

Rapport de stage en entreprise

Laboratoire d'analyse médicale

Sommaire

-Remerciements

1- Présentation de l'entreprise

- 1-1 Localisation
- 1-2 Historique
- 1-3 Horaires de travail
- 1-4 Organisation du laboratoire
- 1-5 Activités du laboratoire

2- Tâches effectuées

- 2-1 Les différents tubes de prélèvements
- 2-2 Hématologie
- 2-3 Immunologie
- 2-4 Bactériologie
 - 2-4-1 Urine
 - 2-4-2 Coprologie
 - 2-4-3 Prélèvement vaginal (PV)
 - 2-4-4 Identification et antibiogramme
- 2-5 Coagulation
- 2-6 Recherche d'agglutination irrégulière : (R.A.I)
- 2-7 Quelques machines du laboratoire

3-Bilan

-Annexes

1- Présentation de l'entreprise

1-1 Localisation

Le laboratoire d'analyses médicales dans lequel j'ai effectué mon stage se trouve au Cette structure a un avantage géographique important. En effet elle est entourée de nombreux cabinets de médecins traitants, de cabinets d'infirmiers et d'un cabinet de radiologie. Ce groupement forme, avec le laboratoire, un pôle médical relativement complet.

1-2 Historique

Le laboratoire de Villenave d'Ornon existe depuis 1968. A l'époque, était le propriétaire du laboratoire et possédait également la pharmacie de Villenave d'Ornon Chambéry.

En 1975, la profession de biologiste d'analyses médicales s'est individualisée. En effet, il était devenu impossible de cumuler laboratoire et pharmacie. En 1989, le laboratoire est vendu qui depuis 1982 occupée le poste de directrice adjointe.

Enfin, en 2002 s'est associé pour assurer la direction du laboratoire.

1-3 Horaires de travail

Les différents employés s'organisent de façon à ce qu'il y ait toujours 3 personnes au laboratoire de 7h00 à 19h30.

Il faut toujours, selon la législation, un biologiste dans le laboratoire, donc et se relaient sur la plage horaire de 7h00 à 19h30 (parfois plus tard si il reste des analyses à faire)

1-4 Organisation du laboratoire

□□□□□□□□

1-5 Activités du laboratoire

Le laboratoire est organisé suivant différents domaines d'analyses :

- la bactériologie
- la parasitologie
- l'hématologie
- l'hormonologie
- la biochimie

Les analyses faites au laboratoires sont prescrites par un médecin. La demande est traitée selon une procédure dans le but que le patient et le médecin reçoivent les résultats (annexe 9)

2-Tâches effectuées

Pendant mon stage j'ai pu observer et m'exercer sur plusieurs paillasse du laboratoire. J'ai aussi découvert une véritable équipe de travail et les responsabilités qui incombent à chacun. Je vais présenter ci-dessous les différents domaines que j'ai explorés.

2-1 Les différents tubes de prélèvements

Il y a 7 types de tubes possibles identifiables par la couleur de leurs bouchons. La couleur de chaque tube est normalisée. En France la norme qui a été retenue est la norme américaine. Pour chaque tube il y a des caractéristiques différentes :

□□□□□□

2-2 Hématologie

Hémogramme (NFS), numération de formule sanguine (globules rouges, globules blancs et plaquettes)

Principe:

La numération consiste à compter les cellules du sang grâce à un automate. Cet automate est constitué de 2 électrodes de platine entre lesquelles on fait passer un courant électrique: c'est la méthode Coulter

A chaque passage de cellule, une différence de potentiel se crée.

Chaque variation est comptée et le nombre de variations correspond au nombre de cellules. De plus, l'intensité de la variation est proportionnelle à la taille de la cellule, c'est-à-dire plus la variation est importante plus la cellule est grosse.

La formule est établie grâce à une différenciation chimique qui entre autre séparera les constituants basophile et acidophile.

