

Détection des infections plasmodiales par microscopie
Detection of Plasmodium infection by microscopy

Version : 6

Date : 01/11/2017

REDACTEURS	VERIFICATEURS	APPROBATEUR	DESTINATAIRES
André Offianan TOURE	Franck REMOUE Géorgia DAMIEN Thomas KESTEMAN	Participants au projet PALEVALUT	Techniciens en parasitologie de laboratoire et/ou de terrain
Date : 19/08/2013	Date : 26/08/2013	Date : 04/10/2016	

Objet : La procédure définit la confection des gouttes épaisses (GE) et frottis sanguins (FS) et leur lecture, qui permet la détection des infections plasmodiales, l'évaluation de la densité parasitaire et l'identification l'espèce de *Plasmodium*.

Application : Le document est élaboré pour le personnel chargé, au laboratoire et/ou sur le terrain, de la confection des gouttes épaisses et frottis sanguins, et/ou de leur lecture (*i.e.* techniciens en parasitologie).

Documents associés :


- POS n°5 ; PREVALENCE : Prévalence du paludisme, des interventions de contrôle et de leurs facteurs associés
- POS n°6 ; EFFECTIVENESS-INFECTON : Efficacité des mesures de lutte antipaludique sur les infections plasmodiales
- POS n°7 ; EFFECTIVENESS-MORBIDITY : Efficacité des mesures de lutte antipaludique sur la morbidité non compliquée
- POS n° 9 ; BLOOD-SAMPLING : Prélèvements sanguins pour analyses biologiques

Annexes :

- **Annexe 1 :** Dilution du Giemsa
- **Annexe 2 :** Entretien du microscope

Historique des modifications :

Date	Version	Nature de la modification
19/08/2013	1	Création de la POS
26/08/2013	2	Correction par les vérificateurs
07/11/2013	3	Validation et Intégration dans BLOOD-SAMPLING
04/10/2016	4	Prise en compte des remarques des responsables de la mise en œuvre de la POS (Madagascar, Bénin, Cameroun et Côte d'Ivoire) et insertion des propositions faites lors de l'atelier WP4 (3 au 7 octobre


	Procédure Opératoire Standard n°11	DIAG-MICROSCOP
	Détection des infections plasmodiales par microscopie	
	<i>Detection of Plasmodium infection by microscopy</i>	
		Version : 6
		Date : 01/11/2017

		2016, Paris)
27/10/2016	5	Remise en forme selon modèle défini
01/11//2017	6	Validation C. Rogier

Sommaire :

1. Introduction	4
2. Objectifs	4
3. Responsabilités	4
4. Matériels	4
4.1 Pour la réalisation des lames.....	4
4.2 Pour la fixation et la coloration	5
4.3 Pour la lecture des lames et le comptage des parasites	5
4.4 Précautions	5
5. Méthodes	5
5.1 Réalisation des lames	5
5.2 Coloration	6
5.3 Lecture des lames GE	7
5.4 Contrôle qualité	8
6. Références	9
Annexe 1 Dilution du Giemsa	11
Annexe 2 Entretien du microscope	12



	Procédure Opératoire Standard n°11	DIAG-MICROSCOP
Détection des infections plasmodiales par microscopie <i>Detection of Plasmodium infection by microscopy</i>		Version : 6
		Date : 01/11/2017

1. Introduction

L'examen en microscopie optique conventionnelle par un opérateur expert, de gouttes épaisses et de frottis sanguins bien préparés et bien colorés, est la méthode de référence pour le diagnostic d'infection plasmodiale, l'identification de l'espèce plasmodiale en cause et l'évaluation de la densité parasitaire. La goutte épaisse (GE) qui permet un examen plus rapide d'une plus grande quantité de sang est utilisée pour la détection des infections plasmodiales et pour l'évaluation de la densité parasitaire (généralement à partir du dénombrement des parasites et des leucocytes). Le frottis sanguin (FS) qui respecte mieux la morphologie des hématies parasitées est plus approprié pour l'identification des espèces plasmodiales (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et / ou *P. malariae*). Cependant, la GE peut aussi être utilisée pour identifier les espèces plasmodiales et les stades parasitaires (asexués et sexués), même si l'exactitude des observations est moins assurée qu'avec le FS. Cet inconvénient est compensé, dans les études épidémiologiques, par la rapidité de lecture des GE par rapport aux frottis, en particulier lorsque les densités parasitaires ou les taux de prévalence des infections plasmodiales sont faibles. Une bonne préparation et une bonne coloration des GE et des FS sont essentielles pour une microscopie de haute qualité.

