

NUMÉRATION DES PARASITES

DIAGNOSTIC MICROSCOPIQUE DU PALUDISME MODES OPÉRATOIRES NORMALISÉS – DMP-MON-09

1. OBJECTIF ET CHAMP D'ACTION

Fournir une description détaillée de la procédure à suivre pour compter le nombre de parasites du paludisme sur les frottis minces et les gouttes épaisses.

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

La densité parasitaire nous renseigne sur la gravité de l'infection et sur la façon dont celle-ci réagit au traitement. Les numérations sont effectuées pour les formes asexuées de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*. Sauf indication contraire dans le protocole, on ne compte pas les gamétocytes, même si leur présence est toujours signalée. Toutes les espèces parasitaires identifiées devraient être notifiées, même si elles sont comptées ensemble.

La plupart du temps, on procède à la numération des parasites sur les gouttes épaisses. S'il n'y a pas de goutte épaisse ou qu'elle est endommagée, on peut dénombrer les parasites sur le frottis mince. Les parasites sont également comptés sur le frottis mince si le nombre de parasites est > 100 dans chaque champ de la goutte épaisse, ce qui correspond à $> 80\,000$ parasites/ μl .

3. FOURNITURES, MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS

- Un microscope composé, équipé d'une paire d'oculaires 10x ; des objectifs 10x, 40x et 100x et une platine mobile (un marqueur à objectif, ainsi qu'un objectif 60x peuvent être montés le cas échéant).
- Un compteur manuel multiple ou un compteur manuel à deux touches, une pour les parasites et l'autre pour les leucocytes.
- Les étalements de sang colorés au Giemsa que vous devez examiner.
- De l'huile à immersion de type A d'excellente qualité.
- Du papier pour objectif.
- Un stylo et un crayon.
- Une calculatrice de poche.

4. PROCÉDURE

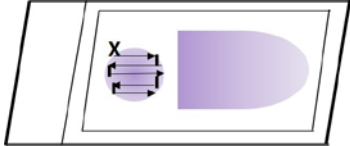
SCHÉMA	DESCRIPTION DE L'ACTIVITÉ
<p>4.1. Numération des parasites sur une goutte épaisse et calcul de la densité parasitaire</p> <p>1. Placez la lame en verre sur le microscope, étiquette du côté gauche.</p> <p>2. Déterminez la présence de parasites du paludisme, leur espèce et leur stade, et enregistrez vos informations (voir DMP-MON 6b et DMP-MON 08).</p> <p>3. En commençant par la partie supérieure gauche du frottis, cherchez un champ typique contenant des parasites et des leucocytes. Commencez à compter.</p> <p>4. Appuyez sur la touche correspondante du compteur manuel à chaque fois que vous observez un parasite ou un leucocyte.</p> <p>5. Après avoir dénombré tous les parasites et tous les leucocytes dans un champ, passez au champ suivant, répétez la procédure de numération, et ainsi de suite.</p>	<p>4.1. Numération des parasites sur une goutte épaisse et calcul de la densité parasitaire</p> <p><i>Note : Avant de commencer à compter, examinez 100 champs sur la goutte épaisse pour détecter la présence de parasites à l'objectif à immersion 100x.</i></p> <ol style="list-style-type: none"> Placez la lame en verre sur le microscope, étiquette du côté gauche. Cela permet d'adopter une approche normalisée pour le point de départ du décompte et d'enregistrer les emplacements des parasites en utilisant les divisions marquées du porte-lame. Si vous détectez des parasites du paludisme (voir DMP-MON-08 : Examen microscopique des frottis et des gouttes épaisses pour l'identification de parasites du paludisme), comptez les formes asexuées (dans des cas d'infections mixtes ou unique) sans les stades sexués (gamétocytes), que l'on ne comptabilise pas mais que l'on signale. Dans les cas d'infections mixtes, tous les parasites dans leur forme asexuée sont comptés ensemble et on signale la présence de différentes espèces (voir DMP-MON 6a : Enregistrement et notification des résultats de l'examen microscopique). En commençant tout en haut de l'étalement, cherchez un champ présentant un regroupement de leucocytes de bonne taille et commencez à les dénombrer. En utilisant un compteur manuel multiple, comptez les parasites et les leucocytes en même temps en appuyant sur la touche correspondante à mesure que vous observez des parasites ou des leucocytes. Si vous utilisez deux compteurs manuels, utilisez le premier pour la numération des leucocytes et l'autre pour celle des parasites. Après avoir dénombré tous les parasites et tous les leucocytes dans un champ, passez au champ suivant en suivant le cheminement illustré sur la Figure 1 et répétez la procédure de numération, et ainsi de suite. Veillez à ce qu'il n'y ait pas de chevauchement entre les champs. <p>Figure 1. Cheminement pour le décompte des parasites et des leucocytes</p> 