De plus la machine établie le dosage de l'hémoglobine et détermine Concentration Corpusculaire

Moyen en Hémoglobine, Teneur Corpusculaire Moyen en Hémoglobine, Volume Globulaire Moyen, Indice de Distribution d'England.

utilisation de la machine:

la tâche principale du technicien est de confirmer la bonne utilisation de l'appareil, pour cela il doit effectuer un contrôle quotidien qu'il doit comparer à un abaque donné par le fournisseur.

Tous les matins un contrôle est effectué pour pouvoir confirmer le bon fonctionnement de la machine.

L'analyse consiste à interpréter les résultats bruts et de déterminer si une formule manuelle doit être établie (cf coloration de May Grünwald Giemsa).

Les résultats moyens sont :

NUMERATION GLOBULAIRE ET PARAMETRES ERYTHROCYTAIRES

□□□□□□□□

FORMULE LEUCOCYTAIRE

□□□□□□

Intérêt :

La numération permet de connaître avec une certaine précision le nombre de cellules dans le sang d'un patient.

Les résultats du patient sont appréciés en comparaison des valeurs de références appelées : « normales ».

Cette comparaison permet de mettre en évidence parfois des anomalies, exemple :

- manque d'hémoglobine => anémie
- excès de leucocyte => probabilité d'infection, d'inflammation ou de leucémie

Comptage des cellules sur cellule de Malassez

Principe :

La cellule de Malassez est une lame pour observation microscopique.

Elle est caractérisée par le quadrillage calibré gravé à sa surface.

Dans le cas où l'automate chargé du comptage des cellules ne parviendrait pas à donner un résultat fiable, il faut qu'un biologiste observe au microscope un échantillon de sang.

Grâce au quadrillage le biologiste va pouvoir compter les différentes cellules et comparer avec l'appareil les résultats obtenus, exemple :

- thrombopénie (Nombre de plaquettes inférieur à 150 000.)

On fait un contrôle en cellule de Malassez après passage en unopette

Une unopette détruit les globules rouges et conserve les plaquettes, et les globules blancs.

Intérêt :

Ce contrôle permet de compter le nombre de plaquettes et de vérifier la présence ou l'absence d'agrégat plaquettaire.

□

Coloration de May Grünwald et Giemsa

Principe :

Cette coloration repose sur l'affinité acide-base des colorants et des éléments cellulaires. Il y a 2 colorants:

-le May Grünwald => contenant un colorant acide : l'éosine et un colorant basique : le bleu de méthylène

-le Giemsa => contenant de l'éosine également, et un colorant basique : l'azure de méthyle

Les éléments cellulaires acides, seront colorés sélectivement par les colorants basiques. Ces éléments sont qualifiés de basophiles (ADN, cytoplasme des lymphocytes)

Les éléments cellulaires basiques, seront colorés sélectivement par les colorants acides. Ces éléments sont qualifiés d'acidophiles ou d'éosinophiles (cytoplasme des hématies)

Les éléments neutrophiles sont colorés à la fois par les colorants acides et basiques.

But :

Dans un premier temps ce test permet d'établir manuellement la formule sanguine si l'automate met des alarmes.

Dans un deuxième temps ce test permet de vérifier la cytologie (coloration MGG et lecture au microscope)

-des Globules rouges :

-taille (macrocyte , microcyte)

-forme (schizocyte , ellytocyte)

-le remplissage en hémoglobine (exemple : hypochromie => globule rouge en forme de cible)

-des Globules Blancs :

-quantité ou phase de maturation anormale => leucémies

-plaquettes (macrothrombocytose => volume plaquettaire moyen élevé ou agrégat plaquettaire.)

□

photo Hématie et Lymphocyte vue a l'objectif *100 grâce a la coloration de May Grünwald et Gimsa (on peut voir également 2 plaquettes a droite en violet)

□

photo : Hématie et polynucléaire neutrophile vue a l'objectif *100 grâce a la coloration MGG (reconnaisable à la coloration bleu-violet du noyau polylobé)

Coloration des réticulocytes

Un réticulocyte est un jeune globule rouge.

