

a 61450

WORLD HEALTH
ORGANIZATION

ORGANISATION MONDIALE
DE LA SANTÉ

WHO/Mal/232
13 juillet 1959

ORIGINAL : ANGLAIS

TECHNIQUE DE PRELEVEMENT DU SANG ET D'EXAMEN EN GOUTTE EPAISSE
POUR LA RECHERCHE DES PARASITES DU PALUDISME
(avec une modification de la technique de coloration J.S.B.)

par le

Dr S. Avery-Jones et Mlle L. Lowy
Equipe consultative de l'OMS pour l'éradication du paludisme, SEARO

L'article qui suit est inspiré par quelques années d'expérience des enquêtes consultatives sur le paludisme; il pourrait être utile à ceux qui ont pour la première fois à travailler sous leur propre responsabilité dans des endroits écartés. Il y a une grande différence entre la formation spéciale que l'on peut recevoir dans un laboratoire bien équipé et la pratique du travail dans un pays sous-développé où l'on vient souvent à manquer de fournitures et de matériel.

TECHNIQUE DE PRELEVEMENT DU SANG SUR LE TERRAIN

Avec le sang prélevé sur chaque sujet, on prépare normalement un frottis et une goutte épaisse sur la même lame. Pour économiser du temps et des efforts, il est très important que ces préparations soient exemptes d'artefacts et que la goutte épaisse soit convenablement prise.

Pour être sûr de ne pas avoir d'artefacts, il faut prélever le sang sur une peau propre et sèche, le déposer sur une lame propre, laisser sécher à l'abri de la poussière et des mouches, envelopper la lame avec soin et la colorer convenablement.

Il est facile de remplir ces conditions au laboratoire, mais ce l'est moins dans un village poussiéreux où les mouches pullulent et où l'opérateur travaille parfois assis par terre.

D'après notre expérience, les causes les plus courantes de la mauvaise qualité des préparations sont l'emploi de lames sales, la présence d'alcool sur la peau et la mise en contact de la lame avec une peau en transpiration.

Les lames doivent toujours être nettoyées dans un laboratoire central avant d'être expédiées pour le travail sur le terrain. Les détersifs ordinaires de ménage (mais non les savons) donnent d'excellents résultats. Une solution de détersif concentrée permet d'éliminer l'huile d'immersion des lames que l'on ne désire pas conserver. Nous utilisons un bac de bonne dimension, à moitié plein d'une eau contenant une cuillère à soupe de détersif. Après examen, on met dans ce bac toutes les lames dont on n'a pas besoin pour des démonstrations ou des contrôles. Le lendemain, les lames sont transférées une par une dans un deuxième bac contenant également un détersif et dans lequel on les laisse reposer pendant une journée. On les frotte ensuite légèrement puis on les rince à l'eau propre. On les essuie avec un linge fin et propre, on les enveloppe dans du papier mince par lots de dix ou vingt et on les replace dans leur boîte. Nous avons constaté que le papier hygiénique non absorbant convenait très bien pour envelopper les lames. Toutes les nouvelles lames doivent être lavées avec un détersif avant usage, même celles qui sont dites "pré-nettoyées".

S'il est nécessaire de conserver les lames pour des démonstrations, on peut enlever l'huile avec du xylène. Toutefois, on nous a livré plusieurs fois du xylène qui éliminait la coloration des frottis. Dans un cas, nous avons trouvé que l'essence d'automobile filtrée rendait alors d'excellents services car elle n'enlevait pas la coloration.

En faisant les prélèvements de sang, il est très important de tenir convenablement les enfants qui ont peur. Il faut tout d'abord s'occuper des enfants les plus âgés en présence des plus jeunes. Tout enfant de moins de six ans risque d'être effrayé par la prise de sang; aussi faut-il le mettre dans les bras d'un adulte, de préférence sa mère, le dos tourné vers l'opérateur et les bras passés autour du cou de l'adulte. On amène alors le bras gauche derrière le dos et on le tourne de façon que le pouce soit placé en haut. Cette position ne cause aucune gêne à l'enfant et, au cas où l'enfant résisterait, le bras ne risque pas de bouger si on le tient solidement.

Pour nettoyer la peau, nous utilisons deux tampons de coton hydrophile imprégnés d'alcool à 75 %. Le premier tampon sert à enlever la majeure partie de la saleté et le deuxième complète le nettoyage. On utilise ensuite deux tampons de coton hydrophile sec pour sécher la peau, en procédant chaque fois dans le même ordre parce que le premier tampon est rapidement mouillé par l'alcool déposé sur la peau. La saleté qui est profondément enfoncée dans la peau ne peut pas être entièrement éliminée mais il n'en résulte pas d'inconvénient dans la pratique.

Il est parfois commode de se faire aider par un assistant qui nettoie la peau d'un certain nombre d'enfants pendant qu'ils attendent leur tour. Dans ce cas, conserver à portée de la main un tampon de coton hydrophile sec pour essuyer la sueur qui apparaît rapidement sur la peau dans les pays chauds. Il est indispensable que la peau en transpiration ne soit pas touchée par la lame quand on fait le prélèvement de sang.

Il est extrêmement important d'éviter de causer toute douleur et toute crainte inutiles en piquant la peau, sinon les enfants se cachent ou se sauvent.

Nous avons souvent observé que des agents travaillant sur le terrain utilisaient des aiguilles à coudre ordinaires, des épingles ou de vieilles aiguilles hypodermiques dont la pointe était courbée. Il faut absolument s'efforcer de remplacer ces instruments par des aiguilles chirurgicales convenables, par exemple l'Hagedorn droite de deux pouces à bord coupant ou l'aiguille chirurgicale droite de deux pouces à pointe triangulaire. Avec ces aiguilles, il suffit d'enfoncer peu profondément pour obtenir une bonne goutte de sang sans grande douleur et l'on peut même prendre du sang à un bébé endormi sans le réveiller. Les aiguilles rondes pointues ont besoin d'être enfoncées profondément et il est souvent difficile d'obtenir avec elles une quantité de sang suffisante.