SCHÉMA	DESCRIPTION DE L'ACTIVITÉ
<p>6. Selon le nombre de parasites observés, arrêtez de compter après avoir examiné 200 ou 500 leucocytes.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Si, après avoir compté 200 leucocytes, vous avez trouvé 100 parasites ou plus, arrêtez de compter et enregistrez le résultat sous la forme du nombre de parasites pour 200 leucocytes. • Si, après avoir compté 500 leucocytes, vous avez obtenu 99 parasites ou moins, arrêtez de compter et enregistrez le résultat sous la forme du nombre de parasites pour 500 leucocytes. <p style="text-align: center;">↓</p> <p>7. Comptez tous les parasites et les leucocytes présents dans le dernier champ.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>8. Enregistrez le nombre réel de parasites et de leucocytes que vous avez comptés.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>9. Calculez la densité parasitaire :</p> $\text{Parasites / } \mu\text{l de sang} = \frac{\text{Nombre de parasites comptés} \times 8000 \text{ leucocytes}/\mu\text{l}}{\text{Nombre de leucocytes comptés}}$	<p>6. Décidez quand vous devez arrêter de compter en respectant les règles suivantes :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Si, après avoir compté 200 leucocytes, vous avez trouvé 100 parasites ou plus, arrêtez de compter et enregistrez le résultat sous la forme du nombre de parasites pour 200 leucocytes. • Si, après avoir compté 500 leucocytes, vous avez obtenu 99 parasites ou moins, arrêtez de compter et enregistrez le résultat sous la forme du nombre de parasites pour 500 leucocytes. <p>7. Comptez tous les parasites et les leucocytes présents dans le dernier champ, même si le nombre de leucocytes est supérieur à 200 ou 500.</p> <p>8. Enregistrez sur une feuille de calcul adaptée le nombre réel de parasites et de leucocytes que vous avez comptés.</p> <p>9. Lorsque vous avez terminé de compter, calculez la densité parasitaire sur la base de la véritable numération leucocytaire du patient. Si celle-ci n'est pas disponible, utilisez une moyenne de 8000 leucocytes/μl.</p> <p>Effectuez vos calculs à l'aide de la formule suivante :</p> $\text{Parasites / } \mu\text{l de sang} = \frac{\text{Nombre de parasites comptés} \times 8000 \text{ leucocytes}/\mu\text{l}}{\text{Nombre de leucocytes comptés}}$