Lors de la genèse des hématies (l'érythropoïèse) une cellule souche totipotente (qui possède la faculté de se dissocier en leucocyte, en hématie ou en plaquette) va se dissocier pour arriver à maturité sous la forme d'une hématie.

Lors d'une anémie (diminution de l'hémoglobine) on va compter les réticulocytes pour savoir de quelle sorte est l'anémie :

-diminution de la production de globule rouge => les hématies se dégradent normalement mais le système pour les remplacer est défectueux => anémie non régénérative, le nombre de réticulocytes baisse.

-accélération de la fabrication => la production des hématies est stimulée, le nombre de réticulocyte augmente => anémie régénérative.

La coloration est faite grâce au bleu de crésyl brillant qui est un colorant acidophile, donc il va colorer l'appareil nucléaire du réticulocyte qui est acide.

On va donc observer des petits amas bleus qui correspondent à l'appareil nucléaire non éjecté du réticulocyte.

□

photo :Réticulocyte par la coloration au bleu de crésyl brillant (caractérisé par les petits amas bleus=> matériel nucléaire)

Vitesse de sédimentation :

Principe :

La mesure de la vitesse de sédimentation (appelé aussi VS) est un test non spécifique utilisé pour dépister une inflammation.

Pour cela on utilise une loi qui lie la vitesse de chute d'une sphère dans un liquide par l'action de la gravité, c'est la loi de Stokes.

On a comme formule :

□

Avec:

v => vitesse limite de chute (en m / s)

r => rayon de la sphère (en m)

g => accélération (m / s²)

$D(r)$ => différence de la masse volumique entre la particule et le fluide (en kg / m³)

m => viscosité du fluide (en Pa.s)

On mesure la vitesse à laquelle tombe les globules rouges en mm/h.

Exemple :

-gpathie monoclonale : les globules rouges « se collent », les hématies forment des rouleaux et donc en suivant la loi de Stokes ils tombent plus vite.

-Quand il y a un processus inflammatoire, les protéines inflammatoires vont modifier la viscosité du plasma, ce qui va entraîner l'augmentation de la VS.

Lecture et normes :

Le test de base est effectué sur 2h, les nouveaux procédés permettent une mesure en 1h voir même 30min.

Pour la 1ère heure :

gélose BromoCrésol Pourpre (BCP) (annexe 1)

-cytologie positive (plus de 20 000 leucocytes et/ou présence de germes à l'état frais) => gélose chromogène URI 4 (annexe 2)

Pour les femmes enceintes, on rajoutera une gélose au sang + ANC (annexe 3) pour la recherche de *Streptococcus agalacticae* (groupe B) responsable d'infection néo-natale.

2-4-2 Coprologie :

La coproculture permet la recherche de bactéries pathogènes dans les selles. Ces bactéries sont responsables de diarrhée.

Dans une selle il y a 2 types de flore :

- la flore commensale=> Entérobactéries, *Lactobacillus*, *Streptococcus*.
- la flore pathogène => *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* et *Staphylocoque doré* (enterotoxique)

Mise en œuvre :

Examen microscopique

Vérifie si la flore commensale aéro anaérobie est présente, absente, ou avec un déséquilibre.

Ensemencement :

- une gélose BCP => va mettre en évidence la flore saprophyte (*E. coli*, entérocoque) et la flore lactose négatif (*Aeromonas pleusiomonas*)
- une gélose Chapman (annexe 8) sélectif des staphylocoques va permettre la recherche de *Staphylococcus aureus* enterotoxique dont la toxine est responsable de diarrhée.
- une gélose Hektoën (annexe 4) sélectif des gram négatif utilisé pour la recherche des bactéries pathogènes de types *Salmonella* et *Shigella*.
- un milieu Yersin pour la recherche de *Yersinia enterocolitica*
- un milieu pour la recherche de campylobactère
- un bouillon sélénite qui permet l'enrichissement de *Salmonella* et qui sera repiqué sur gélose SMID (annexe 5), les salmonella seront colorés en rose indien.