Nous supposons que les lecteurs de cet article sont familiarisés avec les prélèvements pour examen en goutte épaisse. L'important ici est que la goutte prélevée soit d'une épaisseur suffisante; on ne peut y parvenir qu'avec l'expérience et il faut que la majorité des champs contienne au moins 20 leucocytes. Nous prenons trois ou quatre petites gouttes de sang et les étalons avec le bord d'une

autre lame propre. Une goutte épaisse doit avoir environ 1 cm de diamètre. Si l'étalement épais est trop petit, il ne s'hémolysera pas bien et risquera de se détacher de la lame pendant la coloration.

Il est très important que le registre du laboratoire indique l'auteur de l'envoi de chaque lot de lames et qu'il contienne une colonne indiquant sur quelles lames des artefacts ont rendu l'examen difficile ou impossible. Faute de cela, on perdra beaucoup de temps inutilement à faire des prélèvements sur le terrain ainsi qu'au laboratoire. Si un inspecteur envoie de façon persistante de nombreuses lames pleines d'artefacts, il faut lui réapprendre la technique des prélèvements de sang et examiner sa trousse pour s'assurer qu'il possède le matériel nécessaire pour faire de bons frottis. Il faut lui montrer la différence entre une lame sale et une lame propre sous le microscope.

Une fois que le prélèvement de sang a été déposé sur la lame, il faut le laisser sécher à l'abri de la poussière et hors de portée des mouches, en posant la lame à plat de façon que le sang de la goutte épaisse ne coule pas tout d'un côté. Il faut avoir pour cela un plateau sur lequel on peut poser les lames goutte en bas pendant que le sang sèche. La figure 1 montre un modèle commode de plateau qui peut être fabriqué par n'importe quel menuisier. Il faut toujours laisser un écart entre deux lames voisines afin que l'air qui se trouve au-dessous des lames ne soit pas bientôt saturé d'humidité, ce qui gâte les frottis. Il faut emporter un certain nombre de plateaux. Si l'on est obligé de se déplacer alors que certaines lames sont encore humides, il faut empiler les plateaux en mettant un plateau vide sur le dessus et les attacher ensemble avec un élastique. Les garnitures en saillie à la partie inférieure de chaque plateau appuieront sur les lames du plateau inférieur et les empêcheront de se déplacer. Il ne faut pas que les plateaux soient peints ou cirés. L'avantage de ces plateaux par rapport aux boîtes de lames à fentes est qu'ils sont plus faciles à fabriquer, à manier, à mettre à plat et qu'ils ne peuvent pas se renverser.

Il ne faut pas laisser les gouttes épaisses exposées au soleil ou à de fortes températures ni les conserver pendant longtemps sinon on risquera d'avoir

des difficultés pour enlever l'hémoglobine. Si cela se produit, essayer de les tremper dans une solution d'acide acétique à 0,5 % pendant quelques minutes. Bien rincer avant de colorer.

Dans les climats chauds et humides, des moisissures poussent rapidement sur les gouttes épaisses. On peut prévenir cet inconvénient en trempant les lames pendant quelques minutes dans l'eau filtrée pour éliminer l'hémoglobine un jour ou deux après le prélèvement. Il ne faut pas que le frottis soit trempé et le mieux est de le fixer d'abord avec de l'alcool méthylique. On peut alors fixer la goutte épaisse privée d'hémoglobine avec de l'alcool méthylique une fois qu'elle est sèche, mais cela n'est pas indispensable.

Quand les lames sont sèches, il est important d'en essuyer le dos avec un linge propre pour les débarrasser de la poussière avant de les empiler par ordre de numéros et de les envelopper dans du papier mince sur lequel on écrira la date et le nom de l'endroit où l'on a fait les prélèvements.

Pour fixer les frottis, utiliser un petit récipient presque plein d'alcool méthylique absolu (méthanol) (en commandant celui-ci, bien préciser "exempt d'acétone"). Si l'on utilise un récipient profond, les vapeurs concentrées d'alcool à la partie supérieure risquent de fixer la goutte épaisse. Tremper rapidement et laisser sécher sur le porte-lames.

Il faut avoir à sa disposition une bouteille dans laquelle on versera l'alcool méthylique après usage. Il ne faut jamais le verser dans la bouteille initiale. L'alcool méthylique absorbe l'humidité de l'air et ne doit pas être exposé à l'air trop longtemps.

Le meilleur moyen pour étiqueter les lames est de se servir d'un crayon ordinaire en écrivant sur le frottis si l'on a pris sur la même lame un frottis et une goutte épaisse pour chaque sujet. Si l'on prélève seulement des gouttes épaisses, l'étiquetage ne peut pas être fait de la même manière; il faut se servir, dans ce cas, d'un crayon en cire avec lequel on écrira sur le verre, mais il faut se rappeler que les inscriptions au crayon en cire se détachent souvent quand on colore la lame. Avec un crayon à pointe de diamant on obtient une inscription

indélébile mais on ne peut plus réutiliser la lame. Le meilleur moyen est incontestablement d'employer des lames à bord dépoli qu'on trouve chez quelques fabricants mais qui sont plus chères que les lames ordinaires. Il est facile d'écrire au crayon sur le bord dépoli et d'effacer les marques quand on n'en a plus besoin. On peut se servir aussi d'encre de Chine; celle-ci ne se détache pas pendant la coloration mais elle sèche trop vite sur la plume. Parmi les erreurs fréquemment commises dans l'étiquetage des lames, il convient de noter en particulier : l'emploi d'une encre lavable ordinaire, le collage d'étiquettes en papier, l'emploi de petits morceaux de sparadrap et enfin (et peut-être surtout) l'oubli de l'étiquetage.

Matériel simple de campagne

Notre matériel pour les prises de sang est aussi simple que possible et comprend les éléments suivants :

Un sac léger et facile à porter qui contient le matériel. Nous avons constaté que les sacs de nuit fournis par les compagnies d'aviation conviennent très bien mais ils ont l'inconvénient de ne pas supporter pendant plus de quelques mois les rudes conditions de travail qu'on rencontre sur le terrain. Nous avons donc imaginé un sac spécial en cuir qui est représenté sur la figure 2. Les qualités que nous demandions à ce sac étaient les suivantes : a) être léger mais résistant et imperméable; b) être facile à porter à la main ou sur le porte-bagages ou le guidon d'une bicyclette; c) comprendre un compartiment spécial pour le transport des plateaux et de quelques médicaments; d) pouvoir être employé aussi bien par un inspecteur chargé de la surveillance que par un médecin chargé d'une enquête.

