



Planches pour le Diagnostic microscopique du paludisme

Ces planches visent à améliorer le diagnostic microscopique du paludisme en RDC. Elles fournissent au microscopiste de terrain le minimum essentiel pour identifier une infection palustre. Elles visent également à uniformiser les techniques utilisées en RDC.

Entretien du microscope:

- Garder l'appareil à l'abri de la poussière (par exemple: housse) et de l'humidité (par exemple: armoire contenant une ampoule allumée)
- Utiliser seulement de l'huile à immersion (minérale). Ne pas utiliser d'huile de cèdre!
- Après chaque emploi, essuyer l'objectif à immersion en le touchant (sans frotter!) avec un papier doux ou un tissu
- Si on dispose de liquide spécial de nettoyage pour instruments d'optique, on peut en imbiber le papier doux/tissu
- Si l'objectif est très sale, le nettoyer avec un papier doux/tissu imbibé de liquide spécial de nettoyage (à défaut, utiliser de l'eau savonneuse)

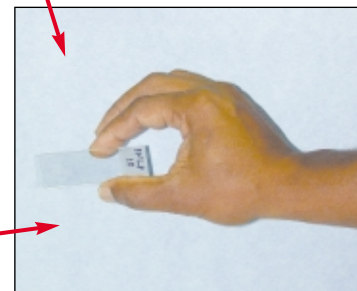
Nettoyage des lames:

Lames neuves et propres:

- Les tremper 30 minutes à 1 heure dans l'alcool dénaturé (éthanol et éther)
- Les essuyer avec un linge propre et sec
- Une fois propres, les lames doivent être tenues par les bords seulement

Lames de ré-emploi (ou lames neuves avec moisissures):

- Les faire bouillir 30 minutes à 1 heure dans l'eau contenant un détergent (par exemple: savon), et les laisser tremper dans cette eau pendant 24 heures
- Les nettoyer une à une avec un linge propre et sec
- Les placer dans l'alcool dénaturé (éthanol et éther)
- Les essuyer avec un linge propre et sec
- Une fois propres, les lames doivent être tenues par les bords seulement



Emballage et stockage des lames propres:

- Les emballer (après séchage!) par paquets de 10 dans du papier (par exemple: papier hygiénique)
- Garder chaque paquet fermé à l'aide d'un élastique ou de scotch
- Garder les paquets au sec; les utiliser dans les 2 mois qui suivent

Plasmodium falciparum: Trophozoites

Traits caractéristiques

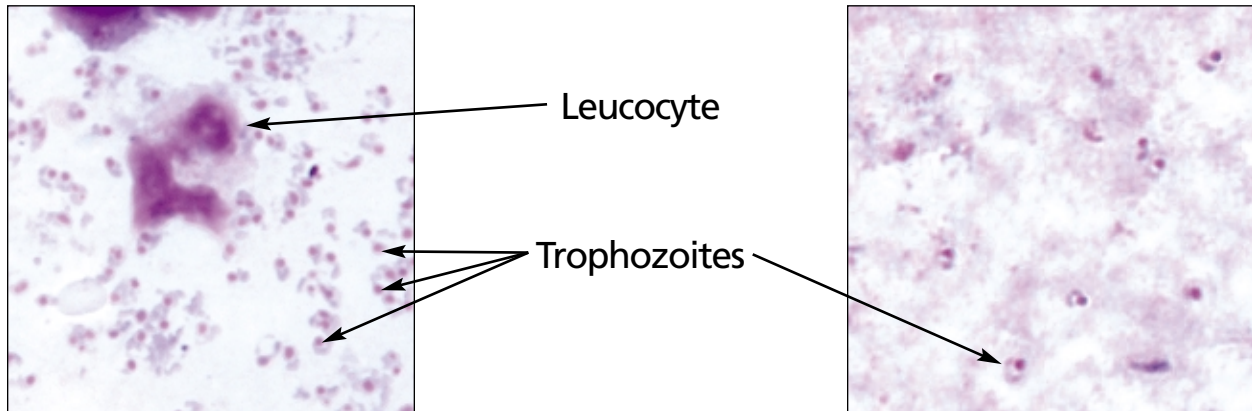
Obligatoires:

Noyau rouge
Cytoplasme bleu

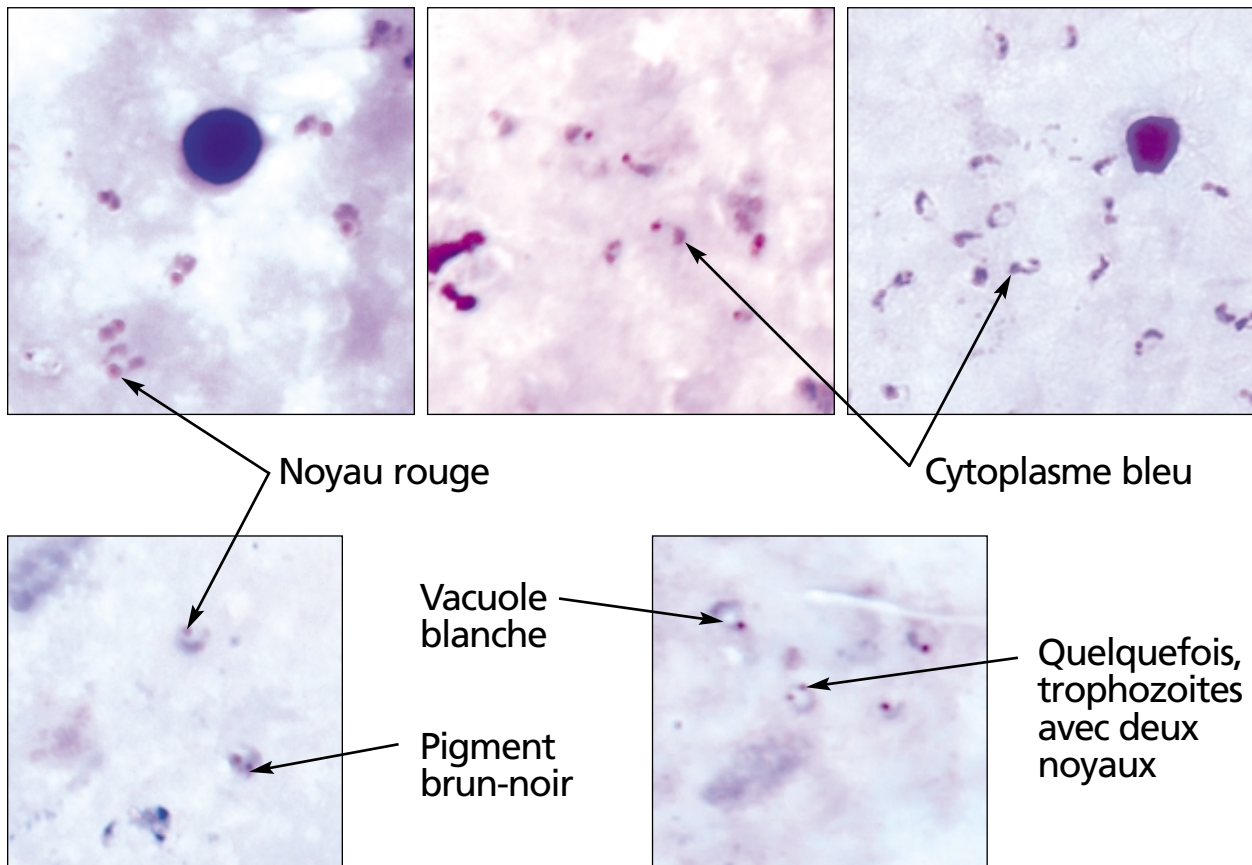
Facultatifs:

Vacuole blanche
Pigment brun-noir

Trophozoites jeunes (petits)