2. Objectifs

Cette POS décrit le processus de préparation, de confection, de coloration et de lecture des GE (et éventuellement des FS) pour la microscopie de diagnostic des infections plasmodiales et l'estimation de leurs densités parasitaires.

3. Responsabilités

La GE (et éventuellement le FS) sont réalisés sur le terrain ou en laboratoire par des techniciens spécialisés. Le contrôle de qualité de ces tests parasitologiques est sous la responsabilité des épidémiologistes/parasitologues spécialistes.



4. Matériels

4.1 Pour la préparation des étalements de sang sur lames


- Lames de verre support pour examen microscopique, à bord poli, lavées et dégraissées
- Plateau pour le séchage des lames à l'abri des mouches et de la poussière
- Boîte de rangement pour lames
- Ruban adhésif ou élastique
- Crayon à papier

4.2 Pour la fixation et la coloration

- Epruvettes graduées de 1 000, 100 et 25 ml
- pH-mètre électrique ou ruban pH-mètre
- Plateau et/ou bac à coloration
- Séchoir à lames
- Boîtes de rangement pour lames (papier tissé/papier normal et élastique pour envelopper les lames colorées)
- Minuteur ou chronomètre
- Marqueurs indélébiles
- Solution de coloration au Giemsa (voir Annexe 1)
- Poudre pour tampon pour solution à pH 7,2 ou solution mère de tampon
- Eau distillée
- Méthanol absolu (100%)

4.3 Pour la lecture des lames et le comptage des parasites

- Microscope optique (avec oculaires x 10, et objectifs x 40 et x 100 à immersion)
- Compteur Manuel
- Cahier papier
- Papier lotus pour nettoyer les optiques
- Coffret de rangement spécifique aux lames
- Huile à immersion

	Procédure Opératoire Standard n°11	DIAG-MICROSCOP
Détection des infections plasmodiales par microscopie <i>Detection of Plasmodium infection by microscopy</i>		Version : 6
		Date : 01/11/2017

5. Méthodes

5.1 Confection des étalements de sang sur lames

La procédure de prélèvement de sang (capillaire ou veineux) est décrite dans la POS n°9 BLOOD-SAMPLING. Cette POS décrit aussi comment déposer des gouttes de sang sur la lame de verre pour confectionner GE (milieu de la lame) et FS (sur la moitié libre de la lame où le frottis sanguin doit être tiré).

5.1.1 Confection de la GE

- Appliquer le coin d'une deuxième lame au centre de la goutte placée au centre de la première lame (placée à plat sur un plan).
- Etendre la goutte par un mouvement hélicoïdal centrifuge du coin de la deuxième lame, pendant environ 30 secondes, jusqu'à étaler le sang de la goutte en un disque d'environ 1 cm de diamètre.


5.1.2 Confection du FS

1. Placer une deuxième lame de verre au contact de la goutte de sang sur la moitié libre de la lame où le frottis sanguin doit être tiré (cette première lame est posée sur un plan), en formant un angle d'environ 45° par rapport à l'horizontale : par capillarité le long du bord de la deuxième lame, le sang de la goutte s'étend sur toute la largeur de la première lame.
2. D'un mouvement rectiligne uniforme, « tirer » le sang sur la première lame en direction de sa moitié libre : le sang est alors étalé en un mince frottis.
3. Sécher rapidement le FS ainsi confectionné par agitation : cela évite que les hématies se déforment (avec des crénelures sur leur pourtour).