Si l'on doit porter le sac pendant longtemps sous une forte pluie, il faut bien imprégner le cuir d'un cirage au silicone.

Le contenu du sac est le suivant :

1. Deux boîtes à coton hydrophile; l'une d'entre elles est remplie de coton sec déchiré en petits morceaux de grosseur convenable. L'autre sert pour jeter les tampons sales. Nous avons constaté que les boîtes cylindriques de 50 cigarettes peuvent très bien être utilisées pour cela.

2. Deux flacons en polyéthylène à large ouverture d'environ 50 cm³. On remplit ces flacons de tampons de coton hydrophile sec, puis on verse dessus de l'alcool à 70 %. Sur le terrain, les tampons employés pour nettoyer la peau sont pris dans l'un de ces flacons et l'autre sert pour nettoyer l'aiguille. On nettoie l'aiguille en l'enfonçant une fois ou deux dans un tampon imprégné d'alcool. On peut employer des pots en verre du genre des pots pour crème de beauté, mais nous préférons les pots en polyéthylène parce qu'ils sont légers, incassables, étanches et surtout parce qu'ils ne gâtent pas la pointe de l'aiguille si celle-ci est appuyée accidentellement contre la paroi du pot.

3. Aiguilles. Nous préférons l'aiguille Hagedorn droite à bord coupant mais les aiguilles chirurgicales triangulaires pointues conviennent très bien aussi. Pour en faciliter le maniement, on peut enfoncer l'aiguille dans un bouchon ou la monter sur un crayon de bois. Dans ce cas, il faut insérer un petit fil de fer dans le chas de l'aiguille pour l'empêcher de tourner à l'intérieur de l'évidement du crayon.

4. Des plateaux porte-lames comme ceux de la figure 1. Le nombre dépend de la quantité de travail à faire. Un inspecteur de la surveillance qui ne fait des frottis que de temps en temps aura besoin de deux ou trois plateaux. Pour un médecin chargé d'une enquête, il en faudra environ cinq.

5. Des lames pour microscope bien enveloppées dans du papier pour les protéger de la poussière.

6. Un chiffon propre pour essuyer la poussière sur les lames. Ce point est très important car, pendant que les lames sèchent avec le prélèvement de sang sur la face inférieure, il peut arriver qu'une grande quantité de poussière se dépose sur le dos de la lame. Il faut donc essuyer la poussière avant de ranger les lames et les entourer de papier.

7. Un crayon à mine tendre. Nous nous en servons pour numéroter et dater les lames en écrivant directement sur le frottis; sinon, on peut employer un crayon à verre (en cire).

8. Des feuilles ou un cahier pour les observations.

9. Les médicaments nécessaires; ceux-ci sont habituellement, à l'heure actuelle, la chloroquine et la pyriméthamine.

10. Une petite bouteille en polyéthylène (50 à 100 cm³) et une cuillère à dessert. Cela permet de traiter facilement les jeunes enfants et autres personnes qui ont de la peine à avaler les comprimés. On verse dans la bouteille un nombre déterminé de cuillerées d'eau et l'on ajoute le même nombre de comprimés. Quand les comprimés se sont désagrégés, on peut considérer qu'une cuillerée contient un comprimé. Bien entendu, il faut toujours se servir de la même cuillère. Bien agiter la bouteille avant de verser la dose. Il est difficile de trouver des mesures normales de capacité dans les pays sous-développés et le moyen que nous indiquons a l'avantage de n'exiger aucune mesure, à condition d'employer toujours la même cuillère.

TECHNIQUE DE COLORATION DU SANG

Comme les gouttes épaisses que nous utilisons sont trop épaisses pour pouvoir être colorées convenablement avec la technique rapide J.S.B.¹ standard, l'un de nous (L.L.) lui a apporté la modification suivante : colorer l'échantillon tout d'abord dans une solution d'éosine très diluée (1/7500) pendant cinq à huit minutes, puis faire la coloration habituelle avec le J.S.B.I (bleu de méthylène polychrome). Ce système a pour avantage que la majeure partie de l'hémoglobine et des protéines du sang est entraînée par l'éosine, laquelle est rejetée lorsqu'on a coloré une cinquantaine de lames. Cela prolonge d'autant la durée du colorant J.S.B.I qui est plus coûteux et dont la préparation est plus longue.

On se sert de deux solutions : une solution d'éosine et le colorant J.S.B.

1. Eosine : on prépare une solution mère de 1 g d'éosine Y dans 100 cm³ d'eau et l'on ajoute deux gouttes (pas davantage) d'aldéhyde formique à 40 % pour empêcher la croissance de champignons.

¹ Voir la description complète de la technique originale dans : Jaswant Singh & Misra (1956) Indian J. mal., 10, 115.

Le jour de l'emploi, diluer 1 cm^3 de cette solution mère dans 74 cm^3 d'eau propre (= 1/7500) et filtrer avant l'emploi.

On utilise cette solution diluée pour colorer et en même temps éliminer l'hémoglobine de 50 gouttes épaisses, après quoi on la jette. De toute façon, la solution utilisée ne se garde pas d'un jour à l'autre.

Si le laboratoire reçoit de l'éosine à 0,2 % (J.S.B.II pour la méthode rapide originale), on peut diluer 5 cm^3 de celle-ci dans 70 cm^3 d'eau pour faire une solution au 1/7500.

2. La préparation du colorant J.S.B.I est la suivante :

Bleu de méthylène médicinal	0,5 g
Bichromate de potassium	0,5 g
Phosphate mono-acide de sodium, dihydraté	3,5 g

Ajouter le bleu de méthylène à 500 cm^3 d'eau dans un flacon.

Ajouter lentement $3,0 \text{ cm}^3$ d'acide sulfurique à 1 % en remuant constamment.

Ajouter le bichromate de potassium et le phosphate. Mélanger.

Faire bouillir pendant une heure ou davantage jusqu'à ce que la solution soit bleue et demeure bleue en refroidissant.

