

Stage d'insertion en milieu professionnel

Période du stage :

Du 18/03/2017 Au 12/04/2017.

Lieu du stage :

Institut Pasteur d'Algérie.

Stagiaire :

Nom : LEFOUILI

Prénom : Messaoud

Année d'étude : 4^{ème} année

Enseignant
réfèrent :

Dr. RIRA Moufida

Maître du stage en
entreprise :

BELKADAR Chafika.

KEZZAL Salim.

Année universitaire : 2017/2018

Sommaire

I- Introduction générale.....	3
II- Description des tâches effectuées pendant le stage.....	3
II-1-Service des entérobactéries.....	3
II-1-1- Coproculture.....	3
II-1-2-Galeries miniaturisées API 20^E.....	7
II-1-3-Sérotypage.....	7
II-1-4-Antibiogramme.....	7
II-2-Service contrôle des vaccins et des sérums.....	8
III- Conclusion.....	10
IV-Références.....	10

I- Introduction

Sous le nom de stage d'insertion dans le milieu professionnel et durant la période du 18/03/2017 au 12/04/2017, j'ai effectué un stage au niveau de l'Institut Pasteur d'Algérie à Delly Brahim. Il a été réalisé au sein de deux services : service des entérobactéries et service de contrôle des vaccins et des sérums.

Le service des entérobactéries appartient au département de bactériologie. Il contient plusieurs laboratoires. Le stage a été effectué au niveau du laboratoire des salmonelles et shigelles. Le rôle de ce laboratoire est de faire des diagnostics cliniques des selles des malades pour détecter les toxi-infections et aussi faire des contrôles périodiques d'hygiène pour les personnes qui offrent des services de restauration, pour détecter s'il y a des porteurs sains.

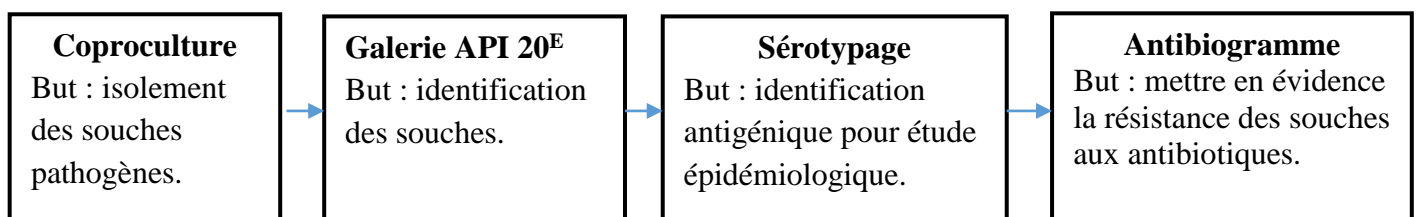
Le service de contrôle de qualité des vaccins et des sérums est sensé tester la conformité des produits biologiques à la norme avant qu'ils soient attribués à l'utilisation. Il contrôle les produits intérieurs et extérieurs, pour donner des certificats reconnus au niveau national.

Le but de ce stage est d'élargir et de renforcer les connaissances sur les réalités techniques et économiques du milieu professionnel et aussi de donner une occasion de mettre en pratique les connaissances acquises au long du cursus scolaire.

II-Description des tâches effectuées dans le stage

II-1-Service des entérobactéries (laboratoire des salmonelles et shigelles)

Le travail s'est effectué selon le schéma suivant :



II-1-1- Coproculture

C'est l'examen bactériologique des selles, afin de détecter la présence de germes pathogènes, normalement absents du tube digestif ou anormalement nombreux. Le but de la coproculture consiste à isoler, au sein d'une flore complexe, un nombre limité d'espèces réputées pathogènes. Au niveau du service des entérobactéries les souches investiguées sont : *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Compylobacter* et *Escherichia Coli* (pour les enfants moins de 2 ans).

La procédure du coproculture se déroule durant plusieurs jours si l'échantillon est suspect :

a. 1^{er} jours

Réception des échantillons et leur enregistrement par numération et remplissage des fiches de renseignement. Après des suspensions sont préparées en mettant une noix de selle dans 10 mL d'eau physiologique. Ensuite, ils sont ensemencés dans 4 types des milieux présentés dans le tableau 1.

