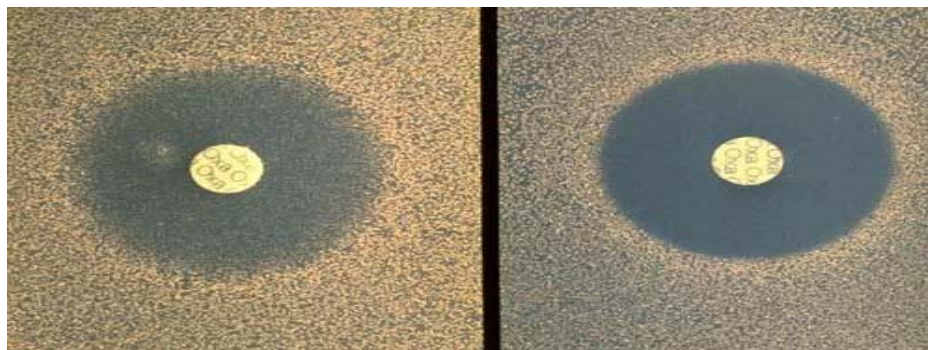
Détection des souches productrices de Pénicillinases

- ☞ Mesurer le diamètre d'inhibition autour du disque de Pénig
 - ▶ $\Phi \geq 20$ mm : souche pénicillinase (-) = souche sauvage
 - ▶ $\Phi < 20$ mm : souche pénicillinase (+)
- ☞ Interprétation : les souches résistantes à la Pénig sont également résistantes aux amino, carboxy et ureido-pénicillines mais sensibles aux pénicillines associés aux inhibiteurs des bêta-lactamases

Détection des souches méticillino-résistantes

- ☞ Mesurer le diamètre d'inhibition autour du disque d'oxacilline
 - ▶ $\Phi \geq 20$ mm : souche méticillino-sensible
 - ▶ $\Phi < 20$ mm : souche méticillino-résistante
- ☞ Mesurer le diamètre d'inhibition autour de céfoxitine
 - ▶ $\Phi \geq 27$ mm : souche méticillino-sensible
 - ▶ $\Phi < 25$ mm : souche méticillino-résistante

Toutes les souches résistantes à l'oxacilline - résistance homogène ou hétérogène (présence de microcolonies dans la zone d'inhibition) - doivent être considérées comme résistantes à toutes les pénicillines associées ou non à des inhibiteurs de β -lactamases, aux céphalosporines et aux carbapénèmes.



30°C

37°C

Staphylococcus aureus résistant à la méticilline (disque d'oxacilline 5 μ g)

Phénotypes Staphylocoque et aminosides

Phénotypes	Kanamycine Amikacine	Tobramycine	Gentamycine Nétilmicine
Sauvage	S	S	S
K	R	S	S
KT	R	S	S
KTG	R	R	R

NB : Une souche résistante à la gentamicine est résistante à toutes les aminosides

Phénotypes Staphylocoques et macrolides

Phénotype	Erythromycine	Lincomycine	Pristinamycine	Conséquence
MLS inducible	R	S	S	Résistance à l'érythromycine et à l'azythromycine
MLS constitutif	R	R	S	Résistance à tous les macrolides (lincomycine, clindamycine)
L	S	R	S	Résistance isolée à la lincomycine
Erm	R	S	S	Résistance isolée à l'érythromycine

c) Pseudomonas aeruginosa

Interprétation des phénotypes pour *Pseudomonas*

- ☞ Toutes les souches de *Pseudomonas* sensibles à la Gentamicine (GM), sont sensibles à toutes les autres aminosides sauf la Kanamycine.
- ☞ Toutes les souches de *Pseudomonas* résistantes à l'Amikacine sont résistantes à toutes les aminosides

d) *Streptococcus pneumoniae*

Interprétation des phénotypes pour *Streptococcus pneumoniae*

- ☞ Les bactéries du genre *Streptococcus* sont naturellement résistantes à bas niveau aux aminosides
- ☞ La sensibilité des streptocoques à la pénicilline G est évaluée avec un disque d'oxacilline de 5 µg (OXA-5) selon les critères suivants :
 - diamètre OXA-5 \geq 26 mm : souche sensible à pénicilline G. Cette interprétation est prédictive de l'activité des autres β -lactamines dans leur spectre.
 - diamètre OXA-5 < 26 mm : souche I ou R à pénicilline G.
- ☞ Devant toute souche de sensibilité diminuée (OXA-5 < 26 mm), il y a lieu de déterminer la CMI de l'ampicilline, de l'amoxicilline ou du céfotaxime

e) *Haemophilus et Neisseria*

Interprétation des phénotypes pour *Haemophilus et Neisseria*

- ☞ La production de bêta-lactamase détectée par une technique chromogénique dès l'isolement, confère la résistance aux amino-, carboxy- et uréidopénicillines.