2-4-3 Prélèvement Vaginal (PV) :

Au même titre que la selle il y a dans le vagin une flore commensale appelée la flore de Doderlein, et une flore pathogène. On recherchera des germes pathogènes qui sont responsables de maladies génitales.

On va ensemencer pour l'identification plusieurs géloses :

- Gélose BCP : elle va permettre une vue d'ensemble de la flore non exigeante.
- Gélose chocolat (annexe 7) : elle va permettre la pousse d'un grand nombre de germes exigeant ou non.
 - Petite colonie brillante => *Neisseria* (pathogène sexuellement transmissible.) très exigeant pousse exclusivement sur gélose chocolat.
 - Colonie plate et verte => *Lactobacillus* (commensal)
 - Petite colonie blanche => *Corynebacterium* (commensal)
 - Petite colonie blanche qui pousse en suivant les lignes d'ensemencement=> *Gardnerella*(pathogène ou grand opportuniste)
- Gélose au sang + ANC : isole les GRAM +
 - Colonie bêta hémolytique => Streptocoques ou Staphylocoques que l'ont différenciera par la

catalase car staphylocoque = catalase + et streptocoque = catalase -. Le test se fait avec l'écrasement d'une colonie sur de l'eau oxygéné. Le résultat est positif s'il y a dégagement de gaz sous forme apparente de bulles.

L'identification du groupe auquel appartient le streptocoque se fera par technique d'identification au latex.

-Gélose Sabouraud (annexe 6) => sélectif des levures par exemple *Candida albicans* (pathogène opportuniste)

2-4-4 Identification et antibiogramme

Après observation des boîtes qui servent à l'isolement des colonies, on peut être amené à identifier et/ou établir l'antibiogramme, à partir d'une culture pure, et pour se faire utiliser des galeries d'identification.

· galerie d'identification biochimique :

Ces galeries sont constituées de puits dans lesquels sont déposés différents substrats que les bactéries sont susceptibles d'utiliser. (LDC, ODC, ADH...)

□

Photo : rapid ID 32 (Biorad) => galerie d'identification composée de 32 puits spécialisés dans l'identification de germes responsables d'infection urinaire.

Antibiogramme :

Il a pour but de définir la résistance ou la sensibilité d'une bactérie pour un antibiotique donné. Dans les différentes cupules sont déposés des antibiotiques à une concentration donnée et ensemencés avec la bactérie à tester en dilution standardisée.

□

ABT gram négatif avec présence de la souche *Pseudomonas aeruginosa* (caractéristique de la coloration verte).

Ces deux galeries sont lues grâce aux techniques de turbidimétrie et de colorimétrie.

2-5 Coagulation

En coagulation l'étape pré-analytique est fondamentale :

- vérifier les tubes
- vérifier le nom du patient
- vérifier les temps d'incubation

Les conditions optimales de prélèvement sont :

- le matin
- à jeun

Pour mesurer le temps de coagulation le prélèvement sanguin se fait sur un tube citraté (bouchon bleu)

Ce tube contient un anticoagulant qui bloque la coagulation de façon réversible, le volume d'anticoagulant est de 9 unités de sang pour 1 unité d'anticoagulant.

Il faut vérifier l'absence d'hémolyse, le tube doit être centrifugé dans un délai de 1h après le prélèvement et la mesure doit être faite 4h maximum entre le prélèvement et le résultat.

T.P (taux de prothrombine)

Le taux de prothrombine est la transformation d'un temps de coagulation (temps de Quick) en pourcentage.

Le temps de Quick est réalisé en mettant en présence un plasma citraté avec un réactif : la thromboplastine calcique, qui joue le rôle d'activateur tissulaire de la coagulation.

Le plasma coagule et le temps obtenu s'appelle le temps de Quick.