Tableau 1. Milieux utilisés dans la coproculture

Milieux de culture	Hecktoen	GNAB (Gélose Nutritive Alcaline Biliée)	CIN (Cefsulodine-Irgasan-Novobiocine)	Compy
Germe ciblé	<i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> et <i>Escherichia Coli</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Compylobacter</i>
Incubation	à 37°C, 24h.		à 30°C, 24h.	à 37°C, 24h.

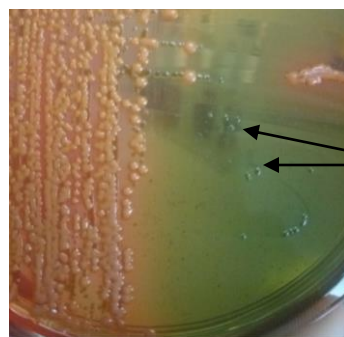
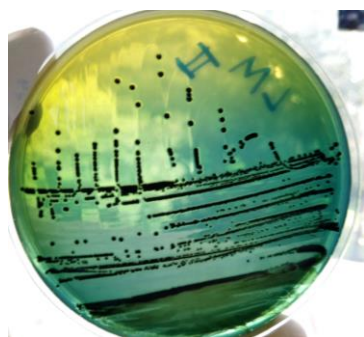
Pour détecter les germes à très faible quantités, des enrichissements sont effectués dans les milieux présentés dans le tableau 2.

Tableau 2. Milieux d'enrichissement utilisé pour la coproculture

Milieux d'enrichissement	SFB (Bouillon au Sélénite Acide de Sodium)	EPA (Eau Peptonée Alcaline)	MCconkey	Priston
Germe enrichir	<i>Salmonella</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Compylobacter</i>
Incubation	à 37°C, 24h		4°C, 10jours	37°C, 48h, dans un micro aérophile

b. 2^{ème} jour

Après 24 h d'incubation, les boîtes sont observées. Les souches cherchées ont un aspect connu sur leur milieu sélectif, leur distinction se fait en rependant à certaine caractère biochimique qui leur appartient (Figure 1 et Figure 2).