5.1.3 Fixation, stockage sur le terrain et point d'attention

- Le FS séché doit être fixé avec du méthanol. La GE ne doit pas être fixée au méthanol. Lorsque le FS et la GE sont confectionnés sur la même lame de verre, la fixation nécessite une attention particulière : *i.e.* verser le méthanol sur le frottis en maintenant la lame penchée pour qu'il ne s'écoule pas en direction de la GE.
- Numéroté la lame en marquant le numéro d'identification (ID) du patient/individu de même que la date de réalisation du FS/GE et les initiales du patient/individu
- Le personnel en charge de la confection des étalements de sang sur le terrain doit avoir été particulièrement bien formé et doit être bien et régulièrement supervisé par un



	Procédure Opératoire Standard n°11	DIAG-MICROSCOP
Détection des infections plasmodiales par microscopie <i>Detection of Plasmodium infection by microscopy</i>		Version : 6
		Date : 01/11/2017

personnel expert (microscopistes et parasitologues spécialisés). Si ce n'est pas le cas et que ce n'est pas réalisable, il vaut mieux que la collection de sang soit effectuée à partir de prélèvement sanguin veineux, dans des tubes avec anticoagulant type EDTA, et que le sang soit acheminé dans un laboratoire où le personnel a les capacités requises.

5.2 Coloration des étalements de sang sur lames

La coloration et la lecture des lames ne devraient être effectuées sur le terrain que si (i) le technicien ou le personnel opérant a la capacité de réaliser cela correctement et (ii) si les conditions logistiques (électricité, microscope fonctionnel, réactifs, etc...) sont parfaitement réunies. Dans le cas contraire, les lames doivent être acheminées dans un laboratoire où les compétences, capacités et conditions requises sont réunies.


5.2.1 Précautions

- Pour la coloration (préparation du colorant et lavage), utiliser une eau dont le pH est proche de la neutralité. Le pH doit être compris entre 7,0 et 7,2, et vérifié à l'aide d'un pH-mètre électrique ou de ruban pH-mètre. Certaines eaux minérales vendues en bouteille remplissent ces conditions et peuvent être utilisées en routine. A défaut, il est possible d'utiliser de l'eau distillée et de fabriquer une eau tamponnée à pH 7,2.
- Filtrer le colorant Giemsa sur papier filtre avant son utilisation (pour éviter la présence de particules qui constitueraient des artéfacts à la lecture microscopique)
- Vérifier la qualité des réactifs avant de les utiliser pour la coloration et préférer préparer les réactifs avant chaque utilisation. Les solutions diluées de Giemsa ne doivent pas être utilisées plus de 12 heures.

5.2.2 Mode opératoire de la coloration

1. Après séchage des GE, placer les lames en position verticale, sur la tranche la plus courte ou sur la tranche la plus longue (pas à plat), dans le bac à coloration
2. Remplir le bac d'une solution de Giemsa à 6 % jusqu'à recouvrir entièrement les lames
3. Respecter un temps de coloration de 30-45 minutes (à contrôler à l'aide d'un chronomètre ou minuteur).
4. Laver les lames en les plongeant dans de l'eau à pH entre 7,0 et 7,2 (ou en faisant l'eau couler sur elles jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de trace de colorant qui s'écoule).
5. Égoutter les lames lavées.
6. Placer les lames pour séchage sur un râtelier en positions inclinées, la face portant le sang coloré placée en dessous pour les protéger de la poussière.



	Procédure Opératoire Standard n°11	DIAG-MICROSCOP
Détection des infections plasmodiales par microscopie <i>Detection of Plasmodium infection by microscopy</i>		Version : 6
		Date : 01/11/2017

5.3 Recherche des plasmodiums sur GE

1. Avec l'objectif x40, parcourir la GE pour sélectionner une partie exempte de débris de coloration et riche en globules blancs.
2. Placer une goutte d'huile à immersion sur cette partie de la GE.
3. Examiner cette partie de la GE avec l'objectif x100 à immersion.
4. Vérifier que la partie de la GE sélectionnée est de bonne qualité (i.e. avec de l'ordre de 16 globules blancs par champ microscopique, sans débris cellulaires gênant la lecture, ni artéfacts de coloration) et examiner 200 champs microscopiques avant de considérer l'examen comme négatif pour la recherche de plasmodium.