Après refroidissement, rajouter de l'eau pour rétablir le volume à 500 cm^3 .

Ce colorant peut être employé immédiatement et se conserve bien. On peut l'utiliser à plusieurs reprises, mais il faut le filtrer chaque jour avant l'emploi.

Il n'est pas nécessaire de distiller l'eau utilisée pour le rinçage et pour la dilution de la solution mère d'éosine, mais il faut que cette eau soit propre et sans aucun dépôt.

Il n'est pas nécessaire d'ajuster le pH de façon très précise. L'optimum se situe entre 5,5 et 6,5. L'Indicateur universel permet de faire une mesure suffisamment exacte; il faut que la couleur soit entre jaune et orange. Si l'eau est

alcaline, ajuster en ajoutant quelques gouttes d'acide acétique à 5 % ou une petite quantité de phosphate diacide de potassium. Il ne faut pas chercher à conserver une grande quantité d'eau tamponnée, car les moisissures et les organismes ciliés et flagellés prolifèrent rapidement sous les tropiques.

Technique de coloration

Les différentes étapes de la coloration sont les suivantes :

1. Le frottis ayant été fixé et l'alcool méthylique mis à sécher, plonger toute la lame, la goutte épaisse étant en bas, dans l'éosine au 1/7500 pendant cinq à huit minutes.
2. Egoutter soigneusement la lame. Colorer immédiatement ou au bout d'une heure avec le colorant J.S.B.I.
3. Colorer au J.S.B.I pendant 30 à 80 secondes. Seule l'expérience peut indiquer le temps optimum pour un lot de colorant. Il est en général de 45 secondes, mais il peut être nécessaire de colorer plus longtemps si le colorant a été employé souvent.
4. Rincer dans une eau de pH 5,5-6,5 (voir plus haut). Si le bleu J.S.B.I donne aux plaquettes une coloration trop foncée, laver plus longtemps ou acidifier l'eau. Au moment du rinçage, ne plonger le frottis qu'un instant, la goutte épaisse étant immergée pendant 5 à 10 secondes; à cet effet, plonger toute la lame dans l'eau et la relever rapidement, de façon que seule la goutte épaisse reste sous l'eau.

Aspect de la préparation colorée

Une préparation bien colorée ressemble à une lame colorée au Giemsa, mais le cytoplasme, en particulier dans les jeunes anneaux, est plutôt pâle.

Le fond sera rouge et fibreux si l'on colore la lame trop tôt après avoir fait le prélèvement; dans ce cas, les parasites et les leucocytes sont inutilement déformés. Dans les enquêtes, il faut laisser les lames reposer un ou deux jours avant de les colorer. D'autres raisons encore peuvent donner une lame

trop rouge : par exemple, si on la laisse trop longtemps dans l'éosine ou si l'on emploie une solution d'éosine trop forte. On peut laver l'excès d'éosine en maintenant la lame pendant quelque temps dans une eau légèrement alcaline (pH 8-10). L'excès de bleu apparaît particulièrement dans la coloration foncée des plaquettes qui distraie le regard lors de la recherche des parasites. On peut l'éliminer en faisant un nouveau lavage dans l'eau de rinçage acide.

Il faut souligner que les lots de colorants présentent toujours une certaine variation et que les différentes sortes d'eaux ont également tendance à modifier la coloration. C'est pourquoi, quand on utilise un nouveau lot de colorant ou une nouvelle eau, il ne faut jamais colorer d'un coup tout un lot de lames. Il faut d'abord colorer quelques lames une par une en modifiant les durées jusqu'à ce qu'on obtienne de bons résultats.

Filtrage

Pour obtenir des résultats régulièrement bons, il faut filtrer chaque jour avant l'emploi tous les colorants et l'eau de rinçage (à moins qu'elle ne soit très pure). Il n'est pas nécessaire que les entonnoirs de filtrage soient en verre. La plupart des ferblantiers vendent de petits entonnoirs en métal qu'on utilise pour remplir les lampes à pétrole, et l'on trouve aussi des entonnoirs en matière plastique destinés au même usage. Ces entonnoirs conviennent parfaitement pour le travail de laboratoire. Il faut employer des entonnoirs distincts pour l'éosine, l'eau et le J.S.B.I.

Nous préférons le papier-filtre Whatman N° 4 de 12,5 cm de diamètre qui est plus rapide que le N° 1. Si l'on ne dispose pas de papier-filtre, on peut le remplacer par un papier local apprêté, des mouchoirs de papier, du papier buvard, du papier hygiénique absorbant, etc. Si l'on utilise un papier-filtre improvisé, il faut d'abord faire une coloration d'épreuve pour s'assurer que le papier ne contient pas de produits chimiques risquant de troubler la coloration.

Il n'est pas nécessaire de changer le papier-filtre chaque jour; il suffit de le faire quand le filtrage ralentit ou que le papier commence à se déchirer.

Si l'on est obligé d'employer une eau très sale prise dans un cours d'eau ou un puits, il faut la filtrer sur du coton hydrophile avant de la passer à travers le papier-filtre.

Appareil simple de laboratoire

L'une des difficultés qui peuvent survenir est que les bacs de coloration en verre peuvent arriver cassés ou en nombre insuffisant ou sont trop petits pour le nombre de lames que l'on doit manipuler.

Nous avons imaginé un type de bac que l'on peut faire fabriquer pour très peu d'argent dans n'importe quel endroit où il y a un ferblantier, ainsi que des éléments-supports en bois que tout le monde peut faire facilement et sans grands frais avec une scie et un peu de contre-plaqué à trois épaisseurs.

La figure 3 montre le bac de coloration. Il est fait en tôle galvanisée mince et mesure 3 cm de large sur 10 de long et 7,5 de haut. Il faut veiller à ce que le ferblantier le fasse bien étanche et lui dire que le couvercle ne doit pas être ajusté. En effet, le couvercle ne sert qu'à tenir le bac à l'abri de la poussière et des mouches quand on ne l'utilise pas; s'il est ajusté (ce qui est la manie des ferblantiers), on répandra forcément du colorant quand on mettra ou enlèvera le couvercle.