Colonies suspect de *Shigella*

Figure 1. Observation macroscopique des ensemencements directs sur Hecktoen

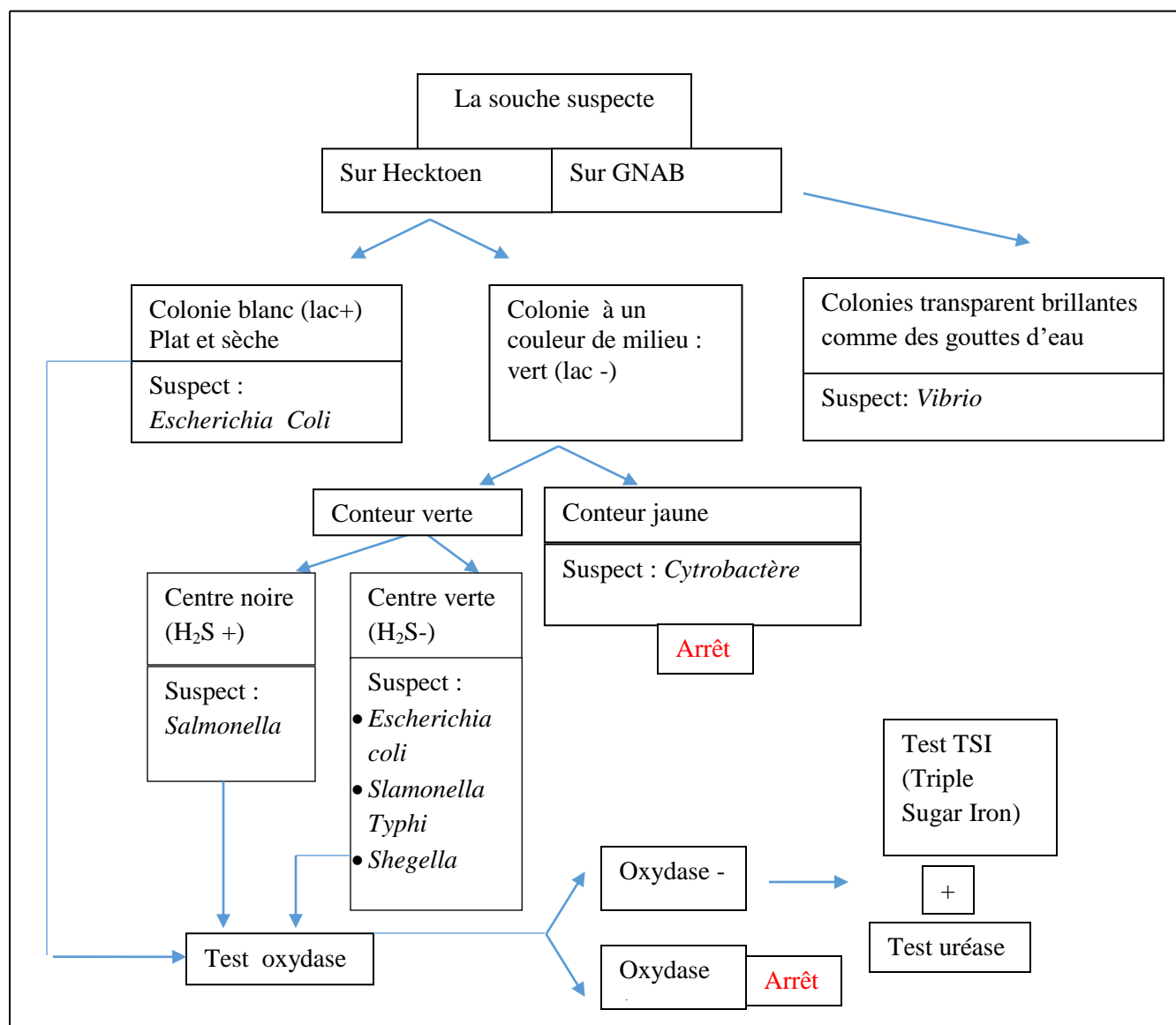


Figure 2. Organigramme des étapes d'exploitation des caractères biochimiques des souches suspectes.

Des ensemencements et des enrichissements sont faits à partir des suspensions d'enrichissements 1, qui sont appelées ensemencement 1, enrichissement 2.

c. 3^{em} jour

Aspect de *Salmonella* sur TSI (Figure 3, a) : Glu +, surface rouge (Lac-), production du gaz, couleur noir (H₂S+), sans odeur. Une galerie API 20^E est effectuée.

Aspect de *Shigella* (Figure 3, b) : Glu +, surface rouge (Lac-), pas du gaz, couleur noir (H₂S-).

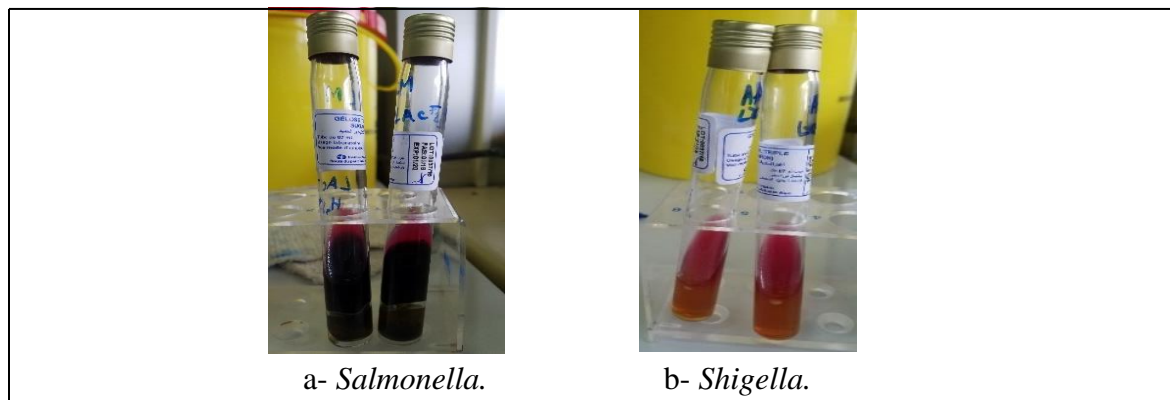


Figure 3. Aspect de *Salmonella* et *Shigella* sur TSI (Triple Sugar Iron)

