

# INACTIVATION DU VIRUS EBOLA LORS DE LA COLORATION DES ÉTALEMENTS DE SANG AVEC LE GIEMSA

## DIAGNOSTIC MICROSCOPIQUE DU PALUDISME MODES OPÉRATOIRES NORMALISÉS – DMP-MON-07B

### 1. OBJECTIF ET CHAMP D'ACTION

Fournir une description détaillée de la procédure à suivre pour une coloration correcte des étalements de sang au Giemsa, avec une inactivation des virus de fièvres hémorragiques (par exemple Ebola), afin d'éviter les infections acquises au travail.

Cette procédure ne peut être modifiée qu'avec l'approbation du coordonnateur national pour l'assurance de la qualité du diagnostic microscopique du paludisme. Toutes les procédures exposées ici sont obligatoires pour tous les techniciens de la microscopie travaillant dans les laboratoires nationaux de référence, dans les laboratoires des hôpitaux ou dans les laboratoires médicaux de base au sein des établissements sanitaires où sont effectués des examens microscopiques pour le diagnostic du paludisme.

### 2. HISTORIQUE

Le personnel de laboratoire qui manipule des échantillons sanguins provenant de patients ayant pu être exposés au virus Ebola devrait partir du principe que les échantillons sont contaminés et devrait se conformer aux consignes de sécurité recommandées pour la manipulation de tels échantillons.

En l'état actuel des connaissances, le virus Ebola peut survivre durant 48 heures sur un étalement de sang séché. La modification de la procédure de coloration au Giemsa décrite dans ce document vous permet de manipuler en toute sécurité des échantillons sanguins contaminés par le virus Ebola, tout en permettant une coloration de qualité des parasites du paludisme.

### 3. FOURNITURES, MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS

- Du colorant de Giemsa (solution à 3 %) (Voir DMP-MON-04 : Préparation d'une solution de travail Giemsa).
- Du Triton X-100 à 5 %.
- Un petit récipient pour le colorant de travail Giemsa.
- Du méthanol absolu et sans acétone.
- Des pots de coloration.
- Une minuterie.
- Une pipette en plastique.
- Un égouttoir (ou râtelier) en bois pour le séchage des lames.
- Des gants de protection en latex (sans talc) jetables.
- Une blouse de laboratoire.
- Des lunettes de protection.
- Une enceinte de sécurité biologique de classe II, si disponible, ou un isolateur.

#### 4. CONSIGNES DE SÉCURITÉ

1. Observez les précautions universelles. Voir DMP-MON 11 : Procédures générales de sécurité dans le laboratoire de diagnostic microscopique du paludisme.
2. Utilisez des équipements de protection individuelle adéquats, notamment des gants, des lunettes de protection et une blouse de laboratoire. Voir la liste des références pour de plus amples informations.
3. Ne prélevez pas d'échantillon sanguin au bout du doigt pour le diagnostic du paludisme. Du sang total veineux doit être prélevé pour constituer les échantillons et les spécimens des tubes contenant de l'EDTA.
4. Les étalements de sang doivent être préparés au laboratoire dans une enceinte de sécurité biologique de classe II ou un isolateur.
5. Les gouttes épaisses et les frottis doivent être déposés sur des lames distinctes. Évitez la production d'aérosol au cours de leur préparation.
6. Laissez les étalements sécher complètement avant de les retirer de l'enceinte de sécurité biologique.
7. Placez tous les équipements contaminés dans un bac pour qu'ils soient autoclavés ou dans une solution d'hypochlorite de sodium à 10 % (javel) pendant au moins cinq minutes.