L'activité des ces bêta-lactamines est restaurée lors de l'association avec un inhibiteur de bêta-lactamases.
- ☞ La détection d'une sensibilité diminuée aux bêta-lactamines (souches non productrices de bêta-lactamase) peut se faire à l'aide d'un disque d'ampicilline de 2 µg (diamètre < 20 mm) ou, à défaut, d'un disque de céfalotine 30µg (diamètre < 17 mm).

f) Neisseria

Interprétation des phénotypes pour *Neisseria*

☞ La détection d'une sensibilité diminuée aux pénicillines est effectuée en routine à l'aide d'un disque d'oxacilline (5 µg) selon les critères suivants : OXA 5 µg \geq 18 mm, souche sensible aux pénicillines ; OXA 5 µg <18 mm, sensibilité diminuée à la pénicilline G et/ou amoxicilline à confirmer par la détermination des CMI

☞ Pour les autres antibiotiques: faire la CMI

ANNEXES

Annexe 1 : Equipements et produits nécessaires

<ul style="list-style-type: none">◆ Souches pures fraîches de 24h ;◆ Incubateurs◆ Jarres d'incubation◆ Générateur de CO₂◆ Milieux de culture ;◆ Disques d'ATB ;◆ Densitomètre ou étalon de turbidité McFarland ;◆ Ecouvillons stériles ;◆ Pipettes Pasteur stériles ;◆ Boîtes de pétri rondes de diamètre (Ö) 90 mm ou carré de Ö 120 mm ;	<ul style="list-style-type: none">◆ Tubes à vis stériles contenant 10 ml d'eau physiologique ;◆ Tubes à hémolyse stériles ;◆ Agitateur type vortex ;◆ Eau physiologique (micro doses) ;◆ Applicateur de disques d'ATB ou pinces ;◆ Pied à coulisse ou règle ;◆ Fiches d'enregistrement des résultats d'antibiogramme◆ Abaque de lecture des résultats d'antibiogrammes
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Annexe 2 : Souches de référence

<i>Escherichia coli</i> :	ATCC 25922	(NCTC 12241 ; CIP 76.24)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> :	ATCC 27853	(NCTC 12903 ; CIP 76110)
<i>Haemophilus influenzae</i> :	NCTC 8468	(CIP 54.94)
<i>Enterococcus faecalis</i> :	ATCC 29212	(NCTC 12697 ; CIP 103214)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> :	ATCC 49619	(NCTC 12977 ; CIP 104340)
<i>Staphylococcus aureus</i> :	ATCC 29213	(NCTC 12973 ; CIP 103429)

Annexe 3: antibiotiques à tester selon la bactérie

Entérobactéries

- ▶ Bêta-lactamines, sauf exception (AMX ou AM, AMC, TIC, PIP, IPM, CF/C1G, C2G, CRO/C3G, CAZ/C3G, ATM, CEP ou CEF/C3G) ;
- ▶ Aminosides (TOB, GM, NET, AN)
- ▶ Quinolones et fluoroquinolones (NA, PEF ou NOR, CIP)
- ▶ Phénicolés (C) ;
- ▶ Fosfomycine (FOS) :
- ▶ Cotrimoxazole (SXT).
- ▶ Colistine

Staphylococcus aureus

- ▶ Bêta-lactamines (P, OX, FOX) ;
- ▶ Aminosides (K, TOB, GM)
- ▶ Quinolones et fluoroquinolones (PEF ou CIP)
- ▶ Phénicolés (C) ;
- ▶ Cyclines (TE)
- ▶ MLS (E, L, PT)
- ▶ Cotrimoxazole (SXT)
- ▶ Glycopeptides (VA)
- ▶ Divers (FOS, FA)

Streptococcus pneumoniae

- ▶ Bêta-lactamines (P, AM, CRO, OX)
- ▶ Aminosides (K, GM)
- ▶ Phénicolés (C) ;
- ▶ Cyclines (DO)
- ▶ MLS (E, L, PT)
- ▶ Cotrimoxazole (SXT)
- ▶ Fluoroquinolones (CIP)
- ▶ Glycopeptides (VA)
- ▶ Divers (FOS, FA)

Pseudomonas aeruginosa

- ▶ Bêta-lactamines (TIC, PIP, TCC, PTZ, IPM, CAZ, ATM, CEP ou CEF)
- ▶ Aminosides (K, TOB, GM, NET, AN)
- ▶ Quinolones et fluoroquinolones (PEF, CIP)
- ▶ Phénicolés (C) ;
- ▶ Polypeptides (CS)

Haemophilus influenzae et Neisseria

- ▶ Bêta-lactamines (AM, AMC, CRO/C3G)
- ▶ Aminosides (K, TOB, GM, NET, AN)
- ▶ Fluoroquinolones (CIP)
- ▶ Phénicolés (C) ;
- ▶ Cyclines (TE)
- ▶ Cotrimoxazole (SXT)