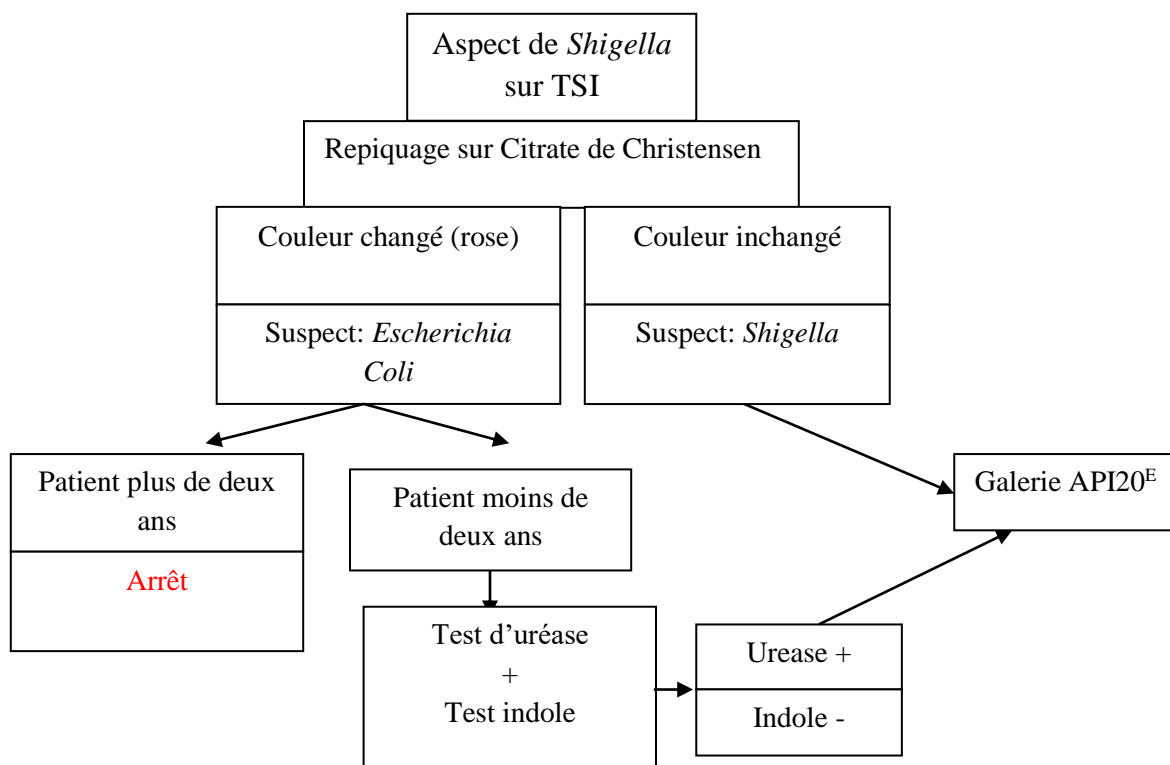


Figure 4. Organigramme des étapes d'exploitation des caractères biochimiques des souches suspect repiqué à partir de TSI

Les souches qui ont un aspect de *Shigella* sur TSI doivent subir d'autres tests biochimiques présentés dans la figure 4.

Pour les boîtes d'ensemencement 1 et 2 les mêmes étapes sont faites.

II-1-2-Galeries miniaturisées API 20^E

C'est une galerie de 20 micro-tubes, prêts à l'emploi. Elle permet de réaliser 23 tests biochimiques standardisés et miniaturisés, afin d'identifier des bacilles Gram – appartenant à la famille des *Entérobactériaceae*. Ci-dessous un exemple d'une *Salmonella* trouvé lors de ce stage :