#### 5. PROCÉDURE

SCHEMA	DESCRIPTION DE L'ACTIVITÉ															
<p data-bbox="164 949 579 1070">1. Préparez une solution de Triton X-100 à 5 %.</p> <p data-bbox="363 1093 379 1122">↓</p> <p data-bbox="164 1137 579 1375">2. Préparez deux pots de colorant de travail Giemsa à 3 %, ajoutez le Triton X-100 à 5 % et remuez. Étiquetez les pots en inscrivant les mentions « frottis minces » et « gouttes épaisses ».</p> <p data-bbox="363 1397 379 1426">↓</p> <p data-bbox="164 1442 579 1621">3. Fixez le frottis pendant 15 minutes dans un pot avec du méthanol absolu et laissez sécher. Ne fixez <b>pas</b> les gouttes épaisses.</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Préparez une solution de Triton X-100 à 5% avec : de l'eau déionisée (chauffée à 56°C) = 95,0 ml Triton X-100 = 5,0 ml Afin de dissoudre plus facilement le Triton X-100, qui est visqueux, préchauffez l'eau déionisée et ajoutez peu à peu le Triton X-100 en faisant tourner le récipient pour mélanger. Ne pas agiter.</li> <li>2. Préparez deux pots de colorant de Giemsa à 3 % et étiquetez-en un pour les frottis et l'autre pour les gouttes épaisses. Ajoutez les volumes de Triton X-100 à 5 % indiqués dans le tableau cidessous. Une solution de travail Giemsa doit être préparée pour chaque lot de frottis.</li> </ol> <table border="1" data-bbox="643 1301 1417 1697"> <thead> <tr> <th>Réactif</th> <th>Goutte épaisse</th> <th>frottis mince</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Eau tamponnée de Giemsa (voir DMP MON 03a et DMP MON 03b)</td> <td>40,0 ml</td> <td>40,0 ml</td> </tr> <tr> <td>Triton X-100 à 5 %</td> <td>2,0 ml</td> <td>Deux gouttes à l'aide d'une pipette de 1 ml</td> </tr> <tr> <td>Solution mère de Giemsa (voir DMP MON 02)</td> <td>1,2 ml</td> <td>1,2 ml</td> </tr> <tr> <td>Durée de coloration</td> <td>45 à 60 min</td> <td>45 à 60 min</td> </tr> </tbody> </table> <p data-bbox="643 1727 1299 1756"><b>Méthode de coloration pour les échantillons sanguins</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>3. <b>Fixez les frottis minces</b> dans un pot de méthanol absolu pendant 15 minutes pour inactiver le virus Ebola. Laissez sécher. <b>Ne fixez pas les gouttes épaisses.</b> Laissez-les sécher complètement avant la coloration. Protégez-les de la saleté, des insectes, de la chaleur et des émanations du méthanol absolu.</li> </ol>	Réactif	Goutte épaisse	frottis mince	Eau tamponnée de Giemsa (voir DMP MON 03a et DMP MON 03b)	40,0 ml	40,0 ml	Triton X-100 à 5 %	2,0 ml	Deux gouttes à l'aide d'une pipette de 1 ml	Solution mère de Giemsa (voir DMP MON 02)	1,2 ml	1,2 ml	Durée de coloration	45 à 60 min	45 à 60 min
Réactif	Goutte épaisse	frottis mince														
Eau tamponnée de Giemsa (voir DMP MON 03a et DMP MON 03b)	40,0 ml	40,0 ml														
Triton X-100 à 5 %	2,0 ml	Deux gouttes à l'aide d'une pipette de 1 ml														
Solution mère de Giemsa (voir DMP MON 02)	1,2 ml	1,2 ml														
Durée de coloration	45 à 60 min	45 à 60 min														