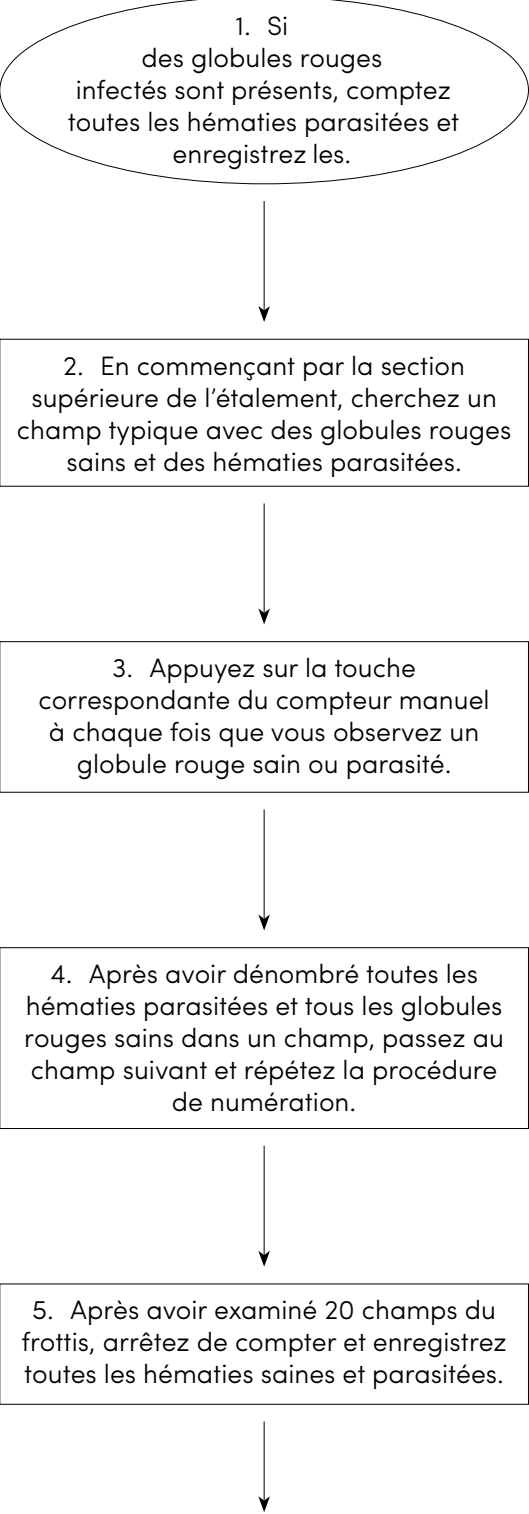
SCHÉMA	DESCRIPTION DE L'ACTIVITÉ
<p data-bbox="204 275 675 365">4.2. Numération des parasites sur une goutte épaisse et calcul de la densité parasitaire</p>  <pre> graph TD A([1. Si des globules rouges infectés sont présents, comptez toutes les hématies parasitées et enregistrez les.]) --> B[2. En commençant par la section supérieure de l'étalement, cherchez un champ typique avec des globules rouges sains et des hématies parasitées.] B --> C[3. Appuyez sur la touche correspondante du compteur manuel à chaque fois que vous observez un globule rouge sain ou parasité.] C --> D[4. Après avoir dénombré toutes les hématies parasitées et tous les globules rouges sains dans un champ, passez au champ suivant et répétez la procédure de numération.] D --> E[5. Après avoir examiné 20 champs du frottis, arrêtez de compter et enregistrez toutes les hématies saines et parasitées.] </pre>	<p data-bbox="775 275 1426 336">4.2. Numération des parasites sur un frottis mince et calcul de la densité parasitaire</p> <p data-bbox="815 347 1426 470"><i>Note : si 100 parasites ou plus sont présents dans chaque champ de la goutte épaisse sous l'objectif 100x, calculez la densité parasitaire sur le frottis mince.</i></p> <ol data-bbox="775 492 1426 1910" style="list-style-type: none"> 1. Si des globules rouges infectés sont présents, comptez toutes les hématies parasitées. Si vous observez des formes sexuées (gamétocytes), ne les comptez pas mais signalez-les. Dans les cas d'infections mixtes, toutes les hématies parasitées sont comptées ensemble et on signale la présence de multiples espèces de parasites. 2. Dans la section supérieure du frottis, trouvez un champ comportant environ 250 hématies. Comptez le nombre total d'hématies dans ce champ et le nombre d'hématies parasitées. Un champ typique (grossissement de 100x) devrait contenir environ 250 globules rouges. 3. En utilisant un compteur manuel multiple, comptez les hématies saines et parasitées en appuyant sur les touches correspondant aux globules parasités et non parasités. Si vous utilisez deux compteurs manuels, utilisez le premier pour la numération des hématies parasitées et l'autre pour les hématies non parasitées. 4. Après avoir dénombré tous les parasites et tous les leucocytes dans un champ, passez au champ suivant en suivant le cheminement illustré dans la Fig. 1 et répétez la procédure de numération, et ainsi de suite. Veillez à ce qu'il n'y ait pas de chevauchement entre les champs. Continuez de manière longitudinale, en couvrant peu à peu toute la surface de l'étalement. Comptez tous les globules rouges parasités et non parasités dans chaque champ, même si la numération totale des hématies par champ est supérieure à 250. 5. Arrêtez de compter lorsque vous avez compté environ 20 champs comportant 250 hématies (environ 5000 hématies au total). Enregistrez sur une feuille de calcul adaptée le nombre réel de globules rouges parasités et les autres globules rouges que vous avez comptés. Utilisez ces chiffres pour calculer la densité parasitaire totale par μl de sang.

SCHÉMA	DESCRIPTION DE L'ACTIVITÉ
<p data-bbox="209 302 663 488">6. Enregistrez le nombre total d'hématies parasitées et le nombre total d'hématies comptabilisées dans les 20 champs du frottis. Calculez la densité parasitaire à l'aide de la formule suivante:</p> $ \text{Parasites } /\mu\text{l} = \frac{\text{Nombre d'hématies parasitées} \times 5\,000\,000}{20 \text{ champs} \times 250 \text{ globules rouges}} $	<p data-bbox="778 275 1398 495">6. Lorsque vous avez terminé de compter, calculez la densité parasitaire sur la base de la véritable numération des hématies du patient. Si celle-ci n'est pas disponible, utilisez une moyenne de 5 000 000 hématies/μl, ainsi que la formule suivante. Veuillez noter que le résultat final doit être arrondi au nombre entier le plus proche.</p> <p data-bbox="815 528 1267 560">Nombre de parasites par μl de sang :</p> $ \text{Parasites } /\mu\text{l} = \frac{\text{Nombre d'hématies parasitées} \times 5\,000\,000}{20 \text{ champs} \times 250 \text{ globules rouges}} $

5. MODES OPÉRATOIRES NORMALISÉS CONNEXES

DMP-MON-06b : Enregistrement et notification des résultats de l'examen microscopique

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

6. RÉFÉRENCES

OMS. Planches pour le diagnostic microscopique du paludisme. Genève, 2010.

OMS. QA manual for malaria microscopy. 2nd Edition. Geneva; 2015.

WHO. Techniques de base pour le diagnostic microscopique du paludisme. – Partie I : Guide du stagiaire. Deuxième édition. Genève, 2010.

WHO. National malaria slide bank standard operating procedures. Geneva; 2015 (en cours).

7. HISTORIQUE DU DOCUMENT

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