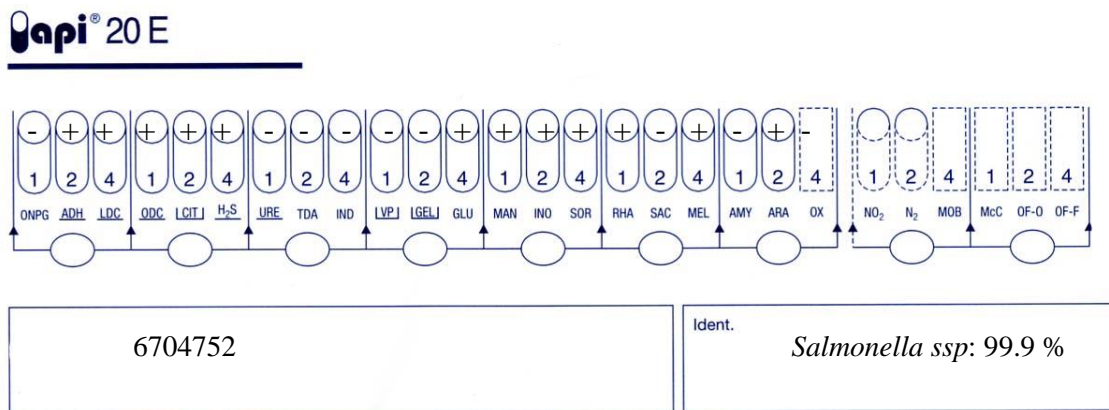


Figure 5. Fiche d'une galerie API20^E correspond à une salmonelle identifiée

II-1-3-Sérotypage : identification antigénique

Ce test est effectué directement après la mise en évidence de la présence d'une souche pathogène, pour un intérêt épidémiologique. Le principe de la recherche de syrotype est basé sur la mise en évidence d'une réaction spécifique entre un anticorps présent dans un sérum test et un antigène porté par le microorganisme étudié. Cette réaction est visualisée par agglutination, qui est le résultat macroscopique de la réaction antigène-anticorps.

Le séro-typage de salmonelle est basé sur le tableau de **KAUFFMANN-WHITE**. Il est constitué de deux antigènes : l'un est somatique, de paroi(O) et l'autre flagellaire (H) regroupé en deux phases (1 et 2). Pour exploiter les deux phases, une inversion de phase doit être appliquée.

II-1-4-Antibiogramme

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique. Dans la figure 6, un exemple d'un antibiogramme effectué sur une *Salmonella ssp*, identifiée à partir des selles d'un malade. Le tableau 3 présente les mesures des zones d'inhibition et leurs interprétations.



Figure 6. Observation d'un antibiogramme d'une souche de *Salmonella ssp*.

Tableau 3. Résultats d'un antibiogramme d'une *Salmonella ssp*.

Antibiotique testé	Diamètre d'inhibition (mm)	Interprétation
Amoxicilline	<6	R
Ampicilline	<6	R
Ticarcilline	<6	R
Piperacilline	15	R
Cefazoline	20	I
Colistine	13	S
Augmentin	10	R
Cefoxitine	24	S
Ceftazidine	27	S
Cefotaxime	34	S
Ceftriaxone	35	S
Aztréonam	34	S
Imipenem	29	S
Céfépime	36	S
Meropenem	30	S
Ertapenem	32	S

R: résistant, S: sensible, I: intermédiaire.

II-2-Service contrôle des vaccins et des sérums

Ce service est sensé tester la conformité des produits biologiques à la norme. La bibliographie des procédures et des normes embauchées par ce service, suivent la pharmacopée européenne. Le contrôle s'occupe de 4 paramètres important : stérilité, test physico-chimique, activité et toxicité. Les tests effectués ont le but de quantifier des paramètres, pour les comparer à des intervalles bien définis de la conformité correspondant à chaque produit. Le produit biologique doit répondre à la totalité de ces paramètres pour être admis « répondre à la norme ». L'organigramme suivant représente les tests effectués au niveau de service pour chaque paramètre:

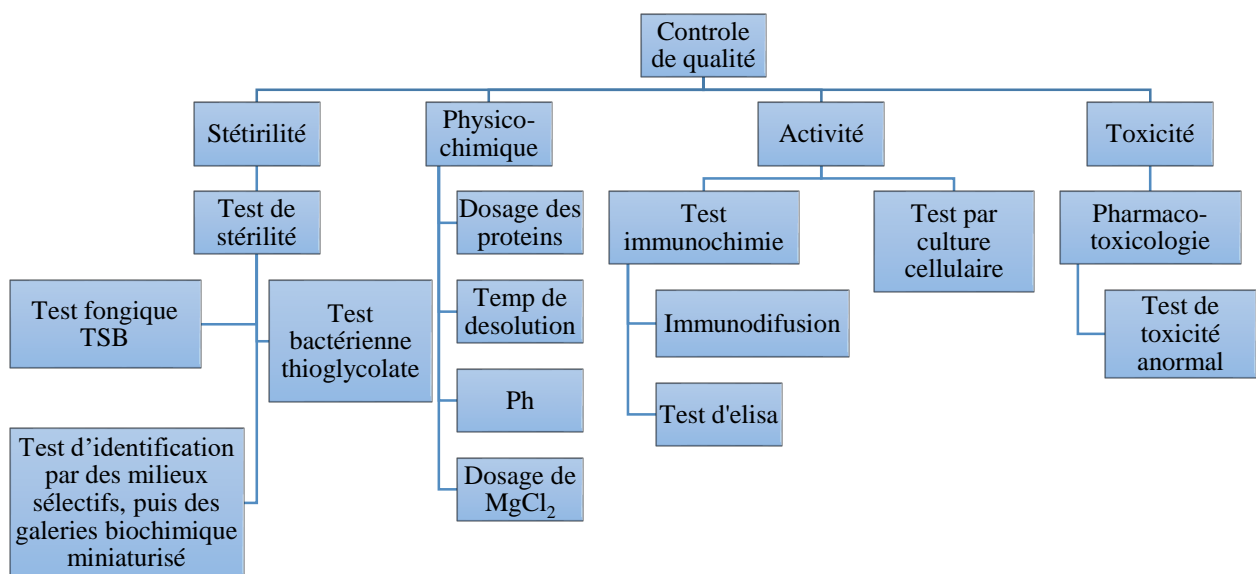


Figure 7. Les tests majeurs effectués au niveau du service de control des vaccins et des sérums

Les tests sont effectués au niveau des différentes unités de service :

- a. **Unité de physicochimie:** le produit biologique doit avoir une concentration précise en protéines. Pour cela, un test de dosage des protéines est toujours effectué en utilisant la méthode de Biuret (George R Kingsley, 1942).
- b. **Unité de microbiologique:** le produit biologique doit être dépourvu de tous genre de contamination. Pour cela, un test de stérilité est effectué, en mettant le produit biologique dans des flacons qui contiens des milieux qui permettent la croissance fongique (milieu TBS : bouillon Trypone Soja) et la croissance bactérienne (Thioglycolate avec Résazurine). Les flacons sont incubés pendant 7 jours. L'observation d'un trouble dans le flacon veut dire que le produit n'est pas stérile. La souche contaminant le produit doit être identifié.

- c. **Unité d'immunochimie:** le contrôle par technique immunologique, dont la technique ELISA est utilisé pour le contrôle d'identité et d'activité du vaccin de l'hépatite B ADNr. La technique d'immuno-diffusion double et la séro-agglutination sont utilisées pour le contrôle de l'identité du principe actif d'autres produits.
- d. **Unité de pharmacotoxicologie :** au niveau de l'animalerie s'effectuent des tests *in vivo* sur les produits injectables, parmi ces tests le test de toxicité anormal. Il Permet d'observer la tolérance au produit biologique injectable. Il est utilisé pour tester l'effet des substances présentes dans la préparation de produit, autre que le principe actif. Ce test se fait en appliquant le produit sur des souris saines et faire des observations au long de 7 jours. Pour que le produit soit conforme, aucune souris ne doit manifester un symptôme de maladie, notamment aucune perte de poids.
- e. **Unité de culture cellulaire :** pour le contrôle d'activité et d'identité des vaccins viraux. Le vaccin est mis avec des cellules en culture pour faire un titrage du nombre des ECP (effet cyto-pathogène virale).

III- Conclusion

Lors de première partie du stage, quatre bactéries de l'espèce *Salmonella ssp* ont été identifiés à partir des échantillons des malades. Alors que dans le contrôle d'hygiène aucun porteur sain n'a été identifié. De même pour les shigelles ou les vibrios.

Le test d'antibiogramme de *Salmonella ssp* identifié a montré une résistance à plusieurs antibiotiques auxquels la souche a présenté une forte résistance. Il s'agit de l'amoxicilline, l'ampicilline et la ticarcilline, suivi par une résistance modérée à la piperacilline et l'augmentin. Le test a indiqué aussi une sensibilité à la colistine, la cefoxitine, la ceftazidime, la cefotaxime, la ceftriaxone, l'aztréonam, l'imipenem, la céfépime, la meropenem et l'ertapenem.

La deuxième partie du stage a consisté à élucider la sensibilité d'un produit biologique, et l'exactitude de ses paramètres en exploitant plusieurs méthodes d'analyse des produits biologiques.

Le stage a bien répondu aux objectifs prévus. Il a été une bonne occasion pour acquérir des connaissances sur les réalités techniques du milieu professionnel. Le diagnostic des souches pathogène, tels que les salmonelles et les shigelles, dans un cadre clinique a donné une conscience sur l'importance des bonnes pratiques au niveau du laboratoire. Ce stage a permis ainsi d'apprendre une des procédures d'identification des microorganismes en exploitant plusieurs techniques fondamentales utilisées dans tout laboratoire microbiologique.

IV -References:

George R Kingsley. 1942. The direct biuret method for the determination of serum proteins as applied to photoelectric and visual colorimetry. Journal of Laboratory and Clinical Medicine. Volume 27. P 840-845