La figure 4 montre les éléments-supports. Ils servent à tenir ensemble des lots de lames pour la coloration. C'est une modification de la technique courante consistant à interposer un rectangle de carton entre deux lames et à attacher des paquets de lames de cette manière avec des élastiques. Nous avons constaté que nos supports en bois étaient plus commodes parce qu'ils sont solides et, en outre, faciles à faire et à manier. On attache ensemble 11 supports avec des élastiques et l'on passe un clou de 12,5 cm à travers le trou des supports. Ce clou permet de saisir deux paquets de 11 éléments, soit 20 lames, nombre qui correspond au bac de coloration décrit ci-dessus.

Chaque élément-support est en contre-plaqué à trois épaisseurs et mesure 4,3 cm sur 2,5. Au croisement des diagonales, on perce un trou d'une dimension suffisante pour permettre le passage du clou. On taille des encoches sur le côté étroit pour y passer les élastiques. Le côté long qui se trouve près des encoches est biseauté à la lime sur les deux faces pour faciliter l'insertion des lames que l'on entre de force jusqu'à ce qu'elles rencontrent le clou.

Pour de petits lots de lames, on utilise trois bacs de coloration, un pour le bleu J.S.B., un pour l'éosine et un pour l'eau de lavage. Si l'on a à manipuler beaucoup de lames, on pourra augmenter le nombre de bacs d'éosine; par exemple pour 100 lames, si l'on emploie cinq bacs d'éosine pour la coloration par la technique modifiée décrite ci-dessus, cela ne prendra encore qu'une dizaine de minutes.

Pour faire égoutter ou sécher les lames, il n'est pas nécessaire de les ôter des supports car elles tiennent bien et il suffit de les placer debout sur la table, de préférence sur un chiffon propre destiné à absorber le liquide qui pourrait s'écouler.

Nous avons vu parfois des lames mises à sécher contre des morceaux de bois étalés sur toute une paillasse de laboratoire. Cela est parfaitement inutile et nous tenons à signaler l'existence d'un porte-lames très connu qu'on peut faire facilement et sans grande dépense. C'est un morceau de bois de 1,25 cm d'épaisseur et d'une longueur et d'une largeur convenables, avec des traits de scie parallèles distants d'environ 1,25 cm les uns des autres et coupés en travers du fil du bois. Les traits de scie doivent être faits à un angle d'environ 60° par rapport à la base et doivent avoir une profondeur d'environ 0,6 cm. Ils doivent être assez larges pour recevoir sans difficulté la lame la plus épaisse. On trouvera un modèle de ce porte-lames sur la figure 5. Cette pièce sert à poser les lames lorsqu'elles ont été plongées dans l'alcool méthylique pour fixer le frottis.

TECHNIQUE D'EXAMEN DU SANG

Il est très important, en particulier à la phase de surveillance de l'éradication du paludisme, de dépister de nombreuses infections à faible densité parasitaire. Or ce sera impossible si les gouttes épaisses sont trop minces; dans la plupart des pays où nous sommes allés, nous avons constaté que le personnel d'opérations prend des étalements qui sont extrêmement minces et tout à fait insuffisants pour qu'on puisse déceler les infections de très faible densité. Nous avons noté en outre qu'il y a de très grandes variations dans l'épaisseur des préparations faites par les différents travailleurs; cela peut aller jusqu'à un cinquième de l'épaisseur normale et il est courant de trouver des gouttes "épaisses" qu'on a de la peine à repérer sur la lame après coloration.

Comme il y a de grandes variations dans l'épaisseur des gouttes épaisses, l'indication de "100 champs examinés" ou "préparations examinées pendant 5 minutes" n'a pas grand sens pour le lecteur d'un rapport car il n'a aucune idée du volume de sang examiné. Il est évidemment nécessaire d'obtenir une certaine uniformité pour pouvoir comparer les indices parasitaires trouvés par des observateurs différents.

Quelle que soit la technique uniforme adoptée, elle doit permettre d'obtenir l'examen d'une aussi grande quantité de sang qu'il est techniquement possible de le faire sans que cela prenne trop de temps; d'autre part, elle doit être suffisamment simple pour pouvoir être appliquée par des travailleurs relativement inexpérimentés.

La première condition est évidemment que la goutte ait une épaisseur convenable. La meilleure définition est sans doute la suivante : "Une goutte épaisse dans laquelle, sauf aux bords, la majorité des champs contient au moins 20 leucocytes quand on l'examine avec un microscope binoculaire comportant un objectif à immersion de 1/12 et un oculaire de grossissement 5". Nous avons constaté qu'en pratique cette goutte épaisse est à peu près 50 fois plus épaisse qu'un frottis. En d'autres termes, s'il y a environ un parasite par champ dans la goutte épaisse, il faudra examiner en moyenne une cinquantaine de champs sur le frottis pour

trouver un parasite. Les gouttes de cette épaisseur peuvent être colorées au Giemsa et sont semblables à celles qui sont décrites dans les manuels, peut-être un peu plus épaisses toutefois que ne le préconisent certains auteurs.

Nous estimons qu'une bonne technique uniforme permettant de dépister les faibles densités parasitaires consiste à examiner 100 champs du type de goutte épaisse indiqué ci-dessus, mais que la définition du "champ" à compter doit être la suivante : "ne contenant pas moins de 20 leucocytes, bien colorés, sur un fond pâle mais non incolore". On examinera la goutte systématiquement d'un bord à l'autre, mais on ne retiendra dans le comptage de 100 que les champs qui contiennent moins de 20 leucocytes. On examinera quand même les champs plus minces parce qu'on trouve souvent près du bord des gamétocytes de P. falciparum et parfois de P. vivax.

Cet examen standard pourrait s'appeler un comptage de "2000 et au-delà" car il faut que la quantité minimum de sang examinée contienne au moins 2000 leucocytes. Si l'on suppose un nombre arbitraire de 8000 leucocytes par centimètre, on peut estimer à 0,25 cm le volume de sang examiné et calculer un indice de densité parasitaire approximatif semblable à celui qu'on utilise en Afrique occidentale.¹ Dans ce cas, le nombre moyen de leucocytes par champ examiné doit être aussi proche que possible de 20.