Le taux de prothrombine se calcul grâce a une formule mathématique en fonction du temps de Quick.

Le TP est une mesure très sensible aux conditions opératoires c'est pour cela que la valeur du TP est lissée grâce a l'INR (international normalized ratio), et le résultats sont comparables d'un laboratoire a un autre.

Avec :

TQpatient : le temps de Quick mesuré pour le plasma du patient à tester ;

TQTemoin : le temps de Quick témoins (TP = 100 %) ;

ISI : l'indice de sensibilité international spécifique du réactif thromboplastine utilisé.

L'INR n'a pas d'unité. Il est, par définition, indépendant du réactif utilisé, et plusieurs mesures successives, faites dans des laboratoires différents, peuvent être comparées entre elles sans problème.

T.C.A (Temps de céphaline activée)

C'est un temps de coagulation qui explore la voie intrinsèque.

Cette mesure se fait en rapportant le temps de coagulation du patient a celui d'un témoin.

Il s'agit de mesurer le temps de coagulation d'un plasma sanguin recalcifié en présence de céphaline et d'un activateur particulier.

On exprime le ratio telle la formule :

2-6 Recherche d'agglutination irrégulière (R.A.I)

Principe :

Ce test se fait sur plaque dans des puits ou il y a un gel « filet » au fond.

On met en présence le sérum du patient(Anticorps) avec des antigènes spécifiques des agglutinines irrégulières.

Si la réaction antigène anticorps a lieu il y a une agglutination visible a l'œil nue

Cette réaction a lieu pendant la période d'incubation de 15 min à 37°C.

Ensuite on centrifuge, ce qui va permettre aux Ag et aux Ac qui n'ont pas agglutinés de traverser complètement le gel et de tomber au fond du puits.

En revanche les complexe Ag/Ac qui sont gros, sont retenue dans les mailles du gel et visible car diffues.

Si diffusion d'agglutination dans le gel, le test est considéré comme positif.

3-bilan

3-1 personnel et relationnel:

D'un point de vue personnel le stage m'a intéresser, j'ai pu découvrir le travail d'un laboratoire d'analyses et les responsabilités qui incombent a un technicien.

Je suis aussi ravi que toute les personnes du laboratoire m'aient accordé du temps pour m'apprendre et m'expliquer le fonctionnement des machines, j'ai pu aussi m'épanouir dans une grande liberté et même utiliser le matériel du laboratoire pour m'exercer.

Je voudrais insister sur le relationnel entre les différentes personnes du laboratoire, en effet dans ce travail le bon fonctionnement est dû essentiellement à la communication, on peut représenter la communication comme cela:

Biologistes



Les 3 « secteurs » du laboratoire sont en communication constante, sans cette communication le laboratoire ne fonctionnerait pas correctement.

De plus cette communication permet une ambiance de travail très agréable sans oublier que le travail passe avant tout.

3-2 les connaissances théoriques et pratiques

Les connaissances que j'ai pu acquérir au lycée saint louis m'ont servi au cours de mon stage. La partie concernant la microbiologie (=la bactériologie) m'a permis de mettre mes connaissances au service du laboratoire, en effet l'ensemencement des milieux de cultures et des galeries d'identification est au programme de 1er STL ce qui m'a permis de pouvoir me mettre en activité très rapidement dans ce service du laboratoire.

Toujours dans le domaine de la bactériologie j'ai pu utiliser mes connaissances théoriques notamment lors de l'identification d'une souche.

Le point négatif est que je n'avais jamais vu l'hématologie au cours de ma scolarité il m'a été donc assez compliqué de combler cette lacune mais l'aide plus que précieuse des personnes du laboratoire m'a permis de combler ce retard et même me donner une expérience dans ce domaine.

Pour conclure je dois dire que l'enseignement proposé par le lycée peut sembler obsolète par rapport au technique utilisé dans le monde du travail, par exemple les techniques biochimique manuel (ex :azote par méthode de Kjeldalh , dosage des nitrites par colorimétrie ...) qui ont complètement disparus.