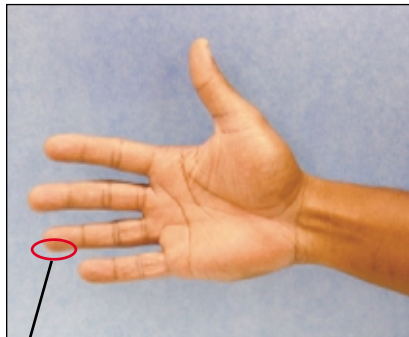
Trophozoites plus âgés (plus gros)



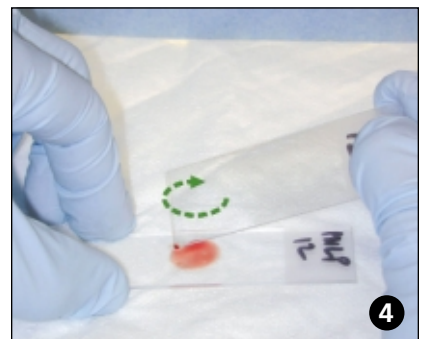
Identification des lames:

Étiqueter ou numéroter chaque lame avec un instrument indélébile (marqueur, crayon gras) au moment du prélèvement

Prélèvement et confection des gouttes épaisses:



De préférence, piquer ici:
sur l'annulaire, sur le côté
de la pulpe du doigt

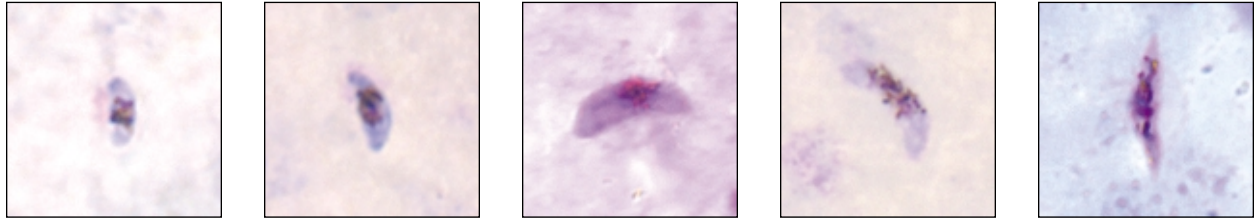


- Toujours mettre des gants. Désinfecter l'annulaire. (Pour le tout petit enfant on peut utiliser le gros orteil ou le talon)
- Laisser sécher l'alcool
- Piquer avec une lancette stérile
- Déposer 1 grosse goutte (ou 3 petites gouttes) de sang au milieu de la lame
- A l'aide du coin d'une lame, étaler le sang sous forme d'un cercle d'un centimètre de diamètre en tournant avec des mouvements circulaires. (Essuyer le coin de la lame qui a servi à étaler le sang!)
- Laisser sécher en position horizontale, à la température ambiante, à l'abri des mouches et des poussières (par exemple: couvrir avec une boîte)

(On peut aussi utiliser du sang prélevé à la veine pour d'autres examens. Si ce sang contient des anticoagulants, le sang risque de se décoller de la lame durant le lavage: il faut bien sécher la goutte épaisse avant la coloration!)



Plasmodium falciparum: Gamétocytes



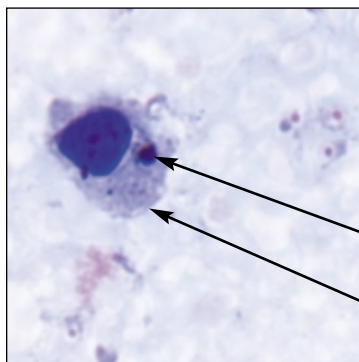
Formes en banane ou en croissant; pigment toujours présent

Dans les infections à *P. falciparum*, les trophozoïtes et les gamétocytes sont les deux stades présents dans la circulation; les schizontes ne s'y observent qu'exceptionnellement

Numération des parasites:

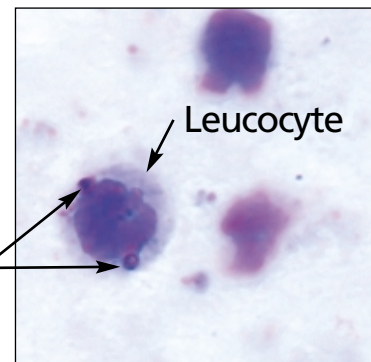
Une numération des parasites offre une mesure (imparfaite) de la gravité de l'infection. On compte seulement les trophozoïtes. (Mais si des gamétocytes sont présents, les signaler.)