Nous avons constaté que le temps qu'il nous faut pour compter 100 champs dépasse rarement 4 minutes; si donc on estime opportun de fixer un temps normal de 5 minutes par lame, on aura examiné probablement un volume de sang suffisant à condition que les gouttes aient l'épaisseur indiquée plus haut. Il faudrait recommander aux microscopistes d'examiner les gouttes systématiquement d'un bord à l'autre, mais de ne pas tenir compte des zones mal colorées,

¹ Bruce-Chwatt, L. J. (1958) Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg., 52, 389

QUELQUES TRUCS TECHNIQUES

Source de lumière du microscope

Une erreur très répandue consiste à prendre à la lumière du ciel bleu. Dans ce cas, le bleu est si fort que la valeur de la coloration est en grande partie annulée. L'intensité de la lumière est insuffisante pour permettre l'emploi d'un oculaire de grossissement 10 pour la vérification des objets douteux et tout à fait insuffisante pour l'emploi d'un microscope binoculaire.

Le mieux est d'employer la lumière électrique, avec une source constituée par une lampe de 100 watts en verre dépoli. Une lampe de bureau munie d'une tige flexible en col de cygne est tout à fait suffisante et il est inutile pour ce genre de travail d'employer des lampes spéciales qui doivent être munies d'un transformateur.

Si l'on ne dispose pas d'électricité, la meilleure source de lumière est alors une lampe à pétrole sous pression, ce qui suffit pour tous les oculaires et pour les microscopes binoculaires. Il faut disposer un écran entre le microscope et cette source de lumière et de chaleur.

Dans les pays chauds, la chaleur produite par cette lampe peut être très désagréable. En pareil cas, on peut utiliser la lumière du soleil réfléchi sur une feuille de papier blanc ou sur un mur peint à la chaux. Ou bien encore, on peut utiliser la lumière solaire directe à travers un verre dépoli.

Bulles d'air

Quand on réexamine des lames conservées aux fins de démonstration, on s'aperçoit parfois que le sang est obscurci par une pellicule fortement réfringente. Cela est dû à de minuscules bulles d'air coincées sur la surface rugueuse. Il faut enlever l'huile avec du xylène ou de l'essence et remettre de l'huile quand la préparation est encore humidifiée par le solvant. Si cela ne réussit pas, éliminer encore l'huile et laisser sécher. Plonger ensuite la préparation rapidement dans une eau neutre, laisser sécher et examiner.

Fig. 1 a
 TRAY VIEWED FROM ABOVE
 PLATEAU: PLAN SUPÉRIEUR

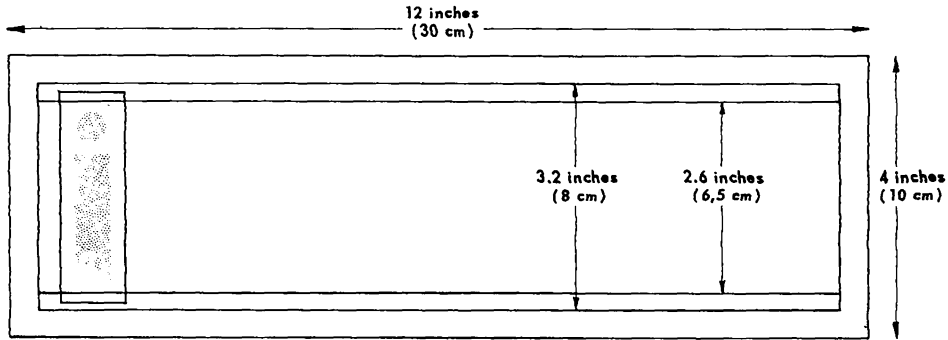


Fig. 1 b
 UNDERSIDE OF TRAY - PLATEAU: PLAN INFÉRIEUR

THE RUNNERS PRESS ON THE SLIDES IN THE TRAY BENEATH TO PREVENT MOVEMENT -
 LES GLISSIÈRES APPUIENT SUR LES LAMES DU PLATEAU INFÉRIEUR ET LES EMPÊCHENT
 DE BOUGER