5.4 Estimation de la densité parasitaire sur GE

La densité parasitaire est estimée par le nombre de plasmodiums observés par microlitre de sang ($n / \mu\text{l}$). Le calcul de la densité parasitaire comprend

- le dénombrement des plasmodiums (par espèces et par stades parasitaires sanguins : asexués et sexués, i.e. les gamétocytes) et des leucocytes sur les champs microscopiques examinés, soit généralement 200 champs microscopiques.
- l'estimation de la leucocytémie (i.e. nombre de globules blancs par microlitre de sang) par un analyseur d'hématologie ou manuellement. A défaut, considérer une leucocytémie théorique à 8000 leucocytes / μL de sang:
- le calcul de la densité parasitaire : $DP = (\text{Nombre de parasites } Plasmodium \text{ comptés} / \text{nombre de leucocytes comptés}) \times (\text{Nombre de leucocytes par } \mu\text{l de sang})$, exprimé en nombre de plasmodium par μl de sang.

5.5 Assurance et contrôle qualité

L'assurance de la qualité des examens microscopiques repose sur l'utilisation de solutions de Giemsa et de tampon de bonne qualité, de méthodes de confection des étalements de sang et de coloration conformes aux recommandations, de microscopes de qualité suffisante et bien entretenus, et de méthodes de lecture des GE et FS conformes aux exigences. Les documents de l'OMS cités en référence bibliographique doivent être utilisés pour mettre sur pied le système qualité nécessaire.

Des contrôles doivent aussi être réalisés pour assurer cette qualité.


5.5.1 Contrôle de qualité de la coloration à l'aide de lames témoins.

Pour vérifier que les mêmes résultats sont obtenus avec chaque lot de colorant et de tampon, un étalement de sang (GE ou FS) témoin positif est coloré et examiné à chaque changement de lot de solutions de travail. Ces étalements de sang témoins peuvent être préparés en grande

7/13



Cette oeuvre, création, site ou texte est sous licence Creative Commons Attribution - Partage dans les Mêmes Conditions 4.0 International. Pour accéder à une copie de cette licence, merci de vous rendre à l'adresse suivante <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/> ou envoyez un courrier à Creative Commons, 444 Castro Street, Suite 900, Mountain View, California, 94041, USA.

	Procédure Opératoire Standard n°11	DIAG-MICROSCOP
Détection des infections plasmodiales par microscopie <i>Detection of Plasmodium infection by microscopy</i>		Version : 6
		Date : 01/11/2017

série à partir du sang d'un malade et conservées (à température ambiante ou congelées à -70°C) pour leur utilisation future.

5.5.2 Contrôle de qualité de l'examen microscopique et du dénombrement de plasmodiums

Pour chaque lot de GE (ou FS), au moins 10% des lames tirées au sort sont relues par un deuxième microscopiste indépendamment de la lecture du premier microscopiste et des résultats qu'il a obtenu.


Le taux de discordance de détection des infections plasmodiales est calculé pour l'ensemble des lames lues par les deux microscopistes et pour chaque paramètre (présence/absence des formes asexuées et des formes sexuées de chacune des espèces plasmodiales endémiques) par la formule : Discordance (exprimé en %) = [(nombre de résultats discordants positif/négatif) / (nombre total de lames lues)] x 100

Pour chaque lame lue par les deux microscopistes, l'écart entre les densités parasitaires estimées par chaque microscopiste est calculé par la formule : Ecart (exprimé en %) = (différence de densité parasitaire entre les deux lectures / moyenne arithmétique des deux densités parasitaires) x 100. La moyenne et la distribution de ces écarts (médiane, minimum, maximum, Q25 et Q75) sont calculées.

Si le taux de discordance ou l'écart de densité parasitaire moyen dépasse 10%, le lot de lames est relu.

NB : Une approche de type « Lot Quality Assurance Sampling » avec un taux d'erreur maximum inférieur à 2% peut être utilisé.