3-3 découvertes du monde du travail

Ce stage est le troisième que je fais, durant ma scolarité j'ai pu découvrir le monde de l'informatique, celui du paysagisme, celui d'un laboratoire de collège, mais je n'avais jamais découvert le monde du médical.

Chaque expérience que j'ai pu avoir a été très bénéfique mais le stage dans le laboratoire ma permis de voir ce que mes études peuvent m'apporter comme travail.

J'ai découvert un travail enrichissant basé sur l'utilisation de machines, le travail de technicien est de vérifier l'état de fonctionnement de ces machines mais aussi de faire un premier diagnostic pour le biologiste.

Le travail de technicien réclame rigueur, précision et une prise d'initiative constante.

Dans le cadre de mon stage j'ai pu m'entretenir avec un technicien et j'ai pu avoir plus de précisions sur le métier de technicien, malheureusement ce métier est « voué à disparaître », en effet avec l'automatisation de tous les tests de laboratoire il n'y aura besoin que d'un technicien pour vérifier le bon fonctionnement des machines et un biologiste pour valider les résultats.

Le nouveau rôle du technicien sera d'assurer le prélèvement sanguin, le pré et le post analytique.

Remerciements:

Je tiens tout d'abord à remercier de m'avoir permis d'effectuer mon stage au sein de leur laboratoire et d'avoir mis à ma disposition tout le matériel nécessaire pour me permettre d'acquérir une meilleure technique de travail

Je tiens aussi à remercier toute l'équipe du laboratoire pour m'avoir soutenu dans mon travail et pour m'avoir appris comment travailler dans un laboratoire d'analyses.

Je voudrais aussi remercier plus particulièrement Monsieur pour avoir fait preuve d'une grande ténacité dans mon apprentissage et d'avoir souvent pris sur son temps libre pour m'aider dans le travail d'un technicien

□
ANNEXE 1

□
ANNEXE 3

□
ANNEXE 4

□
ANNEXE 5 => Salmonella sur gélose SMID

□
ANNEXE 6 => levure sur gélose Sabouraud

□
ANNEXE 7 => Neisseria gonoreae sur gélose au chocolat

□
ANNEXE 8

couleur du bouchon
caractéristiques/compositions

analyses réalisées

Rouge

tube sec sans anticoagulant

ou tube sec + activateur de coagulation (silice ou thrombine)

analyses de chimie, d'immunologie et hormonologie(test de grossesse) + tube pour prélever le sérum.

Bleu

contient du citrate qui bloque de façon réversible le calcium qui est utilisé à toute étape de la coagulation. Concentration = 9 unités de sang pour 1 unité de citrate.

dosage des facteurs de coagulations (TCA, TP, fibrinogène)

Violet

contient de l'EDTA qui altère le moins la morphologie des cellules.

numération de formule sanguine (NFS) , groupe sanguin.

Gris

contient du fluore qui bloque les enzymes de la glycolyse (dégradation du glucose)

dosage de la glycémie par exemple

Vert

contient de l'héparine qui bloque la perméabilité cellulaire à l'ion potassium K

ionogramme et analyses de chimie.

Noir

idem que le tube bleu mais avec un volume de 1 unité d'anticoagulant pour 4 unités de sang.

analyse de la vitesse de sédimentation.

1ère semaine

8 jours à 3 mois

3 mois à 3 ans

3 à 6ans

6 à 15 ans

Adulte

Hématies $10^6/\mu\text{L}$ (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 5,8F : 3,8 à 5,4

Leucocytes $10^3/\mu\text{L}$ (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 $10^3/\mu\text{L}$ (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 17,5F : 12,5 à 15,5
Hématocrite %
44 à 58
38 à 44
36 à 44
36 à 44
37 à 45
H : 40 à 50F : 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
en 10³/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

0,1 à 0,4

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