- + : 1-10 trophozoïtes par 100 champs
- ++ : 11-100 trophozoïtes par 100 champs
- +++ : 1-10 trophozoïtes par champ
- ++++ : > 10 trophozoïtes par champ



Quelquefois, on voit des leucocytes avec du pigment: ceci signale une infection récente ou actuelle

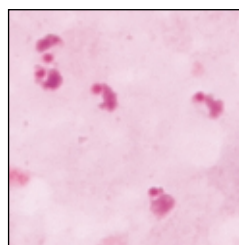
Pigment
Leucocyte



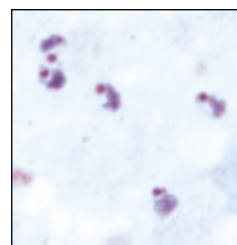
Leucocyte
Pigment

Attention!

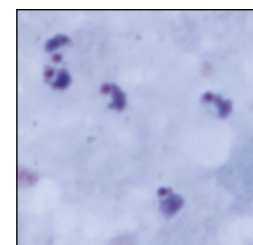
Un pH incorrect de l'eau tamponnée peut rendre la lecture difficile!



Trop acide



Correct (pH 7,2)



Trop alcalin



Préparation des colorants

Solution mère de Giemsa:

poudre de Giemsa	7,5g
méthanol	650cc
glycérine purifiée	350cc

Dans un récipient (ballon de préférence) mettre une poignée de billes de verre, puis la poudre de Giemsa. Ajouter le méthanol, et bien secouer. Ajouter la glycérine, et bien secouer. Garder le récipient bien fermé et à l'abri de la lumière. Remélanger en secouant bien chaque jour pendant 3 jours. Filtrer avec un papier buvard ou un papier filtre

Eau tamponnée:

Na ₂ HPO ₄ anhydre	1g
KH ₂ PO ₄	0,7g
eau distillée	1000cc

Ajuster le pH à 7,2 en ajoutant Na₂HPO₄ ou KH₂PO₄

S'il n'y a pas d'eau tamponnée, on peut à la rigueur utiliser l'eau du robinet ou l'eau de pluie, en ajustant le pH avec des sels acides ou basiques appropriés

Coloration

- Méthode ordinaire (solution de travail: Giemsa à 3%, colorer pendant 30 minutes): mettre 3 cc de solution mère dans 97 cc d'eau tamponnée (ou autres volumes équivalents, par exemple: 6 gouttes de solution mère dans 9,7 cc d'eau tamponnée)
- Méthode rapide (solution de travail: Giemsa à 10%, colorer pendant 10 minutes): mettre 10 cc de solution mère dans 90 cc d'eau tamponnée (ou autres volumes équivalents, par exemple: 20 gouttes de solution mère dans 9 cc d'eau tamponnée)

Remarques:

- Utiliser la solution de travail le même jour! La jeter à la fin de la journée!
- Maintenir le pH de l'eau tamponnée à 7,2: (si possible, mesurer avec un papier indicateur)
 - si la goutte épaisse est trop bleue, ajouter à l'eau tamponnée (trop alcaline) quelques gouttes de KH₂PO₄ 2% (ou d'autres sels appropriés)
 - si la préparation est trop rose, ajouter à l'eau tamponnée (trop acide), quelques gouttes de Na₂HPO₄ 2% (ou d'autres sels appropriés)