	Procédure Opératoire Standard n°11	DIAG-MICROSCOP
Détection des infections plasmodiales par microscopie <i>Detection of Plasmodium infection by microscopy</i>		Version : 6
		Date : 01/11/2017

6. Références

1. OMS. Techniques de bases pour le diagnostic microscopique du paludisme – Partie I: Guide du stagiaire. 2e édition ; OMS, Genève, 2015.
2. OMS. Techniques de base pour le diagnostic microscopique du paludisme – Partie II: Guide de l'instructeur. 2e édition ; OMS, Genève, 2015.
3. OMS. Diagnostic microscopique du paludisme: manuel d'assurance qualité – Ver. 2 ; OMS, Genève, 2017.
4. OMS. Accès universel aux tests diagnostiques du paludisme. Manuel pratique. OMS, Genève, 2012 (rév. février 2013)



	Procédure Opératoire Standard n°11	DIAG-MICROSCOP
Détection des infections plasmodiales par microscopie <i>Detection of Plasmodium infection by microscopy</i>		Version : 6
		Date : 01/11/2017

Annexe 1 : Dilution du Giemsa

MATERIEL

- Eau minérale (pH = 7 - 7,2)
- Eprouvette graduée
- Pipette

REACTIF : Giemsa

RESPONSABILITES

La dilution du Giemsa est de la responsabilité des techniciens de laboratoire.

PRECAUTIONS

- Toujours utiliser une eau de coloration dont le pH est proche de la neutralité (7 - 7,2)
- Filtrer le Giemsa avant son utilisation

MODE OPÉRATOIRE

- La solution de Giemsa doit être diluée à **6%**
- La dilution du Giemsa pur doit se faire avec de l'eau dont le pH est compris entre **7,0** et **7,2**

Exemple de dilution

Pour un volume total de 50ml : 3ml de Giemsa et compléter à 50ml avec de l'eau


Pour un volume total de 100ml : 6ml de Giemsa et compléter à 100ml avec de l'eau

Pour un volume total de 250ml : 15ml de Giemsa et compléter à 250ml avec de l'eau

Pour un volume total de 500ml : 30ml de Giemsa et compléter à 500ml avec de l'eau

Pour un volume total de 1000ml : 60ml de Giemsa et compléter à 1000ml avec de l'eau



	Procédure Opératoire Standard n°11	DIAG-MICROSCOP
Détection des infections plasmodiales par microscopie <i>Detection of Plasmodium infection by microscopy</i>		Version : 6
		Date : 01/11/2017

Annexe 2 : Entretien du microscope

Objectif

S'assurer que les microscopes sont utilisés correctement et que les procédures de maintenance et de nettoyage sont bien suivies.

Responsabilité

Tout le personnel du laboratoire impliqué dans la POS DIAG-MICROSCOP

Matériel

- Couverture en plastique
- Flacon compte-gouttes
- Lame porte objet
- Papier absorbant
- Huile à immersion

Procédure d'installation du microscope

1. Placer le microscope sur une paillasse bien stable, exempte de vibrations. En raison des grossissements élevés qui sont utilisés, le moindre mouvement de la paillasse peut provoquer un déplacement de l'image observée par l'opérateur.
2. Placer le microscope dans une position telle que l'opérateur ait toute la place voulue pour ses jambes sous la paillasse.
3. Ne pas disposer le microscope face à une fenêtre très éclairée. Le placer devant un mur ou une fenêtre voilée.


Réglage du microscope :

1. Pour un réglage optimal de l'optique et l'usage général de l'instrument, se conformer aux indications données par le fabricant.
2. Régler l'ouverture du diaphragme à iris à la valeur recommandée par le fabricant pour obtenir la profondeur de champ maximum.
Si le fabricant a prévu une échelle de réglage du diaphragme à iris sur le condenseur, régler l'ouverture du diaphragme sur celle de l'objectif 100x à immersion.