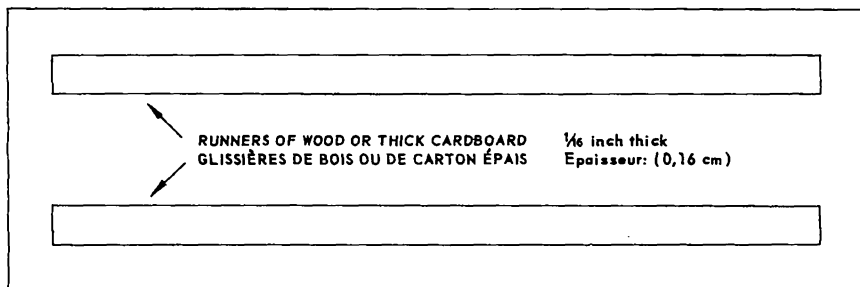


Fig. 1 c
 DETAIL OF TRAY
 PLATEAU: DÉTAIL

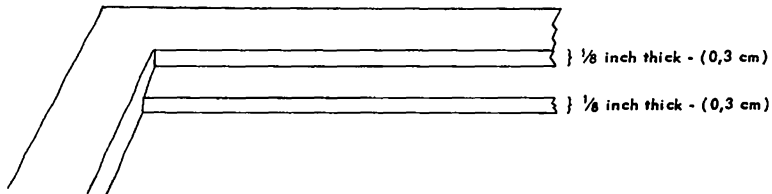


Fig. 2 a
CLOSED - SAC FERMÉ

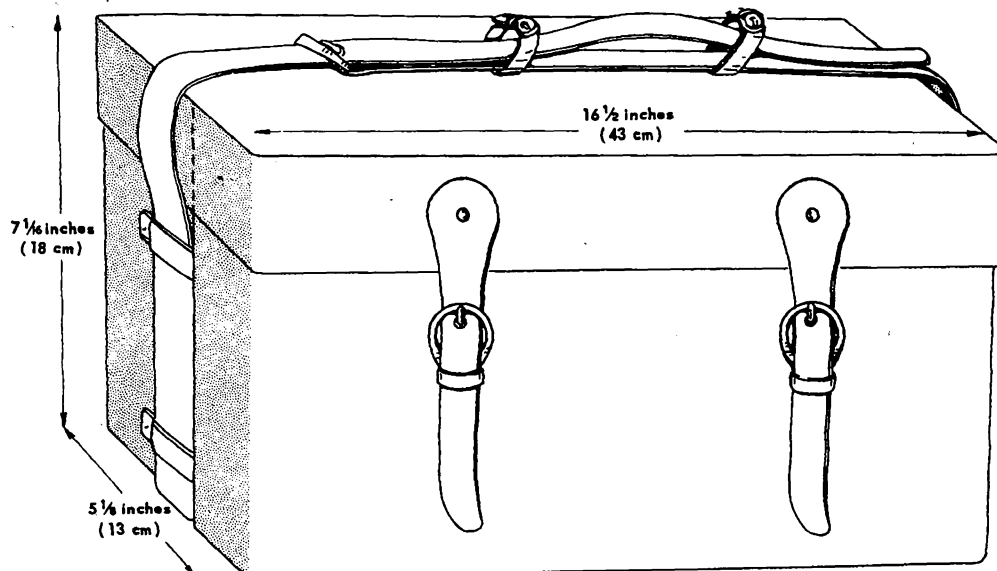


Fig. 2 b
OPEN - SAC OUVERT

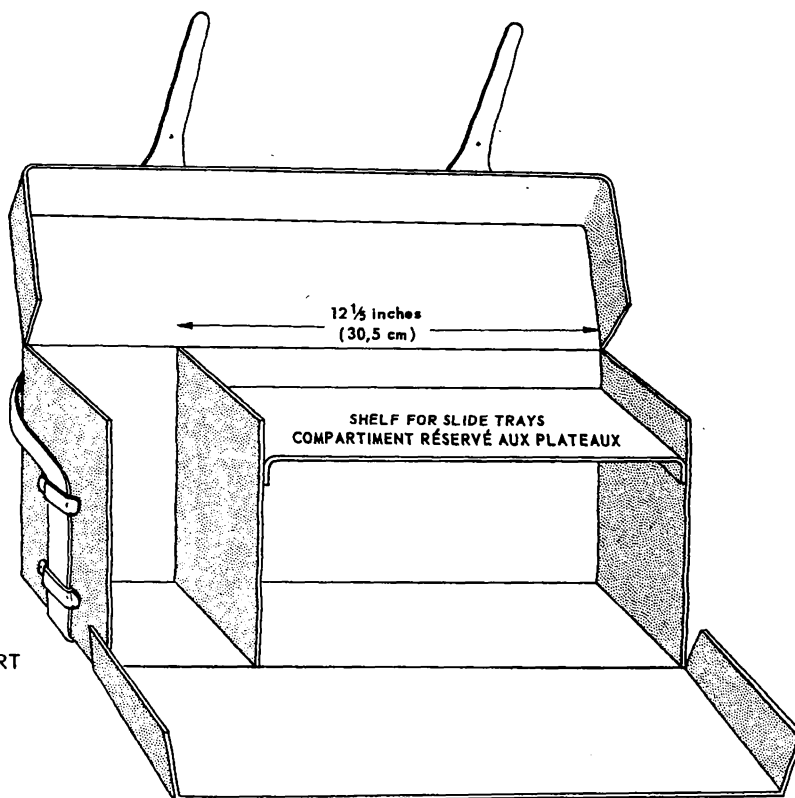


Fig. 3