SCHEMA	DESCRIPTION DE L'ACTIVITE
<p style="text-align: center;">↓</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 5px;"> <p>4.1. Versez 40 à 50 ml de colorant de Giemsa dans de l'eau tamponnée contenue dans un troisième pot de coloration, ajoutez deux gouttes de Triton X-100 et remuez.</p> </div>	<p><b>4. Méthode de coloration</b></p> <p>4.1. Versez 40 à 50 ml d'eau tamponnée à pH 7,2 dans un troisième pot de coloration. Ajoutez deux gouttes de Triton X-100 et remuez. Utilisez cette solution pour rincer les frottis et les gouttes épaisses.</p>
<p style="text-align: center;">↓</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 5px;"> <p>4.2. Laissez les frottis minces fixés et les gouttes épaisses non fixées pendant 45 minutes dans les pots de colorant de Giemsa portant respectivement l'étiquette « frottis minces » et « gouttes épaisses ».</p> </div>	<p>4.2. Placez les frottis minces fixés et les gouttes épaisses non fixées pendant 45 minutes dans les pots de colorant portant respectivement l'étiquette « frottis minces » et « gouttes épaisses ».</p>
<p style="text-align: center;">↓</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 5px;"> <p>4.3. Retirez chaque lame une à une et épongez-les rapidement dans du papier absorbant.</p> </div>	<p>4.3. À la fin du temps de coloration, retirez chaque lame une à une et épongez-les rapidement dans du papier absorbant.</p>
<p style="text-align: center;">↓</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 5px;"> <p>4.4. Rincez chaque frottis en les trempant à trois ou quatre reprises dans la solution de colorant de Giemsa dans l'eau tamponnée du troisième pot.</p> </div>	<p>4.4. Rincez chaque frottis en les trempant à trois ou quatre reprises dans l'eau tamponnée du troisième pot.</p>
<p style="text-align: center;">↓</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 5px;"> <p>4.5. Placez chaque lame comportant une goutte épaisse dans le colorant de Giemsa tamponné pendant 5 minutes, laissez sécher à la verticale sur un râtelier et observez la lame à 100x.</p> </div>	<p>4.5. Placez chaque goutte épaisse dans l'eau tamponnée pendant 5 minutes.</p>
<p style="text-align: center;">↓</p> <div style="border: 1px solid black; border-radius: 50%; padding: 10px; margin: 5px; width: fit-content; margin-left: auto; margin-right: auto;"> <p>4.6. Jetez la solution de Giemsa à 3 % restante.</p> </div>	<p>4.6. Laissez les frottis sécher verticalement dans un râtelier. Une fois la phase de séchage terminée, vous pouvez examiner les frottis colorés ; voir DMP-MON 08 : Examen microscopique des frottis et des gouttes épaisses pour l'identification de parasites du paludisme.</p> <p>4.7. Jetez la solution de Giemsa à 3 % restante. Voir DMP-MON 13 : Gestion des déchets issus de tests de diagnostic du paludisme.</p>

## 6. REMARQUES

Les frottis et les gouttes épaisses devraient être colorés séparément car il faut utiliser des volumes différents de réactif Triton X-100 à 5 %. Une exposition de 45 minutes à des concentrations élevées de Triton X-100, tel qu'indiquée ci-dessus, est indispensable pour inactiver le virus Ebola. Les frottis minces doivent être exposés à du méthanol absolu pendant au moins 15 minutes pour inactiver le virus Ebola.

## 7. MODES OPÉRATOIRES NORMALISÉS CONNEXES

DMP-MON-3a : Préparation d'eau tamponnée à pH 7,2

DMP-MON-03b : Préparation d'eau tamponnée à pH 7,2 à partir de comprimés tampons

DMP-MON-04 : Préparation d'une solution de travail Giemsa

DMP-MON-08 : Examen microscopique des frottis et des gouttes épaisses pour l'identification de parasites du paludisme

DMP-MON-11 : Procédures générales de sécurité dans le laboratoire de diagnostic microscopique du paludisme

DMP-MON-13 : Gestion des déchets issus de tests de diagnostic du paludisme

## 8. RÉFÉRENCES

Centers for Disease Control and Prevention. Guidance for malaria diagnosis in patients suspected of Ebola infection in the United States. Atlanta. Georgia; 2014.

WHO. Infection prevention and control (IPC) guidance summary. Geneva; 2014.

WHO. Personal protective equipment in the context of filovirus disease outbreak response. Geneva; 2014.

## 9. HISTORIQUE DU DOCUMENT

<b>Date (mois/année)</b>	<b>Version</b>	<b>Commentaires</b>	<b>Personne responsable (Nom, prénom)</b>
Janvier 2016	1	Examiné et finalisé par des experts, édité et mis en page	Gonzales, Glenda Fonctionnaire technique, WPRO