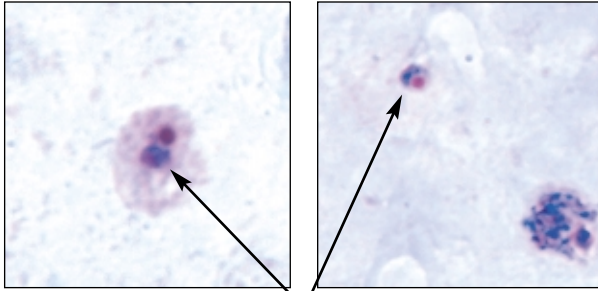
Lecture des lames:

- De préférence, mettre au point d'abord avec l'objectif 10X puis passer à l'objectif 100X (immersion)
- Avant de dire qu'une goutte épaisse est négative, il faudrait l'examiner sur 100 champs au moins

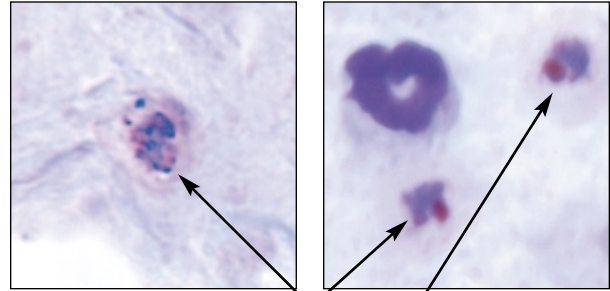


Autres espèces de *Plasmodium* (en Afrique: surtout *P. malariae* et *P. ovale*)

- Tous les stades (trophozoites, schizontes et gamétocytes) peuvent se retrouver dans la circulation
- Les gamétocytes sont ronds ou ovales

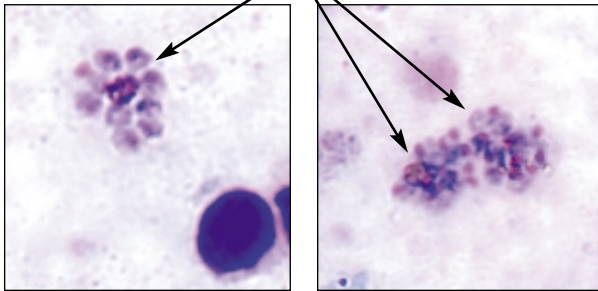


Trophozoites jeunes (petits)

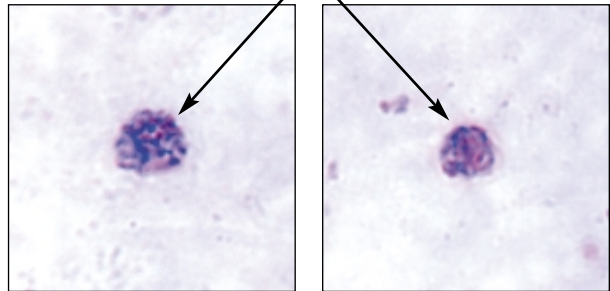


Trophozoites plus âgés (plus gros)

Schizontes

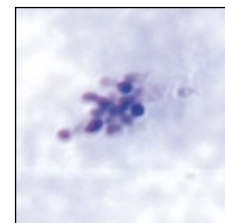


Gamétocytes

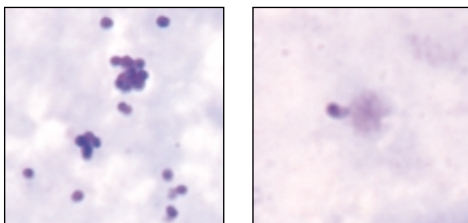


Artefacts (faux parasites)

Ressemblent à des parasites par leur forme, mais n'en ont pas les deux caractéristiques obligatoires: le noyau rouge et le cytoplasme bleu



Faux schizonte: pas de pigment!



Faux trophozoites: ni noyau rouge, ni cytoplasme bleu!



Faux gamétocyte: pas de pigment!