STAINING TROUGH MADE OF THIN GALVANISED IRON SHEET
BAC DE COLORATION EN TÔLE GALVANISÉE MINCE

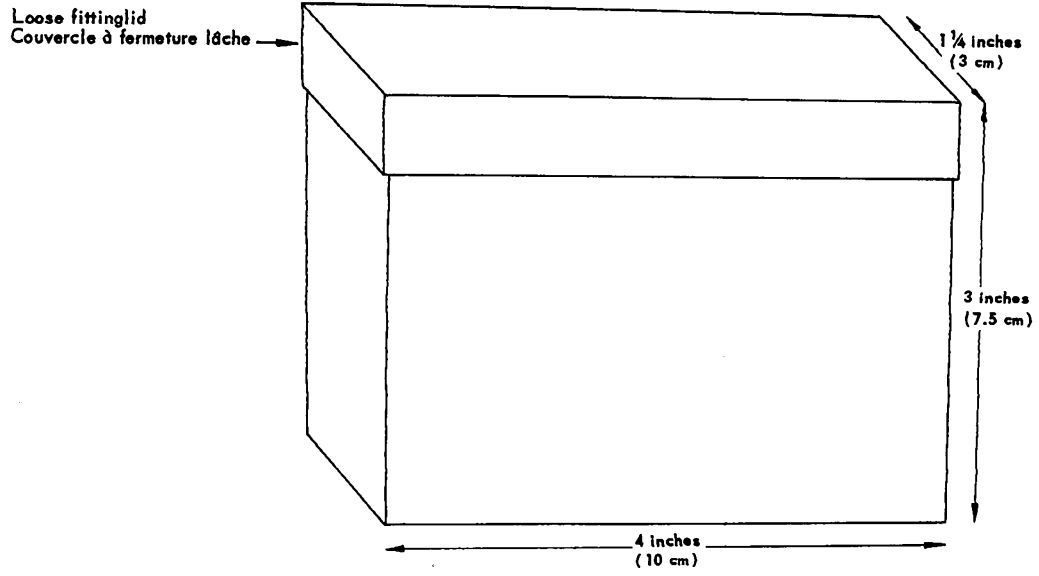


Fig. 4

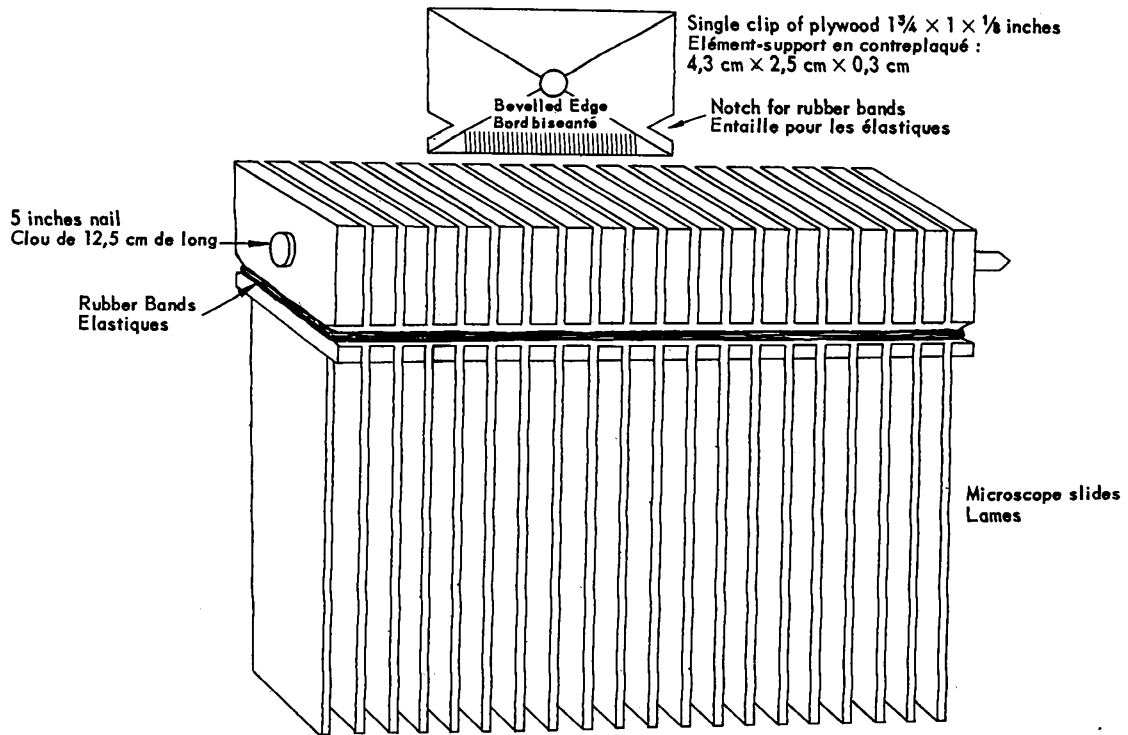
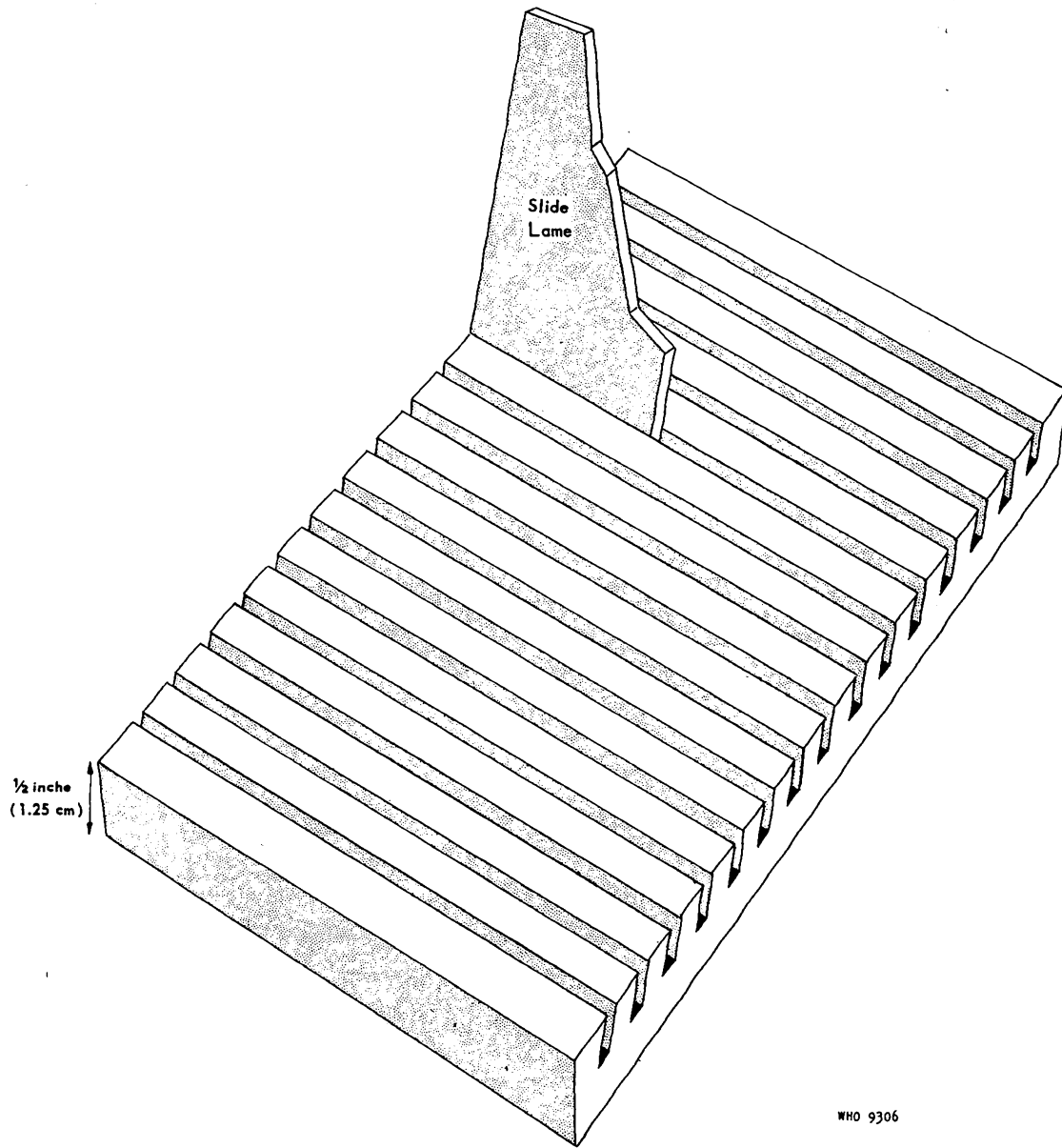


Fig. 5
SLIDE RACK - PORTE-LAMES



WHO 9306