Si il est possible d'enlever les oculaires du microscope, procéder comme suit :

- Remonter complètement le condenseur
- Régler la lampe sur « intensité faible »
- Mettre en place l'objectif x40
- Fermer le diaphragme à iris



	Procédure Opératoire Standard n°11	DIAG-MICROSCOP
Détection des infections plasmodiales par microscopie <i>Detection of Plasmodium infection by microscopy</i>		Version : 6
		Date : 01/11/2017

- Retirer un oculaire
- Regarder dans le tube puis régler le condenseur jusqu'à ce que le bord du diaphragme soit parfaitement au point sans montrer d'anneau périphérique en vert ou en rouge
- Ouvrir le diaphragme jusqu'à ce que la lumière remplisse complètement l'objectif
- La partie éclairée a généralement une forme octogonale;
- lorsque les sommets de l'octogone touchent le contour externe de l'objectif, ouvrir le diaphragme jusqu'à ce que la partie éclairée prenne une forme circulaire; remettre l'oculaire en place.

Utilisation du microscope


- Allumer le microscope par un bouton ON/OFF ou un potentiomètre qui permet d'augmenter ou de diminuer la lumière
- Ouvrir le diaphragme pour laisser passer la lumière
- Poser la lame sur la platine du microscope
- Déposer une goutte d'huile à immersion sur l'étalement de sang coloré
- Monter le condensateur au maximum (pour avoir plus de lumière)
- Placer l'objectif x100 à immersion (lecture avec huile à immersion)
- Régler les oculaires sur l'écart des yeux de l'opérateur
- Avec la vis macroscopique, faire descendre l'objectif x100 jusqu'à toucher l'huile à immersion (surveiller la descente en regardant la lame)
- Laisser la vis macroscopique et continuer avec la vis microscopique mais, cette fois ci en regardant dans les oculaires pour régler la netteté de l'image
- Commencer l'examen et le comptage
- Après examen, abaisser la platine ou de balancer l'objectif de plus faible puissance en position avant d'enlever la lame. Ne jamais retirer la lame lorsque les objectifs sont au contact de la lame pour ne pas rayer les verres.
- Essuyer toute huile à l'aide d'un morceau de gaze de coton non pelucheux libre trempé dans une solution de nettoyage pour lentilles (80/20 solution de l'éther éthylique). Nettoyez avec un tissu pour verre.
- Eteindre le microscope, se déconnecter de la source d'alimentation et le couvrir pour protéger de la poussière.

Entretien et nettoyage du microscope

Quotidien

1. Suivez toujours les instructions du fabricant avec précautions.



	Procédure Opératoire Standard n°11	DIAG-MICROSCOP
Détection des infections plasmodiales par microscopie <i>Detection of Plasmodium infection by microscopy</i>		Version : 6
		Date : 01/11/2017

2. Nettoyez les lentilles avec du papier optique et non un chiffon ou de papier ordinaire. Utiliser une solution de nettoyage de lentille (80/20 une solution de l'éther éthylique) et ne pas utiliser le xylène, l'alcool ou l'acétone ; ceux-ci peuvent dissoudre le ciment de maintien des lentilles.
3. Pour le retrait de forte contamination de la surface de l'instrument, utilisez une solution de savon doux – ne jamais utiliser de l'acétone.
4. A la fin de chaque journée, débranchez la source d'alimentation en éteignant la prise murale et retirer la fiche ou déconnecter les bornes de la batterie.
5. Couvrir l'appareil après utilisation.
6. Pour protéger contre les champignons dans les climats humides, placer le microscope dans une petite armoire ou un placard qui est chauffé en permanence par le bas par une ampoule à faible consommation. Ne pas stocker le microscope dans son étui ou sous une hotte en plastique dans les climats humides.
7. Protégez le microscope contre les surtensions en utilisant un stabilisateur de tension.
8. Remplacez les ampoules défectueuses, en suivant les instructions du fabricant.
9. Si l'équipement est défectueux, consulter un ingénieur biomédical qualifié.
10. Tous les microscopes dans le laboratoire doivent être soumis au nettoyage de routine et check up tous les jours : à tracer/suivre sur un tableau d'entretien quotidien du microscope.

Hebdomadaire

- Nettoyer la surface du microscope, de la platine, et le condensateur avec du linge doux
- Nettoyer les oculaires et les lentilles (cf. ci-dessus)
- Remplir la fiche d'entretien du microscope et signer

Dépannage

En cas de panne, se référer au fournisseur/fabricant du microscope ou au service responsable de l'entretien des équipements de laboratoire (si disponible)

